

Received: 2007.03.26
Accepted: 2007.04.25
Published: 2007.06.05

Współczesny stan badań nad koniugatami i innymi systemami dostarczania leków w leczeniu schorzeń nowotworowych i innych jednostek chorobowych

Current status of research on conjugates and related drug delivery systems in the treatment of cancer and other diseases

Dmitry Nevozhay^{1,2}, Urszula Kańska¹, Renata Budzyńska¹, Janusz Boratyński^{1,3}

¹ Zakład Onkologii Doświadczalnej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda, Polska Akademia Nauk we Wrocławiu

² Instytut Fizyki Medycznej im. U.H. Kopwillema we Władystoku, Rosja

³ Akademia im. J. Długosza w Częstochowie

Streszczenie

Szerokie pojęcie „systemy dostarczania leków” obejmuje różne typy koniugatów nośnik-lek, nośnik-białko, liposomów, miceli, polipleksów, a także nośników hybrydowych. Systemy takie projektuje się w celu zwiększenia efektywności dostarczania, wybiórczości działania i poprawy właściwości farmakologicznych zarówno konwencjonalnych, jak i nowoczesnych leków. W pracy opisano stan zaawansowania w badaniach nad systemami dostarczania leków ze szczególnym uwzględnieniem nośników leków przeciwnowotworowych. Przedstawiono zalety, ograniczenia i wady poszczególnych typów nośników, a także teoretyczne i praktyczne podstawy ich działania. Podsumowano również wyniki badań przedklinicznych i klinicznych wybranych systemów dostarczania leków.

Słowa kluczowe:

koniugaty • liposomy • polipleksy • nośniki • micelle • przeciwciała • leki przeciwnowotworowe • nowotwory • systemy dostarczania leków

Summary

Drug delivery systems is an umbrella term describing different types of carrier-drug and carrier-protein conjugates, liposomes, polyplexes, micelles, and hybrid types. Such systems were designed with the aim to enhance delivery and to improve the selectivity and pharmacological properties of both conventional drugs and newly developed agents. In this review the current state-of-the-art in the design of drug delivery systems is described, with particular emphasis on agents developed to deliver antitumor agents. The advantages, limitations, and disadvantages of the particular types of drug delivery systems as well as the theoretical and practical basis of their action are also highlighted here. In addition, results of preclinical and clinical studies on the most developed examples of drug delivery systems to date are summarized.

Key words:

conjugates • liposomes • polyplexes • carriers • micelles • antibodies • antitumor drugs • cancer • drug delivery systems

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/10511.pdf

Word count: 4169

Tables: 1

Figures: 3

References: 69

Adres autora: doc. dr hab. inż. Janusz Boratyński, Zakład Onkologii Doświadczalnej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. R. Weigla, 12, 53-114 Wrocław; e-mail: borat@iitd.pan.wroc.pl

Wykaz skrótów: **DDS** – systemy dostarczania leków (drug delivery system(s)); **EPR** – zwiększona przepuszczalność naczyń i zatrzymanie (enhanced vascular permeability and retention); **HPMA** – N-(2-hydroksypropylo)metakryloamid (N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide); **MW** – masa cząsteczkowa (molecular weight); **PEC** – polipeksy, kompleksy polielektrolitowe (polyelectrolyte complexes); **PEG** – polietylenoglikol (polyethylene glycol); **PEI** – polietylenoimina (polyethylenimine); **PGA** – kwas poliglutaminowy (polyglutamic acid).

WPROWADZENIE

Większość stosowanych obecnie leków należy do związków o małej masie cząsteczkowej [26,28]. Ich wadami są: szybki metabolizm i szybkie wydalanie z organizmu, niekorzystna biodystrybucja oraz niewielka wybiórczość działania terapeutycznego [3]. Problemy te próbuje się rozwiązać poszukując nowych preparatów o bardziej wybiórczym działaniu albo stosując nośniki leków [21]. Projektowanie nowych leków ułatwia ogromny rozwój wiedzy naukowej na temat genetycznych i molekularnych aspektów etiopatogenezy nowotworów, który nastąpił w ciągu ostatnich dwóch dekad. Przykładem spektakularnego osiągnięcia jest wprowadzenie imatinibu (Gleevec™ lub Glivec™) hamującego nieprawidłową kinazę tyrozynową Bcr-Abl w przewlekłej białaczce szpikowej, a także trastuzumabu (Herceptin™) – przeciwciała nakierowanego na obecny na komórkach raka piersi receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 (HER2/neu) [2,21]. Jednak nawet w przypadku nowych leków pojawia się problem lekooporności.

Projektowanie nośników substancji terapeutycznych jest drugim wspomnianym podejściem umożliwiającym poprawę właściwości farmakokinetycznych i biodystrybucji „klasycznych” i nowych leków [21]. Nośniki te określane są w języku angielskim ogólną nazwą systemy dostarczania leków (DDS – drug delivery systems) [3]. W pracy omówiono główne rodzaje tych systemów i ich zastosowanie ze szczególnym uwzględnieniem ich wykorzystania w leczeniu chorób nowotworowych.

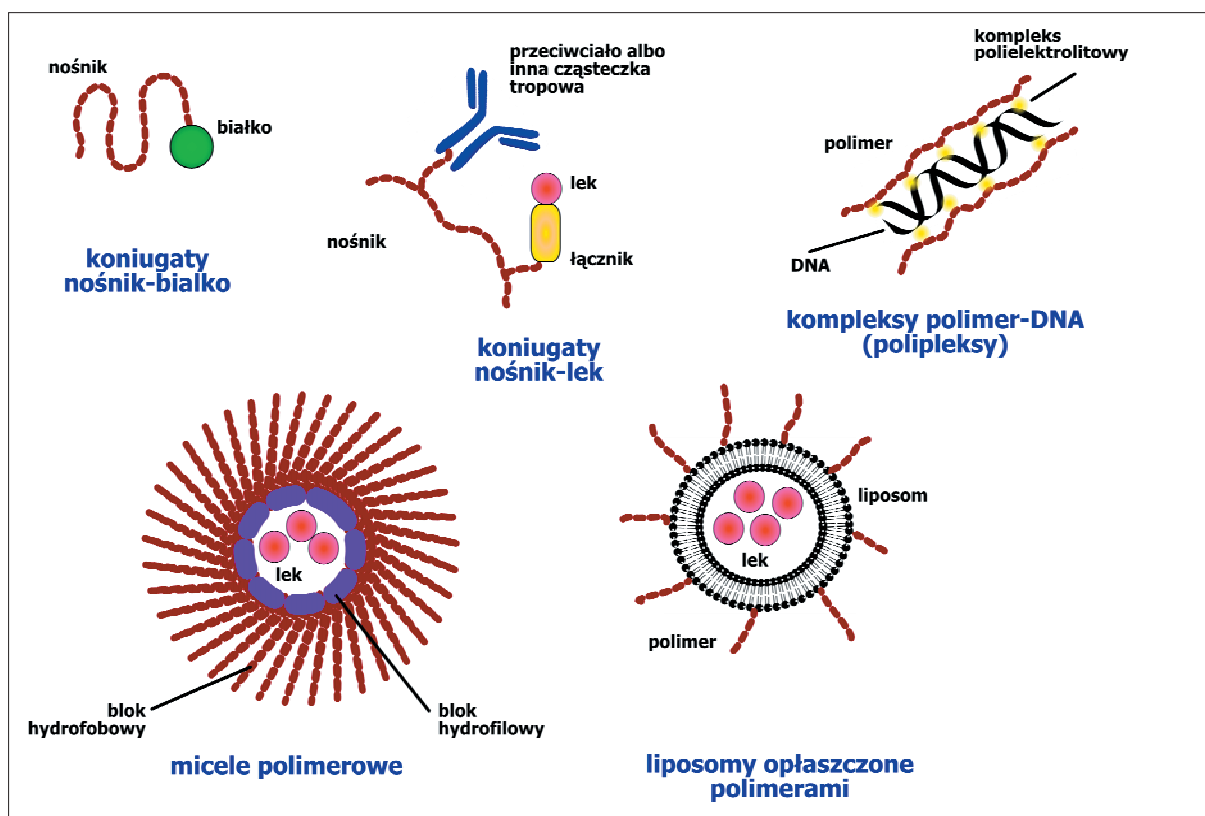
Zaprojektowano i zbadano efektywność terapeutyczną wielu typów DDS. Lek jest zazwyczaj kowalencyjnie wiązany z nośnikiem tworząc koniugat nośnik-lek [26]. Jako osobną grupę wyróżniono koniugaty, w których substancja czynna jest białkiem lub peptydem (polimer-białko, dalej w tekście: nośnik-białko). Makrocząsteczki mogą tworzyć również kompleksy z substancjami terapeutycznymi, jak w przypadku kompleksów polielektrolitowych nośnik-DNA (polipeksów) [20,21]. Makrocząsteczkowymi nośnikami mogą być polimery syntetyczne lub naturalne, a także białka, w tym przeciwciała [7,31]. Kolejną grupę nośników stanowią emulsje i liposomy, w których lek jest fizycznie zamknięty w nanocząstkach. Na ryc. 1 przedstawiono schematycznie strukturę omawianych DDS.

Każdy ze wspomnianych typów nośników ma wady i zalety, co stało się przyczyną tworzenia hybrydowych terapeutyków, będących połączeniem leku, polimeru, białka, przeciwciała i liposomów w różnych kombinacjach [21]. Przykładem są liposomy opłaszczane polimerami. Projektowanie takich hybryd jest jednym ze sposobów realizacji koncepcji „magicznej kuli” głoszonej na początku XX w. przez Paula Ehrlicha, służącej do wybiórczego deponowania i uwalniania substancji terapeutycznej w tkankach docelowych [26].

Mimo że rola nośników w tworzeniu nowych preparatów leczniczych jest niedoceniana, narasta przeświadczenie, że realizowanie koncepcji przyniesie znaczący postęp w leczeniu i diagnostyce wielu chorób, w tym też nowotworowych [21]. Potwierdza to rosnąca liczba komercyjnych koniugatów nośnik-białko i obszerne badania kliniczne koniugatów nośnik-lek (tabela 1). Intensywne badania genomowe oraz postęp inżynierii genetycznej umożliwiają otrzymanie nowych substancji terapeutycznych, takich jak peptydy, białka, oligonukleotydy. Jest oczywiste, że brak efektywnych systemów dostarczania tych nowych czynników jest problemem, który musi być rozwiązany, aby umożliwić ich praktyczne wykorzystanie w terapii [20]. W 2003 r., po raz pierwszy w historii, amerykańska agencja rządowa zajmująca się rejestracją leków (Federal Drug Administration) dopuściła do obrotu rynkowego więcej produktów biotechnologicznych niż konwencjonalnych, niskocząsteczkowych leków [21]. Świadczy to o tym, że medycyna ma już dość szeroki i dobrze opracowany arsenał środków do leczenia różnych chorób. Problem leży jedynie we właściwym użyciu i wybiórczym dostarczeniu tych czynników, aby zapewnić optymalny efekt terapeutyczny.

BIOLOGICZNE ORAZ CHEMICZNE PODŁOŻE DZIAŁANIA KONIUGATÓW TERAPEUTYCZNYCH ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM CHOROÓB NOWOTWOROWYCH

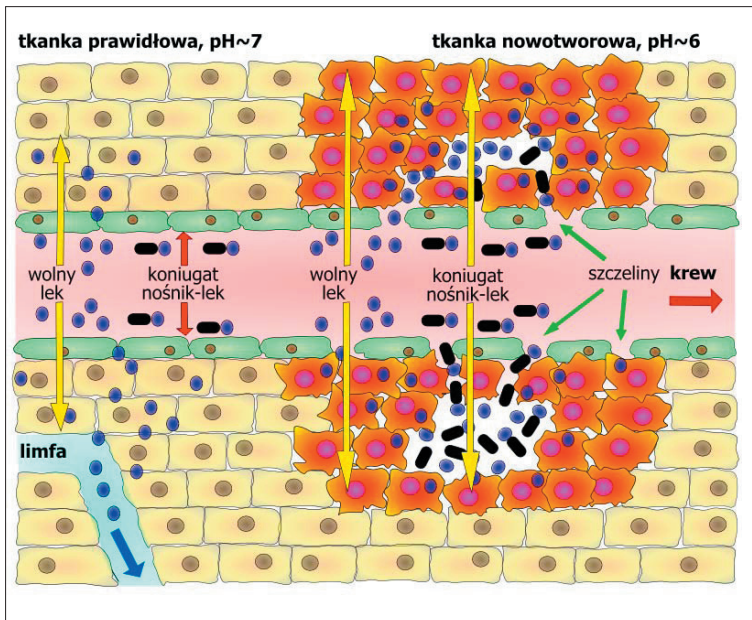
Wiązaniu leku z nośnikiem często towarzyszy zmiana jego dystrybucji. Zmiana dystrybucji jest korzystna, jeśli prowadzi do zwiększonej kumulacji leku w tkance docelowej, np. w guzie nowotworowym. Biodystrybucja związanego leku (koniugatu) w dużej mierze zależy od właściwości nośnika. Stosowane są dwa główne podejścia do dostarczania leków: aktywne i bierno. W przypadku transportu aktywnego, no-



Ryc. 1. Schematyczna struktura różnych systemów dostarczania leków (wg [20,21] – zmodyfikowano)

Tabela 1. Aktualny stan kliniczny oraz rynkowy niektórych koniugatów nośnik-białko oraz nośnik-lek; wg [20,21,26,64]

Terapeutyk	Białko albo lek	Nośnik	Stan	Zastosowanie
Koniugaty nośnik-białko				
Adagen	deaminaza adenozykowa	PEG	na rynku, 1990	ciężki skojarzony niedobór odporności
Oncaspar	L-asparaginaza	PEG	na rynku, 1994	ostra białaczka limfocytowa
PEG-INTRON™	α-interferon 2b	PEG	na rynku, 2000	WZW C (liczne próby w innych chorobach)
PEGASYS™	α-interferon 2a	PEG	na rynku, 2002	WZW B, C (liczne próby w innych chorobach)
Pegvisomant	zmodyfikowany hormon wzrostu	PEG	na rynku, 2002	akromegalia (w Unii Europejskiej)
Neulasta™	G-CSF	PEG	na rynku, 2002	neutropenia (zazwyczaj po chemioterapii)
Koniugaty nośnik-lek				
PK1; FCE28068	doksorubicyna	HPMA	faza II	raki piersi i płuc, inne
PK2; FCE28069	doksorubicyna-galaktozamina	HPMA	faza I/II	rak wątrobowokomórkowy, inne
PNU166945	paklitaksel	HPMA	faza I zakończona	różne
PNU166148	kamptotecyna	HPMA	faza I zakończona	różne
AP5280	preparat platyny	HPMA	faza I zakończona	różne
CT-2103, XYOTAX	paklitaksel	PGA	faza III	niedrobnokomórkowy rak płuc oraz rak jajnika
CT-2106	kamptotecyna	PGA	faza I/II	różne
PROTHECAN	kamptotecyna	PEG	faza I zakończona	różne
NK911	doksorubicyna i kwas asparaginowy	PEG	faza I zakończona	różne
MTX-HSA	metotreksat	albumina	faza II	różne



Ryc. 2. Schematyczne przedstawienie anatomicznej i fizjologicznej charakterystyki tkanek prawidłowej oraz nowotworowej. Ilustruje koncepcję efektu zwiększonej przepuszczalności naczyń i zatrzymania makrocząstek w tkance nowotworowej (wg [20,21,26,64] – zmodyfikowano)

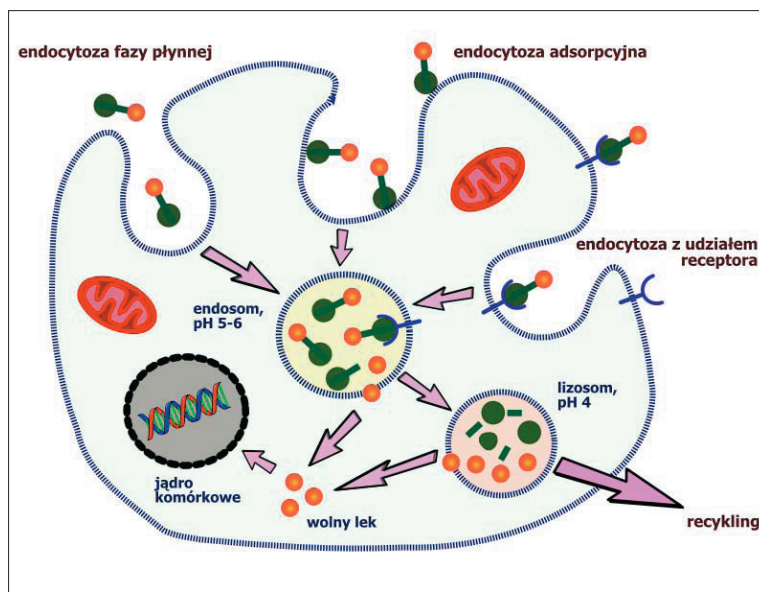
śnikiem lub jego fragmentem mogą być swoiste przeciwciała, cukry, peptydy lub białka, które teoretycznie mogą wybiórczo wiązać się z receptorami lub antygenami komórek docelowych. Przykładem są koniugaty przeciwciało-lek. Mimo że koniugaty leków z nośnikami aktywnie dostarczająco leku są atrakcyjną alternatywą, jak dotąd tylko jeden taki preparat przeszedł do fazy badań klinicznych [21]. Jest to koniugat doksorubicyny z HPMA i galaktozaminą. Przyłączony cukier jest rozpoznawany przez receptor asjaloglikoprotein obecny na hepatocytach i sprawia, że koniugat może być skuteczny w leczeniu pierwotnego raka wątrobowokomórkowego lub wtórnych zmian przerzutowych w wątrobie (tabela 1) [59]. Seymour i wsp. wykazali, że chociaż koniugat gromadzi się również w prawidłowych hepatocytach, to stężenie doksorubicyny w komórkach nowotworowych jest 12–50 razy większe niż w przypadku podawania wolnego leku [20,59].

Transport pasywny leków jest wykorzystywany głównie w leczeniu chorych na nowotwory. Jest to związane z unikalną anatomiczną i fizjologiczną charakterystyką tkanki guza nowotworowego. Wykorzystanie zwiększonej przepuszczalności naczyniowej i zatrzymywania małych i dużych cząstek w tkance guza nowotworowego (enhanced vascular permeability and retention – EPR) w projektowaniu nowych koniugatów nośnik-lek przeciwnowotworowy po raz pierwszy zasugerowali Maeda i wsp. [33]. Zdrowe tkanki, poza kilkoma wyjątkami (wątroba, śledziona, szpik kostny), mają względnie zwartą strukturę śródbłonna naczyń włosowatych [20]. Natomiast tkance nowotworowej towarzyszy często nieszczelna sieć naczyń krwionośnych powstałych w wyniku chaotycznej neoangiogenezy [28]. Średnicę szczelin w naczyniach włosowatych guza szacuje się na około 100–800 nm, a czasami nawet więcej [3,28,70], podczas gdy średnica fizjologicznych szczelin w prawidłowym ciągłym śródbłonnku wynosi jedynie około 2 nm i do 6 nm w żyłkach pozawłosowatych [28,46]. Większość niskocząsteczkowych leków przeciwnowotworowych, z powodu małego rozmiaru ich cząstek, dyfunduje względnie swobodnie przez śródbłonek naczyń zarówno do prawidłowych, jak i nowotworowych

tkanek [62]. Natomiast makrocząsteczki, w tym koniugaty nośnik-lek, nie mogą przeniknąć przez szczelną warstwę śródbłonna naczyń włosowatych zdrowych tkanek, ale względnie łatwo przedostają się z krążenia do tkanki guza nowotworowego. W obrębie guza często upośledzony jest także układ drenażu limfatycznego. Powoduje to obniżenie klirensu leku z tkanki nowotworowej i prowadzi do gromadzenia się i zatrzymania makrocząstek w guzie (ryc. 2) [3,26,28,64]. Ponadto wykazano, że makrocząsteczki, w tym białka i polisacharydy, wybiórczo gromadzą się w jamie otrzewnej, w której rozwijają się wysiękowe postaci nowotworów [39-43].

Opisany wyżej efekt EPR prowadzi do preferencyjnej ekstrawazacji i gromadzenia się makrocząsteczkowych nośników leków w tkance guza nowotworowego [21]. Pasywne gromadzenie się w tkance guza w wyniku EPR długo krążących makrocząstek, w tym koniugatów białkowych i polimerowych, liposomów i miceli, jest dobrze udokumentowane, podobnie jak to, że pozajelitowo podane DDS mogą znacząco zwiększyć stężenie leków przeciwnowotworowych w guzie [20]. O stopniu gromadzenia się makrocząstek w tkance nowotworowej decyduje m.in. ich wielkość. Znaczące działanie EPR zaobserwowano w wypadku DDS o masie cząsteczkowej 20 kDa i większej [19,26]. Stopień unaczynienia guza nowotworowego jest również istotny. Wiadomo, że akumulacja DDS zachodzi w mniejszym stopniu w przypadku małych nieunaczynionych, a także dużych martwiczych i słabo ukrwionych guzów [3,28]. Efekt EPR wykorzystano również do pasywnego dostarczania leków do tkanek objętych stanem zapalnym, których naczynia krwionośne również charakteryzują się zwiększoną przepuszczalnością. Stwarza to możliwość wykorzystania koniugatów w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów i innych chorób o podłożu immunologicznym [26].

Masa cząsteczkowa (MW) preparatu wpływa również na jego biologiczny okres półtrwania. Makrocząsteczki o MW powyżej progu nerkowego, który wynosi około 40 kDa, nie mogą przejść przez ściany naczyń włosowatych kłębusz-



Ryc. 3. Internalizacja kompleksu nośnik-lek oraz jego degradacja wewnątrzkomórkowa z następującym uwolnieniem leku (wg [20,26,62] – zmodyfikowano)

ków nerkowych [26,33,36,37,62], co obniża ich klirens nerkowy i prowadzi do wydłużenia biologicznego okresu półtrwania [33]. Okres półtrwania wydłuża się ze wzrostem MW makrocząsteczki [19]. Opóźnianie wydalania odgrywa istotną rolę w leczeniu chorych z nowotworami hematologicznymi, w przypadku których zjawisko EPR nie występuje. Jest jednak również istotne w przypadku leczenia chorych z guzami litymi, ponieważ istnieje korelacja między okresem półtrwania koniugatu w krążeniu, jego klirensiem nerkowym a gromadzeniem się w guzie nowotworowym. Większość badaczy stosuje makrocząsteczki o MW 20–200 kDa [26]. Na właściwości farmakokinetyczne i biodystrybucję koniugatu mają wpływ również ładunek, konformacja, hydrofobowość i immunogenność nośnika [62].

Chociaż niektóre leki przeciwnowotworowe wykazują aktywność w postaci związanej z nośnikiem, przypuszczalnie większość z nich wymaga uwolnienia leku w wyniku albo degradacji nośnika albo zerwania wiązania między lekiem a nośnikiem [62]. Lek może zostać uwolniony z koniugatu w przestrzeni wewnątrz- lub zewnątrzkomórkowej. Niektóre koniugaty są tak zaprojektowane, aby preferencyjnie uwalniać lek w przestrzeni zewnątrzkomórkowej [26]. Wykorzystuje się m.in. to, że tkanka guza nowotworowego cechuje się obniżonym pH w porównaniu z innymi tkankami, i łączy się lek z nośnikiem wiązaniem, które ulegnie zerwaniu w takim środowisku. Inne koniugaty działają jako rezerwuary leku wolno uwalniając lek albo przez rozpad nietrwałych wiązań, albo przez degradację połączenia nośnik-lek w warunkach fizjologicznych [3].

Ponieważ makrocząsteczki nie mogą przechodzić swobodnie przez błonę komórkową, głównym mechanizmem, za pomocą którego dostają się do wnętrza komórek, jest endocytoza. Koniugaty nośnik-lek rozpuszczone w płynie zewnątrzkomórkowym mogą być transportowane za pośrednictwem endocytozy fazy płynnej. W procesie tym najpierw tworzą się wgłobienia w błonie komórkowej, a następnie dochodzi do internalizacji endosomów. Proces zachodzi ze względnie małą prędkością. Szybszym procesem jest endocytoza adsorpcyjna, za pomocą której internalizo-

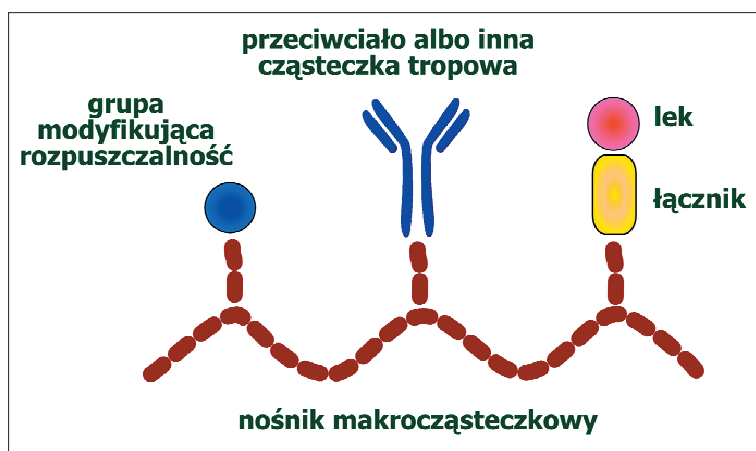
wane są makrocząsteczkowe koniugaty związane z błoną komórkową. Endocytoza z udziałem receptora – trzeci mechanizm internalizacji, jest możliwa w przypadku preparatów swoiście wiążących się do receptorów ekspresjonowanych na powierzchni komórki [62]. Poszczególnym fazom endocytozy towarzyszy obniżanie pH. W endosomach pH obniża się do około 6,0–5,0, a po połączeniu endosomów z lizosomami do około 4,0. Enzymy lizosomalne trawiąc koniugat nośnik-lek uwalniają substancję czynną, która będąc względnie stabilną cząsteczką może dyfundować do cytosolu. Jest to główny „lizosomotropowy” szlak wewnątrzkomórkowej degradacji [26]. Alternatywnie, koniugaty, w których lek jest związany z nośnikiem wiązaniem zależnym od pH, mogą uwalniać lek już w endosomach. Może to zapobiegać degradacji aktywnego czynnika w lizosomach. W tym wypadku lek bezpośrednio z endosomów dyfunduje do cytosolu. Ten „endosomotropowy” szlak jest preferowany w przypadku polipeksów, czyli dostarczania DNA w kompleksach z polikationami. Uwolnienie DNA z endosomów zapobiega jego degradacji w agresywnym środowisku wewnątrz lizosomów [26]. Procesy internalizacji i degradacji wewnątrzkomórkowej koniugatów przedstawiono na ryc. 3.

BADANIA PRZEDKLINICZNE ORAZ ZASTOSOWANIE KONIUGATÓW W LECZNICTWIE

Koniugaty nośnik-lek

Wykorzystanie makrocząsteczek jako elementów DDS zaproponował w 1975 r. Ringsdorf [52]. Wiązanie makrocząsteczkowego nośnika z lekiem może być bezpośrednie lub za pośrednictwem łącznika. Do nośnika mogą być również przyłączone cząsteczki (przeciwciała, cukry), odpowiedzialne za rozpoznanie komórek lub tkanek docelowych (tzw. cząsteczki tropowe). Czasem istnieje również konieczność dołączenia do nośnika ugrupowań modyfikujących rozpuszczalność koniugatu (ryc. 4) [26].

Jako nośniki leków zastosowano wiele naturalnych i syntetycznych makrocząsteczek. Wybór nośnika nie jest przy-



Ryc. 4. Ogólny model koniugatu nośnik-lek zaproponowany przez Ringsdorfa [26, 52] – zmodyfikowano

padkowy, nośnik musi spełniać pewne wymagania: powinien być nietoksyczny, nieimmunogenny, biokompatybilny i nie powinien kumulować się w organizmie. Musi ponadto zawierać grupy funkcyjne umożliwiające przyłączenie leku, przy czym po koniugacji powinna być zachowana aktywność leku i nośnika. Nośnik powinien umożliwiać dostarczenie wystarczającej ilości leku [32,62]. Do najczęściej stosowanych należą syntetyczne polimery: polietylenoglikol (PEG), N-(2-hydroksypropylo)metakryloamid (HPMA), polimer kwasu glutaminowego (PGA), oraz dekstrany i białka należące do naturalnych makrocząsteczek [20,21,26].

Interesujące wyniki badań przedklinicznych wzbudziły większe zainteresowanie DDS. Obecnie wiele koniugatów nośnik-lek znajduje się w fazie badań klinicznych (tabela 1). Pierwszym preparatem nośnik-lek testowanym klinicznie był koniugat HPMA-doksorubicyna (oznaczony kodem PK1) [63]. Badania farmakokinetyczne potwierdziły wydłużony biologiczny okres półtrwania doksorubicyny podanej w postaci skoniugowanej [20]. Ponadto wykazano, że maksymalna tolerowana dawka doksorubicyny w postaci związanej z nośnikiem jest 4 razy większa niż wolnego leku. Pomimo zwiększonej dawki, nie zaobserwowano kardiotoxyczności, powikłania często występującego w przypadku podawania doksorubicyny [21]. Odpowiedź na leczenie uzyskano u pacjentów opornych na chemioterapię. Koniugat HPMA-doksorubicyna przeszedł następnie do II fazy badań klinicznych z udziałem pacjentów chorych na raka piersi, niedrobnokomórkowego raka płuca i raka okrężnicy [26].

Wspominaliśmy już preparat koniugat HPMA-doksorubicyna-galaktozamina (PK2), zaprojektowany do leczenia raka wątrobowokomórkowego. Jest on jedynym preparatem testowanym klinicznie zawierającym część odpowiedzialną za rozpoznanie komórek docelowych [59].

Skutecznym koniugatem nośnik-lek okazał się koniugat paklitakselu i polimeru kwasu glutaminowego (XYOTAX). We wczesnych badaniach klinicznych, odpowiedź uzyskano u znacznej liczby pacjentów z różnymi nowotworami [54]. Natomiast opublikowane wyniki badań III fazy wskazują, że XYOTAX jest mniej toksyczną i bardziej efektywną opcją leczenia pacjentów z rakiem niedrobnokomórkowym płuca, co jest szczególnie istotne w przypadku chorych bę-

dących w złym stanie [1]. Pojawiły się także doniesienia na temat wykorzystania XYOTAX, jako nowego czynnika uwrażliwiającego na radioterapię [18]. W USA rozpoczęto również III fazę badań klinicznych XYOTAX z udziałem pacjentów z rakiem jajnika [21]. Trwają też badania I oraz II fazy nad koniugatem kamptotecyny z polimerem kwasu glutaminowego (PGA-kamptotecyna, CT-2106) [26].

Dwa z koniugatów zawierających HPMA: koniugat HPMA-paklitaksel i HPMA-kamptotecyna (odpowiednio: PNU166945 i PNU166148) wykazały ograniczoną aktywność przeciwnowotworową w I fazie badań klinicznych mimo obiecujących wyników badań przedklinicznych [26,35,58]. Interesujące rezultaty natomiast uzyskano w I fazie badań klinicznych koniugatu HPMA-platynian (AP5280), który obecnie jest w II fazie badań [51,64]. Niedawno pojawiły się doniesienia na temat leczenia łączącego terapię hormonalną z chemioterapią z wykorzystaniem koniugatu HPMA-aminoglutetymid-doksorubicyna. Koniugat zawierający oba leki wykazał znacznie większą aktywność *in vitro* niż mieszanina koniugatów dwóch pojedynczych leków. Obserwacje te potwierdzają możliwość zaprojektowania nowych metod leczenia nowotworów hormonozależnych [21,25,65].

Alternatywą cytotoxycznej chemioterapii jest hamowanie rozwoju unaczynienia guza nowotworowego. W literaturze można spotkać interesujące doniesienia na temat aktywności w badaniach przedklinicznych pierwszego koniugatu HPMA zawierającego inhibitor angiogenezy TNP-470 [20,57].

Prothecan jest pierwszym testowanym klinicznie koniugatem leku (kamptotecyny) z PEG [26]. Wyniki I fazy badań okazały się interesujące i lek został zakwalifikowany do II fazy badań klinicznych [50,53].

Badania nad koniugatem ludzkiej albuminy z metotreksatem (HSA-MTX) są bliskie tematyce realizowanej w naszym Zakładzie. Wykazano znaczące gromadzenie się tego koniugatu w szczyrkach guzów nowotworowych i jego wysoką aktywność leczniczą w niektórych ludzkich nowotworach przeszczepionych myszom bezgranicznych [15,26,69]. W I fazie badań klinicznych brało udział 17 pacjentów. Zaobserwowano jedną częściową remisję. Koniugat był dobrze tolerowany, odnotowano tylko jeden przypadek łagodnej

niedokrwistości i podniesienia poziomów enzymów wątrobowych, nie zaobserwowano natomiast takich objawów jak leukopenia, mdłości, toksyczność nerkowa i in. [27]. Oprócz tego w 2006 r. ukazały się wyniki II fazy badań nad koniugatem HSA-MTX w połączeniu z cisplatyną, jako terapii pierwszego rzutu w zaawansowanym raku pęcherza moczowego. Wśród siedmiu pacjentów zaobserwowano jedną całkowitą oraz jedną częściową odpowiedź przy dopuszczalnych efektach toksycznych samej terapii [6].

Nośnikiem leków mogą być również przeciwciała skierowane przeciwko antygenom na komórkach nowotworowych albo na komórkach tkanek towarzyszących, np. komórkach naczyń krwionośnych guza. Wadą pierwszych koniugatów przeciwciało-lek była ich immunogenność, ponieważ pierwotna technika hybrydowa umożliwiała otrzymywanie mysich przeciwciał monoklonalnych. Postęp w inżynierii przeciwciał pozwolił najpierw na uzyskanie chimerowych, następnie humanizowanych, a w końcu całkowicie ludzkich przeciwciał lub ich fragmentów. Pozwoliło to na ograniczenie problemów z odpowiedzią immunologiczną przeciwko przeciwciałom. Technika fagowej ekspresji peptydów pozwala z kolei na selekcję fragmentów przeciwciał o wysokim powinowactwie do cząsteczki docelowej [2].

Inną wadą stosowania przeciwciał jest ograniczona ilość leku dostarczana przez jedną cząsteczkę nośnika. Problem ten rozwiązywany jest przez stosowanie leków o silniejszym działaniu lub rozgałęzionych łączników umożliwiających przyłączenie większej liczby cząsteczek leku do jednego miejsca wiążącego przeciwciała. Obecnie w fazie badań klinicznych znajduje się wiele koniugatów przeciwciał z radionuklidami o wysokim współczynniku liniowego przenoszenia energii, np. ^{131}I , ^{90}Y , ^{213}Bi i ^{211}At . Przeciwciała wiążą się również z toksynami, np. deglikozylowaną rycyną lub uzyskuje się białka fuzyjne zawierające przeciwciała lub ich fragmenty i toksyny, np. egzotoksynę *Pseudomonas* [2]. W przypadku przeciwciał problemami są też trudności w definiowaniu antygenów przypisanych wyłącznie komórce nowotworowej, oraz ich zdolność do reakcji z antygenami nowotworowymi obecnymi w krążeniu.

Koniugaty nośnik-białko (polimer-białko)

Rozwój biotechnologii umożliwił konstrukcję wielu nowych białkowych czynników terapeutycznych. Ich ograniczeniami są często krótki okres biologicznego półtrwania, mała stabilność i immunogenność [20]. W latach 70 ub.w. Davis i wsp. zaproponowali technikę przyłączania białek do makrocząsteczek PEG, zwaną dziś „PEG-ylacją” [17]. Przyłączenie PEG umożliwia zwiększenie stabilności białka, obniża jego immunogenność, wydłuża okres półtrwania obniżając klirens nerkowy i zapobiegając wyłapywaniu przez układ siateczkowo-śródbłonkowy [64]. Wprowadzenie na rynek PEG-ylowanej asparaginazy, deaminazy adenozynowej, interferonów i czynnika stymulującego powstawanie kolonii granulocytów było szybką odpowiedzią przemysłu farmaceutycznego na wyniki badań (tabela 1).

Najpierw wprowadzono koniugaty pierwszej generacji otrzymywane w wyniku przyłączenia do cząsteczki białka jednego lub więcej łańcuchów PEG o masie 5–12 kDa [26]. Takie podejście miało jednak wady, takie jak sieciowanie białka, zmiana ładunku białka z powodu modyfikacji grup

karboksylowych i aminowych, częsta niestabilność wiązań PEG-białko [20]. Mimo ograniczeń, PEG-ylowane białka pierwszej generacji, takie jak Adagen (deaminaza adenozynowa), Oncaspar (L-asparaginaza) i PEG-INTRON™ (interferon α -2b), okazały się skuteczniejszymi preparatami niż niemodyfikowane odpowiedniki i zostały zatwierdzone do stosowania w leczeniu różnych chorób [26].

W przypadku PEG-ylowanych białek drugiej generacji łańcuchy PEG (liniowe lub rozgałęzione) przyłączane są regio-selektywnie do swoistych reszt aminokwasowych białka, dzięki czemu ograniczone są zmiany konformacji makrocząsteczki [26]. Przykładami PEG-ylowanych białek drugiej generacji są PEGASYS™ (zawiera interferon α -2a) i Neulasta™ (zawiera czynnik stymulujący powstawanie kolonii granulocytów).

Wykazano, że PEG-ylowane białka wykazują się lepszym działaniem terapeutycznym i/lub obniżoną toksycznością w porównaniu z konwencjonalnymi białkami [16,26,64]. Inną niewątpliwą zaletą dla pacjentów jest mniejsza częstość podawania PEG-ylowanych białek [20]. PEG-INTRON™ i PEGASYS™ dopuszczono do leczenia wielu chorób, obecnie trwają również próby kliniczne z udziałem pacjentów chorych na czerniaka i raka nerki [64]. Więcej szczegółów na temat PEG-ylowanych białek można znaleźć w pracy przeglądowej Calicetiego i Veronese'a [16].

KRÓTKA CHARAKTERYSTYKA INNYCH SYSTEMÓW NOŚNIK-TERAPEUTYK

Jak wspomniano wcześniej do DDS należą również kompleksy polimer-DNA (polipleksy), micelle polimerowe i liposomy opłaszczone polimerami. Więcej informacji na ich temat można znaleźć w kilku pracach przeglądowych [2,3,20,21,23,49,64].

Kompleksy polimer-DNA

Rozwój terapii genowej pociągnął za sobą zapotrzebowanie na skuteczne metody transportu genów. Wektory wirusowe wykorzystywane do transfekcji, mimo wielu zalet, mają istotne ograniczenia. Wywołują odpowiedź immunologiczną, cechują się ograniczoną wybiórczością działania. Alternatywą dla wektorów wirusowych są obecnie szeroko badane kompleksy polimer-DNA (polipleksy, kompleksy polielektrolitowe, PEC). Kompleksy te powstają między ujemnie naładowanym DNA a dodatnio naładowanymi polimerami. Wektory polimerowe są wciąż mniej efektywnymi nośnikami genów w porównaniu z wirusami. Jednak projektowane są coraz to doskonalsze polimery nośnikowe, np. polimery endosomolityczne zależne od pH, co stwarza nadzieję, że mogą zastąpić nośniki wirusowe [9,20].

Polipleksy muszą pokonać kilka barier, aby dostarczyć materiał genetyczny do jądra. Muszą dostać się do komórki przez błonę komórkową, uwolnić się z endosomów, najlepiej zanim ulegną one fuzji z lizosomami, i ostatecznie dotrzeć do jądra komórkowego. Rozmiar, ładunek, hydrofobowość i zdolność buforowania polimeru są krytycznymi parametrami decydującymi o efektywności polipleksu [26].

Obecnie szeroko badanymi wektorami niewirusowymi są polimery polietylenoiminowe (PEI). Charakteryzują się one stosunkowo dużą skutecznością w transfekcji komór-

rek. Polimery te wywołują kumulację anionów chlorkowych w endosomach, co prowadzi do osmotycznego pęcznienia, pęknięcia endosomu i uwolnienia kompleksu [26]. Jednak PEI jest stosunkowo toksyczna. Inne endosomolityczne polimery, takie jak chitosany, poliamidoaminy, kwasy poliakrylamidowe i polilizynoimidazole mogłyby być interesującą alternatywą [20]. Uważa się, że stosowanie polipleksów w przypadku przeciwnowotworowej terapii genowej (guzy lite) może zwiększać wybiórczość transfekcji ze względu na efekt EPR. Więcej informacji na temat polipleksów można znaleźć w pracach przeglądowych Garnetta [24] i Wagnera i wsp. [66].

Micelle

Micelle są kulistymi cząstkami utworzonymi z kilkudziesięciu do kilkuset cząsteczek amfifilowych, np. cząsteczek kopolimeru blokowego. Micelle tworzą się spontanicznie w wodzie, gdy stężenie podjednostek jest wyższe od krytycznego stężenia micelarnego. Micelle polimerowe cechuje duża stabilność, mogą one zatrzymywać lek przez długi czas [26]. Lek może być niekowalencyjnie zamknięty w micelach lub kowalencyjnie związany z tworzącym je polimerem. Micelle zawierające epirubicynę i doksorubicynę wykazały obiecującą aktywność w badaniach przedklinicznych *in vivo* [5]. Polimerowe micelle zbudowane z kopolimerów PEG i PGA i zawierające związaną doksorubicynę (NK911) wykazały się efektywnością w I fazie badań klinicznych przeprowadzonych w 2004 r. w Japonii. Preparat był dobrze tolerowany, powodował jedynie nieznaczne mdłości i wymioty w dawkach mielosupresyjnych. Autorzy zapowiadali przeprowadzenie II fazy badań klinicznych [34].

Liposomy

Liposomy opisał po raz pierwszy Alec Bangham, są stosowane jako nośniki leków już dłuższy czas [4]. Ich pierwsza generacja miała wiele wad, z których najważniejszą była szybka eliminacja z krążenia przez komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego wątroby i śledziony. Opłaszczanie liposomów polimerami PEG, modyfikując powierzchnię liposomu, zapobiega tej eliminacji, wydłuża biologiczny okres półtrwania preparatu i zwiększa gromadzenie się w tkance guza nowotworowego [55,56]. Liposomy opłaszczone PEG, ze względu na zdolność do ucieczki przed układem siateczkowo-śródbłonkowym, zwane są „niewidzialnymi” (stealth liposomes) [2]. Przykładem takich liposomów jest zarejestrowany preparat DoxilTM/CaelyxTM, zawierający doksorubicynę [20,21,23].

Kolejnym sposobem udoskonalania liposomów jest przyłączanie części odpowiedzialnej za rozpoznanie komórek docelowych. Przykładem złożonego konstruktów, zawierającego zarówno ligand, jak i PEG są liposomy opisane w 2001 r. przez Gabizona i wsp. [23]. Zawierają one jako część rozpoznającą komórki docelowe kwas foliowy i mogą być użyteczne w dostarczaniu leków do komórek nowotworowych ekspresjonujących białko wiążące foliany.

PERSPEKTYWY KLINICZNYCH ZASTOSOWAŃ KONIUGATÓW

Omówione główne typy nośników mają liczne zalety, ale również wady i ograniczenia. Przeciwciała umożliwiają wybiórcze dostarczenie leku, ale jako białka mogą być immuno-

genne, ograniczeniem jest również ilość przyłączonego leku. Liposomy mogą transportować duże ilości leku, ale problemem jest ich stabilność (uwalniają one lek zbyt szybko albo wiążą go zbyt mocno), ponadto mogą być wychwytywane przez układ siateczkowo-śródbłonkowy. Dlatego w ostatnich latach pojawiła się tendencja do projektowania złożonych DDS, łączących zalety i omijających ograniczenia głównych typów DDS [20]. Wspomniany wcześniej układ kwas foliowy-liposomy-PEG jest przykładem takiej strategii [23].

DDS jako całość i koniugaty nośnik-lek są bardzo obiecującymi preparatami z kilku powodów. Po pierwsze, przedkliniczne i kliniczne badania potwierdziły słuszność wcześniej jedynie teoretycznej koncepcji efektu EPR. Transport pasywny może znacząco zwiększyć ilość leku w tkance nowotworowej lub objętej stanem zapalnym. Po drugie, skuteczność wielu nowatorskich czynników terapeutycznych, takich jak białka, peptydy i oligonukleotydy, zależy od nośników, które pozwolą im dotrzeć do tkanki lub komórek docelowych. Po trzecie, DDS mogą obejść ograniczenia niektórych konwencjonalnych leków, takie jak słaba rozpuszczalność, szybki rozpad leku *in vivo*, niekorzystne cechy farmakokinetyczne i in. [3].

Koniugaty oparte na makrocząsteczkach stają się uznanym uzupełnieniem arsenału preparatów przeciwnowotworowych, o czym świadczy kilka dostępnych na rynku koniugatów nośnik-białko i rosnąca liczba badanych klinicznie koniugatów nośnik-lek, z których część może wejść do leczenia w ciągu najbliższych lat [64]. Intensywne badania, rosnące doświadczenie i bardziej zaawansowane technologie stwarzają nadzieję, że badania nad mechanizmami działania, projektowanie DDS i wykorzystanie nowych nośników może doprowadzić do znaczącego postępu na tym polu [20]. Wielką zaletą tych badań są szerokie, wręcz nieograniczone, możliwości konstrukcji DDS, obejmujące wybór nośnika, sposób sprzęgania leku i rodzaj substancji terapeutycznej.

BADANIA W DZIEDZINIE DDS W INSTYTUCIE IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ PAN

Nasz zespół badawczy ma długą historię badań nad DDS. Pierwsze prace nad koniugatami nośnik-lek rozpoczęto w latach 70 ub.w., jeszcze przed nastaniem ery przeciwciał monoklonalnych (Boratynski et al., 4-th European Immunology Meeting, Budapest, 1978). Użyto do tego celu specjalnie zaprogramowanych pochodnych benzochinonu. Związki te, oprócz alkilującego pierścienia aziridynowego zawierały grupy -Cl, -Br, -OMe i mogły w zasadowym środowisku reagować z grupami aminowymi i sulfhydrylowymi białek. Aktywność alkilująca grupy aziridynowej ujawniała się w obniżonym pH charakterystycznym dla endosomów, lizosomów i tkanki nowotworowej. Związki te, pochodne trenimonu sprzęgano z przeciwciałami króliczymi otrzymanymi po immunizacji komórkami L1210 [7,12,13,47].

Niezależnie realizowano badania nad internalizacją i aktywnością przeciwnowotworową koniugatów przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko komórkom białaczki L1210 z cytotoksycznymi łańcuchami rycyny [67] i jemioli [68]. Koniugaty z łańcuchem A rycyny efektywnie eliminowały *ex vivo* komórki L1210V obecne w szpiku [48].

W 1981 r. zgłoszono do opatentowania procedurę otrzymywania koniugatów fibrynogen-metotreksat (patent nr 130458 PL). Koniugaty metotreksatu z fibrynogenem łagodnie hydrolizowanym kwasem mrówkowym istotnie wydłużały czas przeżycia myszy z białaczką P388 w porównaniu z wolnym lekiem. Jednakże koniugaty miały też pewne niekorzystne cechy, dotyczące zarówno właściwości fizycznych (dużą lepkość), jak i toksyczności preparatów. Po kilkuletniej przerwie powrócono do rozpoczętej tematyki udoskonalając procedury otrzymywania koniugatów z metotreksatem i pochodnymi akrydyny [47].

Obecnie nasze badania są skoncentrowane na doskonaleniu metod sprzęgania antymetabolitów kwasu foliowego (metotreksat, tomudeks) z makrocząsteczkami. Do badań wybrano kilka nośników: dekstrany, mannan, albuminę oraz fibrynogen. Właściwości chemiczne dekstranów, ich biodegradowalność, rzadko występująca immunogenność oraz powszechność stosowania w klinice czynią z tych cząsteczek dobrych kandydatów na nośniki [36,38]. Mannan, inny polisacharyd, charakteryzuje się zbliżonymi z dekstranem właściwościami fizykochemicznymi, choć różni się właściwościami biologicznymi [37]. O wyborze fibrynogenu i albuminy zdecydowało wiele przesłanek. Białka te kumulują się w guzach nowotworowych [14,22]. Koniugaty otrzymywane według doskonalonych procedur charakteryzują się obniżoną hydrofobowością i niewielkim posiecieniem między- i wewnątrzcząsteczkowym. Te właściwości sprawiają, że wyłamują się one korzystnie z ograniczeń, które uznają za optymalne preparaty zawierające przyłączoną tylko jedną cząsteczkę MTX na około 70 kDa masy nośnika białkowego (albuminy) [60].

Prowadząc doświadczalną terapię przeciwnowotworową wykazaliśmy, że przeciwnowotworowa aktywność koniugatów dekstran-metotreksat jest skorelowana z masą cząsteczkową nośnika. Dekstran T40 miał najkorzystniejszy stosunek aktywności przeciwnowotworowej do toksyczności i dlatego został wyselekcjonowany do dalszych badań [45]. Natomiast nie wykazaliśmy różnicy w aktywności koniugatów na bazie dekstranów mających różny stopień podstawienia, czyli stosunek molowy leku do nośnika [44]. Wykazano też, że koniugat dekstranowy jest bardziej toksyczny niż wolny lek. Jednakże zastosowanie skojarzonej chemioterapii koniugatem z antydotum metotreksatu leukoworyną pozwalało znacząco obniżyć toksyczność bez widocznego zniesienia korzystnego efektu przeciwnowotworowego. Dodatkowo, koniugat dekstran-metotreksat charakteryzował się zwiększonym działaniem przeciwnowotworowym w porównaniu z lekiem wyjściowym w sche-

macie eksperymentalnej terapii dożylniej (dane nieopublikowane). Otrzymane wyniki otwierają dalsze perspektywy badań nad koniugatami dekstran-metotreksat.

Podany dożylnie koniugat mannan-metotreksat nie wykazał wyższości w porównaniu z metotreksatem. Możliwym wytłumaczeniem jest szybka eliminacja koniugatu z krwiobiegu przez wiązanie z receptorem mannozy w wątrobie i śledzionie. Mimo że mannan jest immunologicznie nieoobojętym polisacharydem, to koniugat podany dootrzewnowo w modelu białaczki P388, sugeruje możliwość jego zastosowania w miejscowej chemioterapii (Budzyńska i wsp., manuskrypt w rewizji).

Fibrynogenowe koniugaty charakteryzowały się w porównaniu z wolnym lekiem lepszą skutecznością przeciwnowotworową [10,30]. Mechanizm tego zjawiska nie jest jeszcze do końca poznany, ale sugerujemy dwa możliwe wytłumaczenia. Pierwsze bazuje na sugerowanym w piśmiennictwie zatrzymaniu fibrynogenu/fibryny oraz jego koniugatów w jamie otrzewnej zwierząt z guzami wysiękowymi. Drugim wytłumaczeniem jest przedłużenie czasu półtrwania leku w organizmie w wyniku sprzężenia z nośnikiem.

W naszym laboratorium opracowano oryginalną metodę otrzymywania koniugatów białek z cukrami, w tym również z oligosacharydami. Metodę nazwaliśmy wysokotemperaturową glikacją białek. W tych na pozór drastycznych warunkach (temperatura do 135°C), liofilizowane białka, w tym przeciwciała i enzymy, zachowują aktywności biologiczne i właściwości fizykochemiczne [8,11,29,61] oraz mogą reagować z haptunami w tym z redukującymi węglowodanami. W pierwszym etapie powstaje zasada Schiffa, która ulegając przegrupowaniu Amadoriego tworzy trwałe wiązanie C-NH-C między redukującym węglem cukru a grupą aminową białka. Takie modyfikowane białka mogą być użytecznymi nośnikami leków. Przyłączenie cukrów do nośnika jest jedną z dróg nadawania cech wybiórczości. Powszechnie znana jest rola receptorów galaktozowych czy mannanowych jako cząsteczek oddziaływujących z neoglikokoniugatami. Neoglikokoniugaty mogą się okazać użytecznymi nośnikami leków, szczepionkami indukującymi odporność przeciw patogenom zawierającym charakterystyczne struktury cukrowe oraz elementami testów diagnostycznych

PODZIĘKOWANIA

Dmitry Nevozhay dziękuje Fundacji Kasy im. Józefa Mianowskiego oraz Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, którym jest stypendystą.

PIŚMIENICTWO

- [1] Albain K.S., Belani C.P., Bonomi P., O'Byrne K.J., Schiller J.H., Socinski M.: PIONEER: a phase III randomized trial of paclitaxel poliglumex versus paclitaxel in chemotherapy-naïve women with advanced-stage non-small-cell lung cancer and performance status of 2. *Clin. Lung Cancer*, 2006; 7: 417-419
- [2] Allen T.M.: Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2: 750-763
- [3] Allen T.M., Cullis P.R.: Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*, 2004; 303: 1818-1822
- [4] Bangham A.D.: Lipid bilayers and biomembranes. *Annu. Rev. Biochem.*, 1972; 41: 753-776
- [5] Batrakova E.V., Dorodnych T.Y., Klinskii E.Y., Kliushnenkova E.N., Shemchukova O.B., Goncharova O.N., Arjakov S.A., Alakhov V.Y., Kabanov A.V.: Anthracycline antibiotics non-covalently incorporated into the block copolymer micelles: *in vivo* evaluation of anti-cancer activity. *Br. J. Cancer*, 1996; 74: 1545-1552
- [6] Bolling C., Graefe T., Lubbing C., Jankevicius F., Uktveris S., Cesas A., Meyer-Moldenhauer W.H., Starkmann H., Weigel M., Burk K., Hanauske A.R.: Phase II study of MTX-HSA in combination with Cisplatin as first line treatment in patients with advanced or metastatic transitional cell carcinoma. *Invest. New Drugs*, 2006; 24: 521-527

- [7] Boratynski J.: Biologiczne właściwości leków przeciwnowotworowych sprzężonych z makromolekularnymi nośnikami. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 1980; 33: 613–624
- [8] Boratynski J.: Dry reaction of proteins with carbohydrates at 120 °C yields neo glycoconjugates. *Biotechnology Techniques*, 1998; 12: 707–710
- [9] Boratynski J.: Chemiczne modyfikacje makrocząstek oraz ich wykorzystanie w wytwarzaniu koniugatów białek z lekami przeciwnowotworowymi, szczepionek i odczynników diagnostycznych. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2000; 54: 17–33
- [10] Boratynski J., Opolski A., Wietrzyk J., Gorski A., Radzikowski C.: Cytotoxic and antitumor effect of fibrinogen-methotrexate conjugate. *Cancer Lett.*, 2000; 148: 189–195
- [11] Boratynski J., Roy R.: High temperature conjugation of proteins with carbohydrates. *Glycoconj. J.*, 1998; 15: 131–138
- [12] Boratynski J., Syper L.: The cytotoxic activity of heterologous anti-L-1210 antibodies conjugated with quinones. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1983; 31: 99–106
- [13] Boratynski J., Żal T.: Colorimetric micromethods for glutaraldehyde determination by means of phenol and sulfuric acid or phenol and perchloric acid. *Anal. Biochem.*, 1990; 184: 259–262
- [14] Brown L.F., Asch B., Harvey V.S., Buchinski B., Dvorak H.F.: Fibrinogen influx and accumulation of cross-linked fibrin in mouse carcinomas. *Cancer Res.*, 1988; 48: 1920–1925
- [15] Burger A.M., Hartung G., Stehle G., Sinn H., Fiebig H.H.: Pre-clinical evaluation of a methotrexate-albumin conjugate (MTX-HSA) in human tumor xenografts *in vivo*. *Int. J. Cancer*, 2001; 92: 718–724
- [16] Caliceti P., Veronese F.M.: Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2003; 55: 1261–1277
- [17] Davis F.F.: The origin of pegnology. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2002; 54: 457–458
- [18] Dipetrillo T., Milas L., Evans D., Akerman P., Ng T., Miner T., Cruff D., Chauhan B., Iannitti D., Harrington D., Safran H.: Paclitaxel polyglumex (PPX-Xyotax) and concurrent radiation for esophageal and gastric cancer: a phase I study. *Am. J. Clin. Oncol.*, 2006; 29: 376–379
- [19] Dreher M.R., Liu W., Michelich C.R., Dewhirst M.W., Yuan F., Chilkoti A.: Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2006; 98: 335–344
- [20] Duncan R.: The dawning era of polymer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2003; 2: 347–360
- [21] Duncan R., Vicent M.J., Greco F., Nicholson R.I.: Polymer-drug conjugates: towards a novel approach for the treatment of endocrine-related cancer. *Endocr. Relat. Cancer*, 2005; 12 (Suppl. 1): S189–S199
- [22] Dvorak H.F., Harvey V.S., McDonagh J.: Quantitation of fibrinogen influx and fibrin deposition and turnover in line 1 and line 10 guinea pig carcinomas. *Cancer Res.*, 1984; 44: 3348–3354
- [23] Gabizon A., Shmeeda H., Horowitz A.T., Zalipsky S.: Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipid-anchored folic acid-PEG conjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2004; 56: 1177–1192
- [24] Garnett M.C.: Gene-delivery systems using cationic polymers. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 1999; 16: 147–207
- [25] Greco F., Vicent M.J., Penning N.A., Nicholson R.I., Duncan R.: HPMA copolymer-aminoglutethimide conjugates inhibit aromatase in MCF-7 cell lines. *J. Drug Target.*, 2005; 13: 459–470
- [26] Haag R., Kratz F.: Polymer therapeutics: concepts and applications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2006; 45: 1198–1215
- [27] Hartung G., Stehle G., Sinn H., Wunder A., Schrenk H.H., Heeger S., Kranzle M., Edler L., Frei E., Fiebig H.H., Heene D.L., Maier-Borst W., Queisser W.: Phase I trial of methotrexate-albumin in a weekly intravenous bolus regimen in cancer patients. Phase I Study Group of the Association for Medical Oncology of the German Cancer Society. *Clin. Cancer Res.*, 1999; 5: 753–759
- [28] Jang S.H., Wientjes M.G., Lu D., Au J.L.: Drug delivery and transport to solid tumors. *Pharm. Res.*, 2003; 20: 1337–1350
- [29] Kanska U., Boratynski J.: Thermal glycation of proteins by D-glucose and D-fructose. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2002; 50: 61–66
- [30] Kanska U., Omar M.S., Budzynska R., Nevozhay D., Jagiello M., Opolski A., Boratynski J.: Antileukemic activity of glycated fibrinogen-methotrexate conjugates. *Anticancer Res.*, 2005; 25: 2229–2234
- [31] Konieczny L., Piekarska B., Roterman I., Rybarska J., Stopa B., Zemanek G.: Przewidywania i nośniki leków w terapii celowanej – początek i ograniczenia. *Biotechnologia*, 2001; 3: 37–52
- [32] Larsen C.: Dextran prodrugs – structure and stability in relation to therapeutic activity. *Adv. Drug Del. Rev.*, 1989; 3: 103–154
- [33] Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., Hori K.: Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Control. Release*, 2000; 65: 271–284
- [34] Matsumura Y., Hamaguchi T., Ura T., Muro K., Yamada Y., Shimada Y., Shirao K., Okusaka T., Ueno H., Ikeda M., Watanabe N.: Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of NK911, a micelle-encapsulated doxorubicin. *Br. J. Cancer*, 2004; 91: 1775–1781
- [35] Meerum Terwogt J.M., ten Bokkel Huinink W.W., Schellens J.H., Schot M., Mandjes I.A., Zurlo M.G., Rocchetti M., Rosing H., Koopman F.J., Beijnen J.H.: Phase I clinical and pharmacokinetic study of PNU166945, a novel water-soluble polymer-conjugated prodrug of paclitaxel. *Anticancer Drugs*, 2001; 12: 315–323
- [36] Mehvar R.: Dextran for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. *J. Control. Release*, 2000; 69: 1–25
- [37] Mehvar R.: Recent trends in the use of polysaccharides for improved delivery of therapeutic agents: pharmacokinetic and pharmacodynamic perspectives. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2003; 4: 283–302
- [38] Mehvar R., Shepard T.L.: Molecular-weight-dependent pharmacokinetics of fluorescein-labeled dextrans in rats. *J. Pharm. Sci.*, 1992; 81: 908–912
- [39] Nagy J.A., Herzberg K.T., Dvorak J.M., Dvorak H.F.: Pathogenesis of malignant ascites formation: initiating events that lead to fluid accumulation. *Cancer Res.*, 1993; 53: 2631–2643
- [40] Nagy J.A., Herzberg K.T., Masse E.M., Zientara G.P., Dvorak H.F.: Exchange of macromolecules between plasma and peritoneal cavity in ascites tumor-bearing, normal, and serotonin-injected mice. *Cancer Res.*, 1989; 49: 5448–5458
- [41] Nagy J.A., Masse E.M., Herzberg K.T., Meyers M.S., Yeo K.T., Yeo T.K., Sioussat T.M., Dvorak H.F.: Pathogenesis of ascites tumor growth: vascular permeability factor, vascular hyperpermeability, and ascites fluid accumulation. *Cancer Res.*, 1995; 55: 360–368
- [42] Nagy J.A., Meyers M.S., Masse E.M., Herzberg K.T., Dvorak H.F.: Pathogenesis of ascites tumor growth: fibrinogen influx and fibrin accumulation in tissues lining the peritoneal cavity. *Cancer Res.*, 1995; 55: 369–375
- [43] Nagy J.A., Morgan E.S., Herzberg K.T., Manseau E.J., Dvorak A.M., Dvorak H.F.: Pathogenesis of ascites tumor growth: angiogenesis, vascular remodeling, and stroma formation in the peritoneal lining. *Cancer Res.*, 1995; 55: 376–385
- [44] Nevozhay D., Budzynska R., Jagiello M., Kanska U., Omar M.S., Opolski A., Wietrzyk J., Boratynski J.: The effect of the substitution level of some dextran-methotrexate conjugates on their antitumor activity in experimental cancer models. *Anticancer Res.*, 2006; 26: 2179–2186
- [45] Nevozhay D., Budzynska R., Kanska U., Jagiello M., Omar M.S., Boratynski J., Opolski A.: Antitumor properties and toxicity of dextran-methotrexate conjugates are dependent on the molecular weight of the carrier. *Anticancer Res.*, 2006; 26: 1135–1143
- [46] Palade G.E., Simionescu M., Simionescu N.: Structural aspects of the permeability of the microvascular endothelium. *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, 1979; 463: 11–32
- [47] Paprocka M., Boratynski J., Dus D., Kusnierczyk H., Radzikowski C.: Conjugation of the monoclonal antibody 17-1A with the nitroacridine compound C921 with the poly-L-lysine as an intermediate agent. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1997; 45: 343–349
- [48] Paprocka M., Wiedlocha A., Radzikowski C.: Mouse L1210V leukemia as a model to analyse efficiency of leukemic cell elimination by immunotoxin, antibody and complement, and cytostatic agents. *In Vivo*, 1990; 4: 209–213
- [49] Pluta J., Karolewicz B.: New possibilities of application of multifunctional polymers and polymer conjugates. *Acta Pol. Pharm.*, 2003; 60: 211–214
- [50] Posey J.A. III, Saif M.W., Carlisle R., Goetz A., Rizzo J., Stevenson S., Rudoltz M.S., Kwiatek J., Simmons P., Rowinsky E.K., Takimoto C.H., Tolcher A.W.: Phase I study of weekly polyethylene glycol-campothecin in patients with advanced solid tumors and lymphomas. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 7866–7871
- [51] Rademaker-Lakhai J.M., Terret C., Howell S.B., Baud C.M., De Boer R.F., Pluim D., Beijnen J.H., Schellens J.H., Droz J.P.: A Phase I and pharmacological study of the platinum polymer AP5280 given as an intravenous infusion once every 3 weeks in patients with solid tumors. *Clin. Cancer Res.*, 2004; 10: 3386–3395
- [52] Ringsdorf H.: Structure and properties of pharmacologically active polymers. *J. Polym. Sci. Symp.*, 1975; 51: 135–153

- [53] Rowinsky E.K., Rizzo J., Ochoa L., Takimoto C.H., Forouzes B., Schwartz G., Hammond L.A., Patnaik A., Kwiatek J., Goetz A., Denis L., McGuire J., Tolcher A.W.: A phase I and pharmacokinetic study of pegylated camptothecin as a 1-hour infusion every 3 weeks in patients with advanced solid malignancies. *J. Clin. Oncol.*, 2003; 21: 148–157
- [54] Sabbatini P., Aghajanian C., Dizon D., Anderson S., Dupont J., Brown J.V., Peters W.A., Jacobs A., Mehdi A., Rivkin S., Eisenfeld A.J., Spriggs D.: Phase II study of CT-2103 in patients with recurrent epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 2004; 22: 4523–4531
- [55] Sadzuka Y., Kishi K., Hirota S., Sonobe T.: Effect of polyethyleneglycol (PEG) chain on cell uptake of PEG-modified liposomes. *J. Liposome Res.*, 2003; 13: 157–172
- [56] Sadzuka Y., Sugiyama I., Tsuruda T., Sonobe T.: Characterization and cytotoxicity of mixed polyethyleneglycol modified liposomes containing doxorubicin. *Int. J. Pharm.*, 2006; 312: 83–89
- [57] Satchi-Fainaro R., Puder M., Davies J.W., Tran H.T., Sampson D.A., Greene A.K., Corfas G., Folkman J.: Targeting angiogenesis with a conjugate of HEMA copolymer and TNP-470. *Nat. Med.*, 2004; 10: 255–261
- [58] Schoemaker N.E., van Kesteren C., Rosing H., Jansen S., Swart M., Lieverst J., Fraier D., Breda M., Pellizzoni C., Spinelli R., Grazia Porro M., Beijnen J.H., Schellens J.H., ten Bokkel Huinink W.W.: A phase I and pharmacokinetic study of MAG-CPT, a water-soluble polymer conjugate of camptothecin. *Br. J. Cancer*, 2002; 87: 608–614
- [59] Seymour L.W., Ferry D.R., Anderson D., Hesslewood S., Julyan P.J., Poyner R., Doran J., Young A.M., Burtles S., Kerr D.J., Cancer Research Campaign Phase I/II Clinical Trials Committee: Hepatic drug targeting: phase I evaluation of polymer-bound doxorubicin. *J. Clin. Oncol.*, 2002; 20: 1668–1676
- [60] Stehle G., Sinn H., Wunder A., Schrenk H.H., Schutt S., Maier-Borst W., Heene D.L.: The loading rate determines tumor targeting properties of methotrexate-albumin conjugates in rats. *Anticancer Drugs*, 1997; 8: 677–685
- [61] Szymanska U., Boratynski J.: Glikacja białek – aspekty kliniczne i chemiczne. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 1999; 53: 689–703
- [62] Takakura Y., Hashida M.: Macromolecular carrier systems for targeted drug delivery: pharmacokinetic considerations on biodistribution. *Pharm. Res.*, 1996; 13: 820–831
- [63] Vasey P.A., Kaye S.B., Morrison R., Twelves C., Wilson P., Duncan R., Thomson A.H., Murray L.S., Hilditch T.E., Murray T., Burtles S., Fraier D., Frigerio E., Cassidy J.: Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer doxorubicin]: first member of a new class of chemotherapeutic agents-drug-polymer conjugates. *Cancer Research Campaign Phase I/II Committee. Clin. Cancer Res.*, 1999; 5: 83–94
- [64] Vicent M.J., Duncan R.: Polymer conjugates: nanosized medicines for treating cancer. *Trends Biotechnol.*, 2006; 24: 39–47
- [65] Vicent M.J., Greco F., Nicholson R.I., Paul A., Griffiths P.C., Duncan R.: Polymer therapeutics designed for a combination therapy of hormone-dependent cancer. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2005; 44: 4061–4066
- [66] Wagner E., Culmsee C., Boeckle S.: Targeting of polyplexes: toward synthetic virus vector systems. *Adv. Genet.*, 2005; 53: 333–354
- [67] Wiedlocha A., Salwa J., Paprocka M., Steuden I., Radzikowski C.: Specific killing of mouse leukemic cells with ricin A-chain immunotoxin. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1989; 37: 101–113
- [68] Wiedlocha A., Sandvig K., Walzel H., Radzikowski C., Olsnes S.: Internalization and action of an immunotoxin containing mistletoe lectin A-chain. *Cancer Res.*, 1991; 51: 916–920
- [69] Wunder A., Stehle G., Schrenk H.H., Hartung G., Heene D.L., Maier-Borst W., Sinn H.: Antitumor activity of methotrexate-albumin conjugates in rats bearing a Walker-256 carcinoma. *Int. J. Cancer*, 1998; 76: 884–890
- [70] Yuan F., Dellian M., Fukumura D., Leunig M., Berk D.A., Torchilin V.P., Jain R.K.: Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res.*, 1995; 55: 3752–3756