

Unaprjeđenje antitumorske terapije primjenom nanotehnološkoga pristupa

Poljanšek, Ivana

Professional thesis / Završni specijalistički

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:644162>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ivana Poljanšek

**UNAPRJEĐENJE ANTITUMORSKE TERAPIJE PRIMJENOM
NANOTEHNOLOŠKOGA PRISTUPA**

Specijalistički rad

Zagreb, 2016.

Poslijediplomski specijalistički studij Razvoj lijekova

Mentor rada: Izv. prof. dr. sc. Jasmina Lovrić

Specijalistički rad obranjen je dana 14.07.2016. godine u predavaonici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Domagojeva 2, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Doc. dr. sc. Ivan Pepić
Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
2. Izv. prof. dr. sc. Jasmina Lovrić
Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
3. Dr. sc. Marijana Dürriegl, znan. sur.

Rad ima 90 listova.

Ovaj specijalistički rad izrađen je u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Jasmine Lovrić.

Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Jamini Lovrić na savjetima i pomoći tijekom izrade ovog rada. Zahvaljujem se Agenciji za lijekove i medicinske proizvode i mojim kolegama koji su me potaknuli na novi izazov u životu. Ujedno zahvaljujem svojoj obitelji na velikoj podršci i razumijevanju tijekom studija.

SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA

Unaprjeđenje antitumorske terapije primjenom nanotehnološkoga pristupa temelji se na poboljšanju farmakokinetičkih svojstava (produljeno zadržavanje lijeka u cirkulaciji te poboljšana raspodjela u ciljno tkivo), topljivosti antitumorskih lijekova i njihove stabilnosti u biološkom okruženju. Cilj ovog specijalističkog rada bio je analizirati razvoj antitumorskih nanofarmaceutika s naglaskom na procjenu uspješnosti transfera dosadašnjih postignuća u kliničko okruženje. S obzirom da su konjugati lijeka, liposomi, polimerne micelle i nanočestice komercijalno najuspješnije tehnologije u oblikovanju antitumorskih nanofarmaceutika, posebno su opisani nanofarmaceutici koji su izrađeni tim nanotehnološkim pristupima.

MATERIJAL I METODE

Literatura je pretražena prema temi istraživanja, predmetu istraživanja, autorima i časopisu. Pretražene su bibliografska baza podataka (PubMed) i baza podataka s cjelovitim tekstom (Science Direct). Pri proučavanju relevantnih članaka izdvojeni su najvažniji rezultati, rasprave i zaključci koji su prikazani ovim specijalističkim radom. Postupci odobravanja i terapijska primjena antitumorskih nanofarmaceutika analizirani su korištenjem raspoloživih baza lijekova Agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED), Europske agencije za lijekove (EMA) i Američke agencije za hranu i lijekove (FDA).

REZULTATI

Uspješnost antitumorskih nanofarmaceutika, pri intravenskoj primjeni što je najčešći put primjene, ovisi o više čimbenika uključujući (i) izbjegavanje brze eliminacije nanosustava putem bubrega te mononuklearno fagocitnog sustava; (ii) ekstravazaciju nanosustava kroz propusne krvne žile tumora; (iii) penetraciju do tumorskih stanica kroz gusto vezivno tkivo tumora; (iv) zadržavanje

u tumorskom tkivu; (v) oslobađanje djelatne tvari kako bi se postigao farmakološki učinak. Fizičko-kemijska svojstva nanosustava određuju farmakokinetiku lijeka te njegovu bioraspoloživost u tumoru.

ZAKLJUČAK

Razlozi neuspješnom kliničkom transferu nanofarmaceutika kriju se u nerazumijevanju bioloških barijera, usredotočenosti na razvoj sve složenijih nanofarmaceutika zanemarujući teškoće u svladavanju bioloških barijera ili nemogućnosti prevođenja izrade iz laboratorijskog u industrijsko mjerilo. Kritična je i uporaba neodgovarajućih animalnih modela u pretkliničkim ispitivanjima. Partnerstvo i razmjena znanja akademske zajednice, industrije i regulatornih tijela nužni su da se osigura dostupnost antitumorskih nanofarmaceutika bolesnicima. Potencijalne terapijske prednosti nanofarmaceutika mogu se ostvariti samo ako su takvi proizvodi dostupni i komercijalno održivi. Stoga regulatorni zahtjevi moraju biti dovoljno strogi da osiguraju sigurnost i kakvoću nanofarmaceutika, ali se također mora uzeti u obzir i potencijalni negativni utjecaj prekomjerne regulacije na uvođenje inovativnih lijekova na tržište.

S U M M A R Y

OBJECTIVES

The improvement of anticancer therapy using the nanotechnological approach is based on improving the pharmacokinetic properties (prolonged stay of the drug in the circulation and improved distribution in the target tissue), the solubility of the anticancer drugs and their stability in a biological environment. The objective of this thesis is to analyse the development of anticancer nanotherapeutics with the emphasis on evaluation of their transfer into clinical settings. As the liposomes, polymeric micelles, nanoparticles and drug-polymer conjugates are commercially the most successful nanotechnologies, the anticancer nanotherapeutics manufactured by the respective nanotechnological approach are described in this work.

MATERIAL AND METHODS

The literature is searched by the research topic, research subject, authors and journal. The bibliographical database (PubMed) and the database with full text (Science Direct) were researched. In the review of relevant articles, the most important results, discussion and conclusions were selected and presented in this thesis. The approval procedures and the therapeutic use of anticancer nanotherapeutics were analysed using the existing medicinal product databases of the Agency for the medicinal products and medical devices (HALMED), European Medicines Agency (EMA), US Food and Drug Administration (FDA). The details of specific medicinal products were obtained from the European public assessment reports, Summaries of product characteristics, scientific discussions and web sites of medicinal product manufacturers.

RESULTS

The effectiveness of anticancer nanotherapeutics is impacted by multiple factors: (i) nanosystems must evade clearance by renal filtration and the reticuloendothelial system, (ii) extravasate through

the enlarged endothelial gaps in tumors, (iii) penetrate through dense stroma in the tumor microenvironment to reach the tumor cells, (iv) remain in the tumor tissue for a prolonged period of time, and (iv) finally release the active agent to induce pharmacological effect. The nanosystem physicochemical properties determine the pharmacokinetics and drug bioavailability in the tumor.

CONCLUSION

The unsuccessful clinical transfer of nanopharmaceuticals is due to the poor understanding of biological barriers, focus on development more complex nanopharmaceuticals while forgetting difficulties of overcoming biological barriers or scale-up by the pharmaceutical industry. The use of inadequate animal models in preclinical trials is also critical. The partnership and knowledge exchange between academia, industry, and regulatory agencies is crucial to make anticancer nanopharmaceuticals available to patients. The potential health benefits of nanopharmaceutical products can be realized only if such products are available and commercially viable. Therefore, the regulatory requirements must be sufficiently rigid to ensure the safety and quality of nanopharmaceuticals, but the potential negative impact of over-regulation on the introduction of innovative products to the market must also be considered.

Sadržaj

1.	UVOD	1
1.1.	Nanotehnološki pristup antitumorskoj terapiji.....	3
1.2.	Najuspješnije tehnologije u oblikovanju antitumorskih nanofarmaceutika	5
1.2.1.	Konjugati lijeka	6
1.2.2.	Liposomi	10
1.2.3.	Polimerne micele.....	10
1.2.4.	Polimerne nanočestice	11
1.3.	Istraživanje i razvoj novih antitumorskih nanofarmaceutika	13
1.4.	Postupci davanja odobrenja za stavljanje lijeka u promet u Europskoj uniji	16
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA	20
3.	MATERIJAL I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI	21
3.1.	Načela razvoja antitumorskih nanofarmaceutika	22
3.1.1.	Pasivna ciljana dostava antitumorskih lijekova	23
3.1.1.1.	Barijere pri intravenskoj primjeni antitumorskih nanofarmaceutika.....	24
3.1.1.2.	Antitumorski nanofarmaceutici u kliničkoj primjeni i ispitivanjima.....	27
3.1.1.2.1	Nanofarmaceutici doksorubicina	27
3.1.1.2.2	Nanofarmaceutici daunorubicina.....	33
3.1.1.2.3	Nanofarmaceutici citarabina	34
3.1.1.2.4	Nanofarmaceutici mifamurtida	35
3.1.1.2.5	Nanofarmaceutici paklitaksela	37
3.1.1.2.6	Nanofarmaceutici cisplatina.....	42
3.1.1.3.	(Ne)uspješnost kliničkog transfera antitumorskih nanofarmaceutika.....	44
3.1.1.4.	Animalni modeli u istraživanju EPR učinka.....	48
3.1.2.	Aktivna ciljana dostava antitumorskih lijekova	51
3.1.2.1.	Aktivna ciljana dostava u endotelne stanice	54
3.1.3.	Oslobađanje lijeka iz terapijskog nanosustava ovisno o određenom podražaju	56
3.1.4.	Poboljšanje topljivosti slabo topljivih lijekova nanotehnološkim pristupom.....	57
3.1.5.	Poboljšanje stabilnosti antitumorskih lijekova nanotehnološkim pristupom	58
3.2.	Antitumorski nanofarmaceutici u liječenju metastatskih tumora	59
3.3.	Racionalni pristup razvoju antitumorskih nanofarmaceutika	61

4.	RASPRAVA.....	65
5.	ZAKLJUČAK.....	73
6.	LITERATURA.....	74
7.	ŽIVOTOPIS.....	80

1. UVOD

Maligni ili zloćudni tumor je bolest u kojoj dolazi do nekontrolirane diobe zloćudno preobraženih stanica vlastitog organizma i njihovog širenja organizmom (1). Tumorske stanice pokazuju četiri značajke po kojima se razlikuju od normalnih stanica, a to su nekontrolirana proliferacija, dediferencijacija i gubitak funkcije, invazivnost i metastaziranje. Normalna stanica prelazi u tumorsku stanicu zbog jedne ili više mutacija u vlastitoj DNA. Razvoj zloćudnog tumora je složeni višefazni proces koji obuhvaća ne samo više genetskih promjena, nego i druge epigenetske čimbenike. Tri su glavna pristupa liječenju dijagnosticiranog zloćudnog tumora, a uključuju kirurški zahvat, radioterapiju i kemoterapiju. Pristup liječenju ovisi o tipu tumora i njegovu razvoju. Kemoterapija se može primijeniti kao jedina terapijska mogućnost, ili čini pomoćnu metodu drugim oblicima liječenja.

Većina današnjih antitumorskih lijekova su citotoksični lijekovi koji imaju antiproliferativni učinak. Budući da oni uglavnom djeluju na staničnu diobu, oštećenje će i sva normalna tkiva koja su u brzom diobenom ciklusu. Stoga, ti lijekovi izazivaju u manjoj ili većoj mjeri opće toksične učinke koji uključuju toksično djelovanje na koštanu srž, oštećenje cijeljenje rana, gubitak dlaka (alopecija), oštećenje epitela probavnog sustava, zaostanak djece u rastu, sterilitet i teratogenost. Tijekom prošlih nekoliko desetljeća značajno je unaprijeđeno razumijevanje patofiziologije tumora što je rezultiralo boljim dijagnostičkim metodama i pristupima liječenju. Razvijena je nova generacija antitumorskih lijekova u koje se primjerice ubrajaju inhibitori receptora čimbenika rasta kao što je lijek Herceptin, inhibitori proteosoma kao što je lijek Velcade, inhibitori histon deacetilaze kao što je lijek Vorinostat te lijekovi s antiangiogenim učinkom kao što je lijek Avastin (2). Ipak, unatoč značajnom napretku, ukupna smrtnost uzrokovana tumorima je i dalje vrlo visoka. Jedan od razloga velike smrtnosti bolesnika oboljelih od tumorskih bolesti je i nemogućnost selektivne dostave

antitumorskih lijekova u tumorsko tkivo. Problem također predstavlja i pojava otpornosti odnosno rezistencije tumorskih stanica na djelovanje antitumorskih lijekova te posljedični recidiv bolesti.

Nove generacije antitumorskih lijekova, poput i onih prethodnih, ne posjeduju optimalna farmakokinetička svojstva (2). Mala molekulska masa većine antitumorskih lijekova razlog je njihovog brzog izlučivanja iz sistemske cirkulacije npr. putem renalne filtracije, a također je nedostatno i njihovo nakupljanje u samim tumorima i tumorskim stanicama. Osim toga, zbog male molekulske mase i općenito velike lipofilnosti, molekule antitumorskih lijekova često imaju veliki volumen raspodjele, odnosno dolazi do nespecifične raspodjele lijeka u organizmu, a time i do posljedične toksičnosti u zdravim tkivima.

Nanotehnologija može značajno pridonijeti razvoju antitumorskih lijekova s unaprijeđenom terapijskom i komercijalnom vrijednošću. Uklapanjem antitumorskih lijekova u odgovarajuće terapijske nanosustave mogu se optimirati biofarmaceutska i farmakokinetička svojstva lijeka, a time povećati djelotvornosti i/ili sigurnosti već poznatih, ali i novih molekula, kandidata za antitumorske lijekove. Stoga je posljednjih 20-tak godina istraživanje i razvoj antitumorskih nanofarmaceutika doživjelo eksponencijalni rast (3). Također se znatno ubrzao tempo kojim farmaceutske tvrtke stvaraju partnerstva u cilju korištenja nanotehnologije tijekom razvoja lijekova. Od vremena komercijalizacije prve generacije antitumorskih nanofarmaceutika, uključujući Doxil® (doksorubicin uklopljen u liposome) i Abraxane® (formulacija paklitaksela vezanog na albuminske nanočestice) unaprijeđeno je razumijevanje pasivne i aktivne ciljne dostave antitumorskih lijekova (4, 5). Objavljeni su mnogobrojni radovi o istraživanjima koja koriste pretkliničke modele i pokazuju superiornost nanofarmaceutika u odnosu na trenutno dostupne antitumorske lijekove. Međutim, još uvijek iznenađuje činjenica oskudnog transfera ispitivanih nanofarmaceutika u kliničko okruženje (6). Početkom 2009. godine Europska Komisija, zajedno s Europskom tehnološkom platformom za nanolijekove (engl. *European Technology Platform for Nanomedicine*, ETPN), predložila je da aktivnosti vezane za istraživanje i razvoj nanofarmaceutika trebaju biti snažno usmjerene na mogućnosti prijenosa objekta istraživanja iz istraživačkih laboratorija u kliničku primjenu (6). Taj cilj

je posebno važan u svjetlu nedavnog smanjenja javnih sredstava i rezultat je potrebe za javnim/privatnim financiranjem istraživanja.

Nadalje, potencijalne zdravstvene prednosti nanofarmaceutika mogu se ostvariti samo ako su takvi proizvodi dostupni i komercijalno održivi. Stoga regulatorni zahtjevi moraju biti dovoljno strogi da osiguraju sigurnost i kakvoću nanofarmaceutika, ali se također mora uzeti u obzir i potencijalni negativni utjecaj prekomjerne regulacije pri odobravanju inovativnih lijekova (7). Antitumorski nanofarmaceutici su trenutno regulirani konvencionalnim regulatornim okvirom. Međutim, dodatna stručna ocjena je potrebna kako bi se potvrdila kakvoća, sigurnost i djelotvornost nanofarmaceutika.

1.1. Nanotehnološki pristup antitumorskoj terapiji

Nanotehnologija se može definirati kao znanost i inženjerstvo koji se bave dizajnom, sintezom, karakterizacijom i primjenom materijala čija je najmanja funkcionalna jedinica barem po jednoj dimenziji nanometarske veličine (10^{-9} m). Nanomedicina obuhvaća primjenu nanotehnologije s ciljem unaprijeđenja dijagnosticiranja, prevencije i liječenja oboljenja (7), a nanofarmacija obuhvaća istraživanje i razvoj lijekova koji se temelje na sustavima nanometarskih dimenzija (terapijski nanosustavi). Cilj nanofarmacije je poboljšati farmakokinetiku te umanjiti sistemske neželjene učinke lijeka kako bi se postigla maksimalna učinkovitost lijeka s minimalnim nuspojavama. Najvažniji parametri koje je potrebno razmatrati u rješavanju takvih problema su lijekoviti oblik i način primjene lijeka te barijere koje lijek mora savladati na putu do mjesta farmakološkog učinka.

Povećanje učinkovitosti i sigurnosti antitumorske terapije povezano je s mogućnošću selektivnog ciljanja oboljelog tkiva, prevladavanja bioloških barijera te „inteligentnog odgovora“ na mikrookolinu tumora kako bi se antitumorski lijek dostavio na mjesto učinka. Primjena

nanotehnologije u oblikovanju antitumorskih lijekova ima značajan potencijal u ostvarivanju navedenih ciljeva (3, 8, 9). Unaprjeđenje antitumorske terapije primjenom nanotehnološkoga pristupa temelji se na poboljšanju farmakokinetičkih svojstava (produljeno zadržavanje lijeka u cirkulaciji te poboljšana raspodjela u ciljno tkivo), topljivosti antitumorskih lijekova i njihove stabilnosti u biološkom okruženju (3, 10). Režim liječenja koji uključuje kombinaciju antitumorskih lijekova (kombinacijsko liječenje) često se primjenjuje u onkologiji. Nanotehnologija i u tom području može biti vrlo korisna, primjerice uklapanjem više djelatnih tvari u jedan terapijski nanosustav u cilju postizanja sinergističkog djelovanja i poboljšanja ishoda liječenja, a uz smanjenje rizika od razvoja rezistencije (3). Tijekom zasebne primjene više lijekova, zbog razlike u njihovim farmakokinetičkim i farmakodinamičkim svojstvima nije izvjesno da će ciljne stanice ili tkiva istodobno biti izloženi optimalnim koncentracijama svakog pojedinog lijeka. Suprotno tome, uklapanjem više djelatnih tvari u jedinstveni nanometarski nosač, moguća je bolja kontrola prostorno-vremenske izloženosti svakom pojedinom lijeku te postizanje sinergističkog djelovanja (11, 12). Valja napomenuti da je i dalje vrlo velik izazov odrediti optimalne terapijske kombinacije djelatnih tvari namijenjenih uklapanju u terapijske nanosustave. Omjere djelatnih tvari potrebno je odrediti a priori, tijekom razvoja, a velika različitost mogućih režima liječenja dodatno otežava odabir idealne kombinacije. Pripravci za kombinacijsko liječenje moraju biti dizajnirani na način da izloženost tumora jednoj djelatnoj tvari ne utječe negativno na djelotvornost druge. Nanotehnologijom je moguće postići i nezavisno oslobađanje djelatnih tvari iz nanosustava no redoslijed oslobađanja se mora posebno uzeti u obzir kako bi se postigao terapijski sinergizam. Za uspješan razvoj i komercijalizaciju nanofarmaceutika za kombinacijsko liječenje potrebno je osmisliti i dovoljno robusne procese proizvodnje i kontrole takvih kompleksnih pripravaka.

Jedna od prednosti antitumorskih nanofarmaceutika nad konvencionalnim liječenjem je i mogućnost prevladavanja višestruke rezistencije odnosno otpornosti na antitumorske lijekove (eng. *Multi Drug Resistance*; MDR) (13). Neki tumori nisu osjetljivi na standardnu kemoterapiju od početka liječenja, što se definira kao primarna rezistencija, dok su drugi u početku osjetljivi, ali s

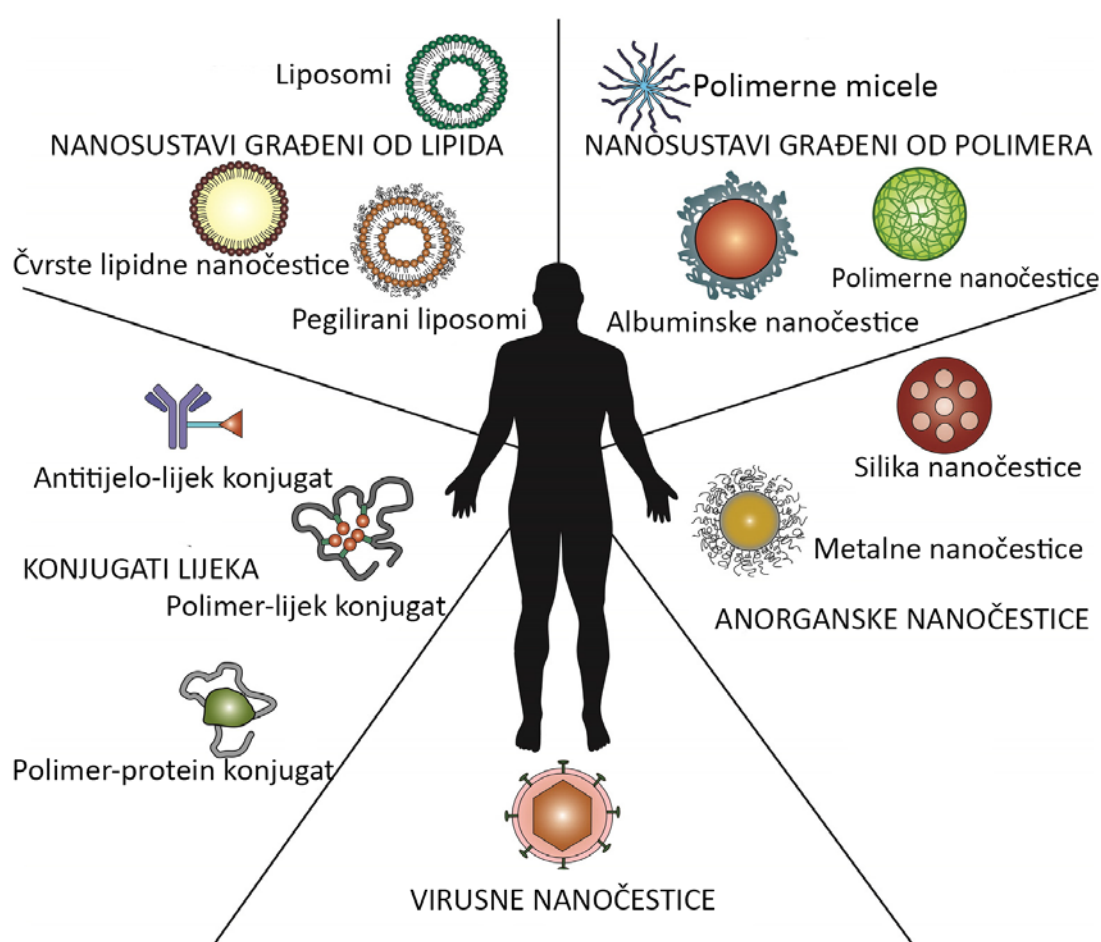
vremenom razviju tzv. stečenu rezistenciju. Stečena rezistencija može biti rezultat prilagodbe tumorskih stanica ili njihove mutacije. Rezistencija je u najvećem dijelu uzrokovana pojačanom aktivnošću efluksnih sustava stanične membrane, kao što je P-glikoprotein (P-gp) koji pripada porodici ABC (od eng. *adenosine triphosphate-binding cassette*) transportnih proteina. Istoj porodici pripadaju i proteini povezani s MDR kao i proteini rezistencije raka dojke. Obećavajući rezultati do sad su prikupljeni u *in vitro* ispitivanjima i ispitivanjima na animalnim modelima (14). Primjerice, uklapanjem paklitaksela u nanočestice postignut je bolji citotoksični učinak *in vitro* naspram stanica rezistentnih na paklitaksel (HCT-15 stanična linija) (15). Također je potvrđena veća uspješnost liječenja tumora uklapanjem lijeka u nanočestice u usporedbi s lijekom Taxol® u životnija s HCT-15 ksenograftom. Taj učinak se može pripisati poboljšanom unosu paklitaksela u tumorske stanice posredovanom nanočesticama bez aktiviranja P-gp efluksnog sustava (15).

Većina antitumorskih lijekova je slabo topljiva u vodi što značajno otežava njihovu primjenu. Primjerice, pri intravenskoj primjeni može doći do taloženja lijeka te pojave toksičnosti na mjestu primjene. Oralna primjena je ograničena niskom bioraspoloživošću, a što može biti posljedica nepotpunog oslobađanja djelatne tvari iz ljekovitog oblika te nedostatne topljivosti u probavnim sokovima. Također je povećana mogućnost utjecaja hrane na apsorpciju lijeka te je veća varijabilnost u apsorpciji među bolesnicima. Problem slabe topljivosti antitumorskih lijekova se također nastoji prevladati uklapanjem u odgovarajuće terapijske nanosustave (16). U tom smislu uspjeh su pokazale formulacije paklitaksela za intravensku primjenu, u kojima je paklitaksel vezan na nanočestice albumina (Abraxane®) ili uklopljen u polimerne micelle (Genexol®-PM) (13)(12).

1.2. Najuspješnije tehnologije u oblikovanju antitumorskih nanofarmaceutika

Antitumorski nanofarmaceutici obuhvaćaju lijekove koje se sastoje od terapijskog entiteta poput malih molekula, peptida, proteina i nukleinskih kiselina te komponenti poput lipida i

polimera, a potonji zajedno s navedenim terapijskim dijelom formiraju terapijske nanosustave (8). Terapijski nanosustavi koji se istražuju ili već koriste u liječenju i dijagnostici uključuju konjugate lijeka, liposome, polimerne nanočestice, polimerne micle, čvrste lipidne nanočestice, metalne nanočestice i nanočestice metalnih oksida (7). S obzirom da su konjugati lijeka, liposomi, polimerne micle i nanočestice komercijalno najuspješnije tehnologije u oblikovanju antitumorskih nanofarmaceutika, posebno je potrebno naglasiti i opisati nanofarmaceutike koji su izrađeni takvim nanotehnološkim pristupima.



Slika 1. Shematski prikaz različitih nanotehnoloških platformi za dostavu lijekova (preuzeto i prilagođeno iz reference (17)).

1.2.1. Konjugati lijeka

Konjugati lijeka svrstavaju se u nanofarmaceutike zbog njihove veličine u nanometarskom području (5-10 nm), a obuhvaćaju konjugate proteina i polimera te konjugate malih molekula i

polimera ili antitijela (17). Vezanjem polimera na malu molekulu ili protein može se smanjiti klirens lijeka, poboljšati stabilnost i smanjiti imunogeničnost lijeka. Polimer izbora je najčešće hidrofilni polimer polietilenglikol (PEG). Učinkovitost i sigurnost lijeka ovisi o molekulskoj masi, polidisperznosti i arhitekturi polimera. Odobreni antitumorski lijekovi iz ove skupine na području EU prikazani su u Tablici 1. Djelatna tvar lijeka Oncaspar kovalentni je konjugat L-asparaginaze dobivene iz bakterije *Escherichia coli* s monometoksiopropilenglikolom (18). Oncaspar je indiciran u liječenju akutne limfoblastične leukemije. Pri intramuskularnoj primjeni pegilirane L-asparaginaze (2500 U/m² površine tijela) ili nativne asparaginaze iz bakterije *E. coli* (25000 U/m² površine tijela) ili bakterije roda *Erwinia* (25000 U/m² površine tijela), vrijeme polueliminacije pegilirane L-asparaginaze statistički je značajno dulje (5,7 dana) od vremena polueliminacije nativnih asparaginaza iz *E. coli* (1,3 dana) i roda *Erwinia* (0,65 dana). Neposredna stanična smrt leukemijskih stanica in vivo, bila je ista za sva tri pripravka koji sadrže L-asparaginu. Konjugacijom lijeka i polimera omogućeno je značajno smanjenje učestalosti doziranja što zbog invazivnosti primjene značajno poboljšava suradljivost bolesnika. Trenutno je više od 15 konjugata lijeka i polimera u kliničkim ispitivanjima (17).

Vezanjem djelatne tvari na antitijelo postiže se ciljana dostava u tumorske stanice. Odobrena su dva antitumorska lijeka iz te skupine (Tablica 1). Adcetris® je konjugat monoklonskog antitijela protiv CD30 (brentuksimab) i antimikrotubularne tvari monometil auristatin E (vendotin) (19). Vezanjem za brentuksimab djelovanje vendotina se selektivno usmjerava na stanice karcinoma koje eksprimiraju CD30 protein što znatno njegovu smanjuje toksičnost, a u isto vrijeme zadržava učinkovitost u liječenju bolesnika s Hodgkinovim limfomom (17). Djelatna tvar lijeka Kadcyla je konjugat antitijela trastuzumab i inhibitora mikrotubula emtanzina (20). Trastuzumab je humanizirano IgG1 monoklonsko antitijelo (liječ Herceptin) indicirano u liječenju odraslih bolesnika s HER2 pozitivnim metastatskim rakom dojke. Konjugacija s emtanzinom značajno povećava antitumorsku aktivnost trastuzumaba.

Tablica 1. Primjeri komercijalno dostupnih antitumorskih nanofarmaceutika u EU.

Nanotehnološki pristup	Djelatna tvar	Glavna indikacija	Farmaceutski oblik	Zaštićeni naziv lijeka (Proizvođač*)	Postupak registracije u EU**
Konjugati lijeka	Pegaspargaza (mPEG-asparaginaza)	Akutna limfoblastična leukemija	Otopina (iv/im)	Oncaspar® (Sigma-tau Arzneimittel GmbH, Düsseldorf, DE)	NP: DE -MAH u DE: Sigma-tau Rare Diseases SA, Funchal, PT
	Brentuksimab vedotin	Hodgkinov limfom	Prašak za koncentrat za otopinu za infuziju	Adcetris® (Takeda Italia S.P.A., Cerano, IT)	CP: -MAH: Takeda Pharma A/S, Taastrup, DK
	Trastuzumab emtanzin	Neoplazme dojki	Prašak za koncentrat za otopinu za infuziju	Kadcyla (Roche Pharma AG, Grenzach-Whylen, DE)	CP: -MAH: Roche Registration Ltd., Welwyn Garden City, UK)
Liposomi	Citarabin	Meningealne neoplazme	Suspenzija (intratekalno)	DepoCyt® (Almac Pharma Services Ltd, Craigavon, UK)	CP: -MAH: Pacira Ltd, High Wycombe, UK
	Doksorubicin	Neoplazme dojki, Multipli mijelom, Neoplazme jajnika, Kaposijev sarkom	Suspenzija (iv)	Caelyx® (Janssen Pharmaceutica NV, BE)	CP: -MAH: Janssen-Cilag International NV, BE
	Doksorubicin	Neoplazme dojki	Suspenzija (iv)	Myocet® (GP-Pharm, Barcelona, ES/Teva Operations Poland Sp. z o.o., Krakow, PL)	CP: -MAH: Teva Pharma BV, Utrecht, NL

Daunorubicin	Uznappedovali Kaposijev sarkom povezan s HIV-om	Suspenzija (iv)	DaunoXome [®] (Gilead Sciences Ltd)	MRP: -RMS: DE -CMS: AT, DK, EL, IE, IT, NL, PT -MAH u RMS: Gilead Sciences GmbH, Planegg, DE NP: FI, FR, NO, UK
Mifamurtid	Osteosarkom	Suspenzija (iv)	Mepact [®] (Takeda Ireland Ltd, Wicklow, IE/Takeda Italia Farmaceutici SpA, Cerano, IT)	CP: -MAH: Takeda France SAS, Puteaux, FR
Paklitaksel	Neoplazma dojki	Prašak za suspenziju za infuziju	Abraxane [®] (Celgene Europe Ltd, Uxbridge, UK)	CP: -MAH: Celgene Europe Ltd
Nanočestice				
⁹⁰ Y-ibritumomab tiuksetan	Limfom, folikularni	Otopina (iv)	Zevalin [®] (Bayer Pharma AG, Leverkusen, DE/CIS bio international, Gif-sur-Yvette, FR)	CP: -MAH: Spectrum Pharmaceuticals BV, Amsterdam, NL

Napomene: *Proizvođač odgovoran za puštanje serije lijeka u promet naveden u uputi o lijeku odobreno u EU; **izvor informacija EMA, HMA, nacionalna regulatorna tijela

Kratice: AT, Austrija; BE, Belgija; CMS, država sudionica u postupku (engl. *concerned member state*); CP, centralizirani postupak; DE, Njemačka; DK, Danska; EL, Grčka; EMA, Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*); FI, Finska; FR, Francuska; IE, Irska; im, intramuskularna primjena; IT, Italija; iv, intravenska primjena; MAH, nositelj odobrenja za stavljanje lijeka u promet (engl. *Marketing Authorisation Holder*); MRP, postupak međusobnog priznavanja (engl. *mutual recognition procedure*); NL, Nizozemska; NO, Norveška; NP, nacionalni postupak; PL, Poljska; PT, Portugal; RMS, referentna država članica (engl. *reference member state*); UK, Velika Britanija

1.2.2. Liposomi

Liposomi su vezikule građene od jednog ili više koncentričnih lipidnih dvosloja koji okružuju vodenu jezgru (21). Kao nanonosači mogu uklopiti hidrofilne molekule unutar vodene jezgre, ali i hidrofobne molekule unutar lipidne membrane. Liposomi su iz niza razloga vrlo privlačni kao nosači za ciljnu dostavu lijekova, između ostaloga to su sličnost sa staničnom membranom po sastavu i strukturi te biokompatibilnost, imunokompatibilnost i biorazgradljivost. U nedostatke liposoma ubrajaju se nestabilnost te brzo uklanjanje iz krvotoka. Ta svojstva se mogu optimirati funkcionalizacijom površine liposoma s PEG-om, čime se povećava sterička stabilnost liposoma te produžuje vrijeme cirkuliranja krvotokom (22). U slučaju intravenske primjene pegiliranih liposoma s uklopljenim antitumorskim lijekom postignuto je značajno smanjenje unosa liposoma u mononuklearno-fagocitni sustav (engl. *mononuclear phagocyte system*, MPS), postignuta je značajno veća površina ispod krivulje odnosa koncentracije lijeka u plazmi i vremena (AUC) te povećanje raspodjele u tumorsko tkivo u usporedbi s nepegiliranim liposomima (10). Površina liposoma može se dodatno modificirati i vezanjem liganada za aktivnu ciljnu dostavu. Pegilirani liposomi s uklopljenim doksorubicinom (liječak Doxil®/Caelyx®) su prvi odobreni liposomski antitumorski lijek (Tablica 1).

1.2.3. Polimerne micle

Polimerne micle su nanosustavi građeni od amfifilnih polimera, a nastaju samoorganiziranjem u vodenom mediju pri čemu se hidrofilni dio polimera orijentira prema vodenom mediju i gradi omotač micle, a hidrofobni dio polimera orijentira prema unutrašnjosti i gradi jezgru micle (23). Hidrofilna površina djeluje kao svojevrsni štit od trenutnog prepoznavanja od strane MPS-a te zbog toga pokazuju dulje vrijeme cirkulacije krvotokom (22). Kao polimer izbora za formiranje omotača micle pokazao se također PEG. Svojstvo PEG-a je i da ograničava međumicelarnu interakciju koja bi mogla dovesti do stvaranja agregata ali i interakciju s proteinima plazme (opsoninima). U hidrofobnu jezgru micela uklapaju se lipofilni lijekovi. Micle su obično su veličine od 20-80 nm. Još uvijek postoje aspekti polimernih micela koji zahtijevaju određena

poboljšanja kako bi mogle ući u širu kliničku primjenu (7). Ključni aspekt je očuvanje stabilnosti micela nakon primjene te dolazak intaktnih micela do ciljnog mjesta učinka lijeka. Polimerne micelle najviše se istražuju za dostavu antitumorskih lijekova, a neke od njih su i u fazi kliničkih ispitivanja. Formulacija temeljena na polimernim micelama s uklopljenim paklitakselom odobrena je u Južnoj Koreji pod nazivom Genexol®-PM (Samyang, Biopharmaceutical, Seul, Južna Koreja), a očekuje se i odobrenje u EU pod trgovačkim nazivom Cynviloq™ (7).

1.2.4. Polimerne nanočestice

Polimerne nanočestice su čvrste čestice građene od prirodnih ili sintetskih polimera, a mogu se podijeliti u dvije skupine: nanosfere i nanokapsule (7). Nanosfere su matriksni sustavi unutar kojih je lijek ravnomjerno dispergirani, a nanokapsule su spremišni sustavi kod kojih se lijek nalazi unutar jezgre koja je okružena polimernom membranom. Molekule lijeka mogu biti fizički uklopljene unutar ovih čestica, ali i kemijski konjugirane ili adsorbirane na konstitutivne polimere nanočestica. Oslobođanje molekula lijeka iz ovih nosača odvija se putem difuzije kroz polimerni matriks ili membranu i/ili njihovom erozijom ili fragmentacijom (7). Nove vrste polimernih nanočestica mogu reagirati na okolišne, kemijske, toplinske ili biološke podražaje te osloboditi lijekoviti sadržaj nakon aktivacije određenim podražajem (22). Polimerne nanočestice, poput i drugih nanoplatforami, nude obećavajuća svojstva ciljane dostave kemoterapeutika uz poboljšanu djelotvornost, smanjenu toksičnost, kontrolirano i produljeno oslobađanje lijeka (13).

Ovisno o planiranoj namjeni, potrebno je optimirati svojstva polimernih nanočestica. Kako bi se postigla upravo željena svojstva, način njihove priprave je od osobite važnosti. Kemija polimera osigurava dovoljno prostora za jednostavnu manipulaciju polimernim česticama bez gubitka željenih fizičkih, kemijskih i bioloških svojstava. I u pripravi polimernih nanočestica često se koristi PEG koji se veže na druge građevne polimere nanočestica. PEG i u ovom slučaju umanjuje vezanje proteina plazme na površinu nanočestica, što produljuje vrijeme zadržavanja u sistemske cirkulaciji. Istraživanjem polimernih nanočestica s vezanim ligandima na njihovoj površini pokazano je da je to

jedan od načina ciljanja tumorskih stanica, koje procesom endocitoze dostavljaju lijek unutar stanica (13).

Iako se nanočestice istražuju već oko 40 godina antitumorski nanofarmaceutik Abraxane® je jedini proizvod na tržištu koji se temelji na tehnologiji polimernih nanočestica (paklitaksel vezan na nanočestice albumina; Tablica 1). U slučaju lijeka Abraxane®, zbog manje toksičnosti mogu se primjeniti više doze paklitaksela u odnosu na od ranije dostupni Taxol® (formulacija s Cremophorom®EL; Corden Pharma Latina S.p.A., Sermoneta, Italija), a nije potrebna ni premedikacija za smanjenje akutnih nuspojava (7).

1.3. Istraživanje i razvoj novih antitumorskih nanofarmaceutika

Dostava lijeka u tumorsko tkivo predstavlja veliki izazov zbog značajnih bioloških barijera koje lijek/nanosustav treba proći na tom putu. Uspješnost antitumorskih nanofarmaceutika, pri intravenskoj primjeni što je najčešći put primjene, ovisi o više čimbenika uključujući (i) izbjegavanje brze eliminacije putem bubrega te MPS-a; (ii) ektravazaciju kroz propusne krvne žile tumora; (iii) penetraciju do tumorskih stanica kroz gusto vezivno tkivo tumora; (iv) zadržavanje u tumorskom tkivu; (v) oslobađanje djelatne tvari kako bi se postigao farmakološki učinak. Fizičko-kemijska svojstva nanofarmaceutika određuju farmakokinetiku lijeka te njegovu bioraspoloživost u tumoru (4). Međutim, biologija samog tumora te razlike među bolesnicima (dob, spol, tip i lokacija tumora, genetski čimbenici, prethodne terapije) također utječu na uspješnost liječenja antitumorskim nanofarmaceuticima (10).

Razlozi neuspješnom kliničkom transferu nanofarmaceutika kriju se u nerazumijevanju bioloških barijera, usredotočenosti na razvoj sve složenijih nanofarmaceutika zanemarujući teškoće u svladavanju bioloških barijera ili nemogućnosti prevođenja izrade iz laboratorijskog u industrijsko mjerilo (2, 24). Kritična je i uporaba neodgovarajućih animalnih modela u pretkliničkim ispitivanjima, odnosno značajne razlike između tumora u pokusnih životinja i bolesnika. Stoga je opći cilj povećati razumijevanje u dizajnu i razvoju nanofarmaceutika namijenjenih liječenju tumorskih oboljenja, a vezano za mogućnost savladavanja bioloških barijera. Neophodno je također razviti i koristiti dobro definirane animalne modele tumorskih oboljenja.

Većina do sada odobrenih antitumorskih nanofarmaceutika temelji se na pasivnoj ciljnoj dostavi lijeka u tumorsko tkivo zbog povećane permeabilnosti krvnih žila tumora i smanjene limfne drenaže (eng. *enhanced permeability and retention*, EPR učinak). Tu spadaju liposomi kao što su npr. Doxil®/Caexyl® (doksorubicin uklopljen u pegilirane liposome), Myocet® (doksorubicin uklopljen u nepegilirane liposome), Daunoxome® (daunorubicin uklopljen u nepegilirane liposome), nanočestice kao Abraxane® te polimerne micle kao Genxol®-PM (paklitaksel uklopljen u polimerne

micele). Valja napomenuti da je EPR učinak izuzetno heterogeni fenomen i bitno se razlikuje od modela do modela tumora, kao i među bolesnicima. Iako se očekivalo poboljšanje učinkovitosti terapije, klinički uspjeh antitumorskih nanofarmaceutika temelji se najvećim dijelom na smanjenju toksičnosti u usporedbi s klasičnim kemoterapeutcima (2). Dobro je poznata činjenica smanjenja kardiotoksičnosti i hematoloških nuspojava doksorubicina uklopljenog u liposome (Doxil®/Caelyx®). Neki od polimernih nanofarmaceutika s doksorubicinom pokazali su u kliničkim ispitivanjima smanjenje nuspojava, povećanje najveće podnošljive doze (engl. *maximal tolerated dose*, MTD) no izostao je značajan porast stope odgovora na liječenje (25). S ciljem prevladavanja navedenih teškoća u poboljšanju omjera djelotvornosti i sigurnosti sistemski primijenjenih antitumorskih nanofarmaceutika te proširenja njihove kliničke primjenjivosti osmišljeni su i koncepti unaprjeđenja djelotvornosti kombiniranih načina liječenja tumora (2). Značajni uvjerljivi dokazi opravdanosti takvog pristupa postignuti su npr. u slučaju kombiniranja radioterapije i antitumorskih nanofarmaceutika. Lokalna radioterapija i polimerni nanofarmaceutici pokazali su sinergističko djelovanje (26, 27). Ispitivanjem kombinacije radioterapije s doksorubicinom vezanim na N-(2-hidroksipropil)metakrilamidni (HPMA) kopolimer, došlo je do pojačanog nakupljanja konjugata lijeka u tumoru i do poboljšanja djelotvornosti te podnošljivosti radiokemoterapije. Uzevši u obzir rezultate do sada provedenih ispitivanja na tom polju, osnovano je očekivati da bi radiokemoterapija uz istovremenu primjenu nanofarmaceutika mogla imati značajan potencijal za unaprjeđenje liječenja uznapredovalih solidnih tumora. Također, antitumorski nanofarmaceutici pokazali su i dobre rezultate u kombinaciji sa standardnom kemoterapijom. Abraxane® se pokazao dobrim u kombinaciji s bevacizumabom i gemcitabinom u bolesnika s metastatskim karcinomom dojke, a isto vrijedi i za kombinaciju lijeka Genexol® PM sa cisplatinom i karboplatinom (28, 29). Nadalje, Doxil® se dobro kombinira s docetakselom (inhibitor mikrotubula) u metastatskom karcinomu dojke, kanfosfamidom (alkilirajući agens) u karcinomu jajnika te s bortezomibom (inhibitor proteasoma) u liječenju multiplog mijeloma. Uz dosadašnje napore razvoja novih formulacija antitumorskih nanofarmaceutika, trud je potrebno uložiti i u kreiranje i optimizaciju

kombiniranog liječenja kako bi se iskoristio povoljan utjecaj nanosustava na raspodjelu djelatnih tvari s antitumorskim učinkom (2).

1.4. Postupci davanja odobrenja za stavljanje lijeka u promet u Europskoj uniji

Kako bi lijek došao na tržište na području Europske unije (EU), lijek prethodno mora dobiti odobrenje za stavljanje u promet. Ono u Republici Hrvatskoj daje Agencija za lijekove i medicinske proizvode Republike Hrvatske (HALMED) ili Europska komisija. U svrhu stavljanja lijeka u promet svakom lijeku mora biti utvrđena kakvoća, sigurnost primjene i djelotvornost.

Na području EU, odobrenje za stavljanje lijeka u promet nacionalnim postupkom, postupkom međusobnog priznavanja (engl. *Mutual Recognition Procedure*; MRP) i decentraliziranim postupkom (engl. *Decentralised Procedure*; DCP) daje nacionalno regulatorno tijelo rješenjem o davanju odobrenja kojim se dovršava postupak davanja odobrenja. Odobrenje za stavljanje lijeka u promet centraliziranim postupkom (engl. *Centralised Procedure*; CP) daje Europska komisija sukladno odredbama Uredbe (EZ) broj 726/2004.

Na području EU pa tako i Hrvatske CP je obvezan za ishođenje odobrenja za stavljanje u promet antitumorskih lijekova te će biti pobliže opisan.

CP, koji se započeo koristiti 1995. godine, daje se odobrenje za stavljanje lijeka u promet koje je važeće u svim državama članicama Europske unije te Islandu, Norveškoj i Lihtenštajnu (30). Taj postupak je obvezan za:

- lijekove za ljude za liječenje HIV/AIDS-a, raka, dijabetesa, neurodegenerativnih bolesti, autoimunih i drugih imunih poremećaja i virusnih bolesti,
- veterinarske lijekove koji se koriste za poboljšanje rasta ili uroda,
- lijekove proizvedene biotehnološkim postupcima, kao npr. genetskim inženjerstvom,
- lijekove za naprednu terapiju, kao što je genska terapija, terapija somatskim stanicama ili lijekove dobiveni tkivnim inženjerstvom,
- lijekove za liječenje rijetkih i teških bolesti kod ljudi.

CP-om se može odobriti i bilo koji drugi lijek koji predstavlja značajnu terapijsku, znanstvenu ili tehnološku inovaciju ili za kojeg je odobrenje u EU od interesa za zdravlje bolesnika ili životinja.

Zahtjevi za davanje odobrenja za stavljanje lijeka u promet CP-om predaju su direktno Europskoj agenciji za lijekove (engl. *European Medicines Agency*; EMA). Zahtjev/dokumentaciju ocjenjuju znanstvena povjerenstva EMA-e:

- Povjerenstvo za lijekove za primjenu kod ljudi (engl. *Committee for Medicinal Products for Human Use*; CHMP) je povjerenstvo sastavljeno od predstavnika država članica EU i imenovanih stručnjaka zaduženo za pripremu mišljenja EMA-e o svim pitanjima koja se odnose na lijekove za primjenu kod ljudi u skladu s Uredbom (EZ) broj 726/2004.
- Povjerenstvo za ocjenu rizika na području farmakovigilancije (engl. *Pharmacovigilance Risk Assessment Committee*; PRAC) je povjerenstvo sastavljeno od predstavnika država članica EU te drugih imenovanih stručnjaka zaduženo za donošenje obvezujućih odluka, preporuka i savjeta u vezi sa svim aspektima upravljanja rizikom primjene lijekova u skladu s Uredbom (EU) broj 1235/2010 i Direktivom 2010/84/EZ.
- Povjerenstvo za lijekove za primjenu kod životinja (engl. *Committee for Medicinal Products for Veterinary Use*; CVMP) je povjerenstvo sastavljeno od predstavnika država članica EU i imenovanih stručnjaka zaduženo za pripremu mišljenja EMA-e o svim pitanjima koja se odnose na lijekove za primjenu kod životinja u skladu s Uredbom (EZ) broj 726/2004.
- Povjerenstvo za lijekove za rijetke i teške bolesti ("orphan" lijekovi) (engl. *Committee for Orphan Medicinal Products*; COMP) je povjerenstvo sastavljeno od predstavnika država članica EU i imenovanih stručnjaka zaduženo za pregled/ocjenu zahtjeva kompanija koje traže status lijeka za rijetke i teške bolesti. To su lijekovi koji su namijenjeni za dijagnozu, prevenciju i liječenje bolesti opasnih po život ili vrlo ozbiljnih stanja koje obuhvaćaju ne više od 5 na 10 000 ljudi u EU.

- Povjerenstvo za biljne lijekove (engl. *Committee on Herbal Medicinal Products*; HMPC) je povjerenstvo sastavljeno od predstavnika država članica EU i imenovanih stručnjaka zaduženo za pripremu mišljenja EMA-e o svim pitanjima koja se odnose na biljne lijekove.
- Povjerenstvo za lijekove za naprednu terapiju (engl. *Committee for Advanced Therapies*; CAT) je povjerenstvo sastavljeno od predstavnika država članica EU i imenovanih stručnjaka zaduženo za ocjenu kakvoće, sigurnosti primjene i djelotvornosti lijekova za naprednu terapiju i praćenje znanstvenih dostignuća na tom polju.
- Povjerenstvo za lijekove za pedijatrijsku primjenu (engl. *Paediatric Committee*; PDCO) je povjerenstvo sastavljeno od predstavnika država članica EU i imenovanih stručnjaka zaduženo za ocjenu sadržaja plana pedijatrijskih ispitivanja i prihvatanje njihovih mišljenja.

Rad svakog povjerenstva potpomažu različite radne skupine koje konzultiraju znanstvena povjerenstva vezano za znanstvena pitanja koja se odnose na područja njihove stručnosti. Skupine čine stručnjaci iz različitih znanstvenih područja koji su odabrani s europskog popisa stručnjaka koji održava EMA. Članovi imaju zadatak znanstveno ocijeniti zahtjeve za davanje odobrenja za stavljanje lijeka u promet ili skicirati i revidirati znanstvene smjernice.

CP se može podijeliti u nekoliko faza:

- faza prije predaje zahtjeva,
- prva faza prije mišljenja,
- druga faza prije mišljenja,
- faza nakon mišljenja.

Faza prije predaje zahtjeva

Faza prije predaje zahtjeva može obuhvatiti npr. znanstveni savjet, sastanak prije predaje zahtjeva, predaju zahtjeva za davanje odobrenja za stavljanje lijeka u promet, imenovanje izvijestitelja i doizvijestitelja, validaciju zahtjeva i dr.

Prva faza nakon mišljenja

Do dana 80 postupka izjavitelj i doizjavitelj šalju izvješća o ocjeni dokumentacije o lijeku. Članovi CHMP-a (uključujući i recenzente) do dana 100 postupka šalju svoje komentare na izvješća. Do dana 115 postupka priprema se zajednički popis pitanja izjavitelja, recenzenata, CHMP članova i EMA-e koji se na dan 120 postupka šalje podnositelju zahtjeva. Podnositelj zahtjeva je dužan u roku od 3 mjeseca odgovoriti na postavljena pitanja.

Druga faza prije mišljenja

Nakon što podnositelj zahtjeva dostavi odgovore, s danom 121 se nastavlja postupak. Izjavitelji do dana 150 pripremaju zajedničko izvješće o ocjeni dokumentacije o lijeku. Na dan 170 postupka CHMP članovi šalju svoje komentare izjaviteljima, drugim CHMP članovima i EMA-i te se do dana 180 postupka odlučuje je li potrebno usmeno obrazloženje od podnositelja zahtjeva ili je potrebno poslati popis s otvorenim pitanjima. Ukoliko je potrebno usmeno obrazloženje, postupak se zaustavlja kako bi se podnositelj zahtjeva pripremio, kada je to potrebno. Ukoliko je potreban popis otvorenih pitanja, isti se šalje podnositelju zahtjeva i postupak se zaustavlja. Na dan 181 postupak se nastavlja ili se održava usmeno obrazloženje. Do dana 210 postupka podnositelj zahtjeva dostavlja završni nacrt sažetka opisa svojstava lijeka, upute o lijeku i označavanja izjaviteljima, CHMP članovima i EMA-i. Na dan 210 postupka povjerenstvo daje mišljenje može li se lijek odobriti ili ne.

Faza nakon mišljenja

Nakon što je doneseno pozitivno mišljenje, podnositelj zahtjeva je dužan u roku od 5 dana dostaviti EMA-i prijevode sažetka opisa svojstava lijeka, upute o lijeku i označavanja na svim jezicima članica EU koji se onda šalju nacionalnim regulatornim tijelima na pregled. Do dana 232 postupka podnositelj zahtjeva šalje EMA-i završne verzije sažetka opisa svojstava lijeka, upute o lijeku i označavanja u koje je uključio komentare pristigle od nacionalnih regulatornih tijela, koji se onda proslijeđuju Europskoj komisiji. Na dan 277 postupka Europska komisija daje odobrenje za stavljanje lijeka u promet koje vrijedi na području cijele Europske unije te Islanda, Lihtenštajna i Norveške.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog specijalističkog rada je sustavnim pregledom dostupne literature analizirati razvoj antitumorskih nanofarmaceutika s naglaskom na procjenu uspješnosti transfera dosadašnjih postignuća u kliničko okruženje.

Predloženo će istraživanje osigurati detaljan uvid u antitumorske lijekove unaprijeđene terapijske vrijednosti koji su izrađeni korištenjem nanotehnoloških postupaka (nanofarmaceutici). Istraživanje će razjasniti i pregledno prikazati dostignuća trenutnih pretkliničkih ispitivanja antitumorskih nanofarmaceutika kao i stupanj uspješnosti njihovog transfera u kliničko okruženje. Ujedno će se prikazati i terapijske prednosti primjene dostupnih antitumorskih nanofarmaceutika. Bit će dan osvrt na specifičnosti regulatornih zahtjeva koje je potrebno zadovoljiti kako bi antitumorski nanofarmaceutici dobili odobrenje za stavljanje lijeka u promet.

3. MATERIJAL I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

Pretraživanje literature online baza podataka obavljeno je elektroničkim putem pomoću umreženog računala koje ima online pristup bazama podataka. Pretražene su bibliografska baza podataka (PubMed) i baza podataka s cjelovitim tekstom (Science Direct).

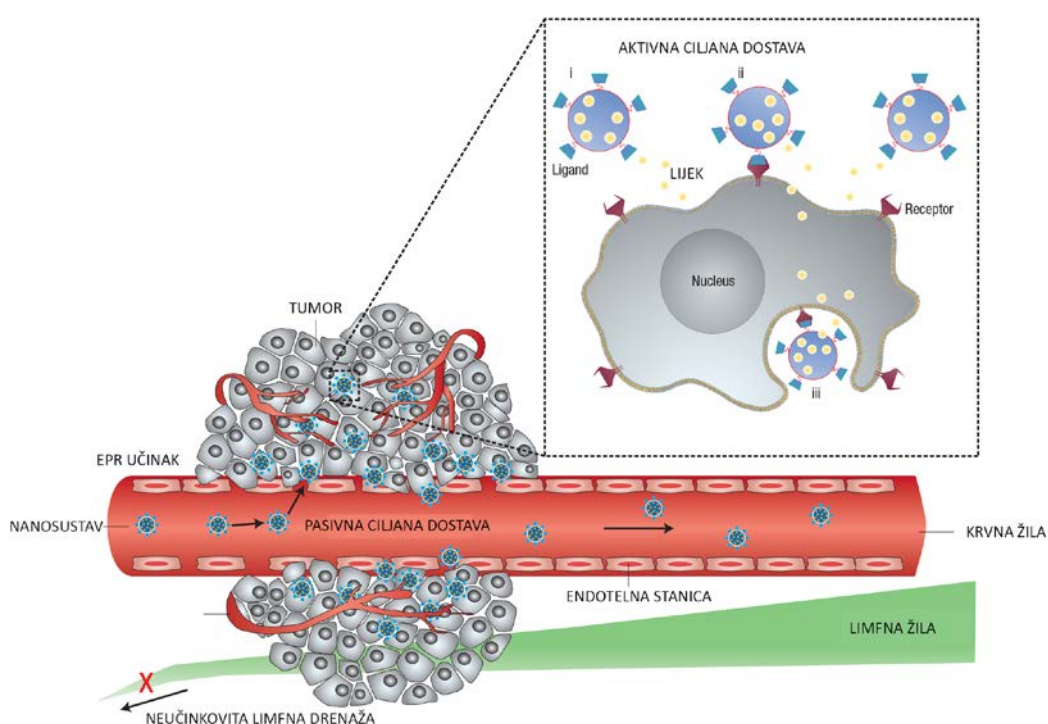
Literatura je pretraživana prema temi istraživanja, predmetu istraživanja, autorima i časopisu. Pretraživalo se od općih prema specijaliziranim člancima pri čemu su odabirani članci relevantni za problematiku ovoga specijalističkog rada. Pri pretraživanju literature traženi su odgovori na specifična pitanja vezana za problematiku ovoga specijalističkog rada.

Relevantni članci proučavani su na analitički i kritički način s obzirom na definiranje znanstvenog i/ili stručnog problema i istraživanje postojećih znanja o definiranom problemu. Pri proučavanju relevantnih članaka izdvojeni su najvažniji rezultati, rasprave i zaključci koji su prikazani ovim specijalističkim radom.

Postupci odobravanja i terapijska primjena antitumorskih nanofarmaceutika su analizirani korištenjem raspoloživih baza Agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED), Europske agencije za lijekove (EMA) i Američke agencije za hranu i lijekove (FDA), a detalji o pojedinom lijeku prikupljeni su koristeći Europska javna izvješća o ocjeni dokumentacije o lijeku (engl. *European public assessment report*, EPAR izvješća), Sažetak opisa svojstava lijeka, znanstvene rasprave te internetske stranice i brošure proizvođača antitumorskih nanofarmaceutika.

3.1. Načela razvoja antitumorskih nanofarmaceutika

Unaprjeđenje antitumorske terapije primjenom nanotehnološkoga pristupa temelji se na produljenom zadržavanju lijeka u cirkulaciji, poboljšanoj raspodjeli u tumor, poboljšanju topljivosti antitumorskih lijekova i/ili poboljšanju njihove stabilnosti u biološkom okruženju. Tijekom godina razvijali su se različiti koncepti ciljane dostave antitumorskih lijekova, kao što su pasivna i aktivna ciljna dostava u tumorske stanice, aktivna ciljana dostava u endotelne stanice te oslobađanje lijeka ovisno o određenom podražaju (engl. *triggered release*) (2).



Slika 2. Shematski prikaz pasivne i aktivne ciljane dostave lijeka u tumor. Pasivna ciljana dostava postiže se ekstravazacijom nanosustava s uklopljenim/vezanim lijekom u području tumora zbog povećane propusnosti tumorskih krvnih žila i neučinkovite limfne drenaže tumorskog tkiva (EPR učinak). Aktivna ciljana dostava postiže se funkcionalizacijom površine nanosustava ligandima koji se specifično prepoznaju receptore na površini tumorskih stanica. Nanosustavi mogu: (i) oslobađati lijek u blizini tumorskih stanica, (ii) vezati se na površinu tumorskih stanica te djelovati kao depo lijeka iz kojega se polagano oslobađa lijek, (iii) ući u stanice procesom endocitoze (preuzeto i prilagođeno iz reference (31)).

3.1.1. Pasivna ciljana dostava antitumorskih lijekova

Pasivna ciljana dostava antitumorskih lijekova temelji se na (pato)fiziološkim uvjetima koji omogućavaju nakupljanje terapijskog sustava s uklopljenim lijekom u tumorskom tkivu. Naime, za tumore je karakteristična povećana permeabilnost krvnih žila i smanjena limfna drenaža (engl. *enhanced permeability and retention effect*; EPR). Kad solidni tumor dosegne određenu veličinu, dostupnost hranjivih tvari i kisika u tumoru je ograničena zbog kompeticije između aktivnih proliferirajućih tumorskih stanica, te zbog visokog intersticijskog tlaka i otežane difuzije metabolita (3). Tumorske stanice tad počinju lučiti faktore rasta koji induciraju stvaranje novih krvnih žila iz postojeće vaskulature. Taj proces se naziva angiogeneza. Zbog brze proliferacije tumorskog tkiva, novonastale tumorske krvne žile su nepravilne strukture, a odlikuju ih endotel nepravilne građe kao i izostanak bazalne membrane. Tumorska vaskulatura stoga obiluje otvorima (fenestracije) koji mogu dosegnuti veličine od 200 nm do 2000 nm, ovisno o tipu tumora, njegovom okružju i lokalizaciji. Za usporedbu, veličina pora na endotelu normalnih krvnih žila iznosi 5 do 10 nm. Takove fenestracije pružaju vrlo malo otpora ektravazaciji sastavnica krvi u tumorski intersticij. Navedeni fenomen predstavlja komponentu povećane permeabilnosti EPR učinka (3).

Tumorsko tkivo također ima reduciranu sposobnost drenaže tekućine i metaboličkih produkata iz intersticijskog prostora. Smanjenje drenaže uzrokovano je slabo definiranim limfnim sustavom koji svojim razvojem ne uspijeva pratiti ubrzanu proliferaciju tumorskih stanica. Stoga, za razliku od zdravog tkiva, koje može brzo ukloniti makromolekule iz svog intersticija, u tumorskom tkivu dolazi do nakupljanja makromolekula, pa i nanočestica. Taj fenomen predstavljala komponentu EPR učinka koji se odnosi na povećano zadržavanje u tumorskom tkivu.

EPR učinak prvi put se spominje kao novi koncept dostave makromolekularnih lijekova u tumore 1986. godine. Taj koncept razvili su japanski znanstvenici Matsumura i Maeda vezano uz razvoj protein-polimer konjugata za liječenje hepatokarcinoma.

3.1.1.1. Barijere pri intravenskoj primjeni antitumorskih nanofarmaceutika

Nakon intravenske primjene antitumorski nanofarmaceutici moraju savladati brojne anatomske i fiziološke barijere (MPS sustav, bubrezi (renalna filtracija), heterogeni protok krvi i visok intersticijski tlak u tumoru, izvanstanični matriks i unutarstanični transport) prije dolaska do ciljnog mjesta njihovog farmakološkog učinka. Osnovni preduvjet za nakupljanje u tumoru posredstvom EPR učinka je produljeno zadržavanje terapijskog nanosustava u sistemskej cirkulaciji. Kako bi se osiguralo produljeno zadržavanje nanosustava u cirkulaciji, neophodno je izbjeći brzu eliminaciju putem bubrega te prepoznavanje od strane MPS-a. Veličina, ali oblik i druga svojstva nanosustava određuju mogućnost i/ili brzinu eliminacije putem bubrega. Poznato je da se proteini/čestice s hidrodinamičkim promjerom manjim od 5-6 nm slobodno filtriraju glomerularnom filtracijom. Kako bi se izbjegla brza eliminacija bubregom te omogućilo produljeno zadržavanje u cirkulaciji, terapijski nanosustavi moraju imati hidrodinamički promjer veći od 10 nm.

MPS, poznat i kao retikuloendotelni sustav (RES), dio je imunološkog sustava, a čine ga fagocitne stanice retikularnog vezivnog tkiva. Te stanice obuhvaćaju primarno monocite i makrofage koji se nakupljaju u limfinim čvorovima i slezeni. Kupfferove stanice jetre i tkivni histioci ti također su dio MPS sustava. Primarna funkcija MPS sustava je uklanjanje stranih čestica kao što su bakterije i virusi, ali i nanočestice koje bi se našle u cirkulaciji. Makrofazi ne prepoznaju strana tijela izravno, već ista moraju prvo biti obložena slojem proteina u procesu opsonizacije. Proteini koji sudjeluju u ovom procesu (opsonini) su imunoglobulini, proteini komplementnog sustava (C3, C4 i C5), fibronektin, kolagen tip I te mnogi drugi. Ti proteini pri susretu sa stranom česticom prijanjaju na njenu površinu putem ionskih, elektrostatskih, hidrofobnih, hidrofilnih i van der Waalsovih veza. Nakon toga makrofazi prepoznaju površinski opsonizirani sloj strane čestice, fagocitiraju ju i razgrađuju u unutarstaničnim vezikulama poput lizosoma (22). Interakcija sa MPS-om ovisi o interakcijama nanosustava sa sastavnicama krvi, koje su pak određene fizičko-kemijskim svojstvima nanosustava (veličina, oblik, površinska svojstva (naboj, hidrofilnost), rigidnost/fleksibilnost,

stabilnost (22)). Optimalnim svojstvima nanočestica su se zasad pokazali veličina ≤ 100 nm te neutralna i hidrofilna površina. Neutralnost i hidrofilnost površine najčešće se postiže oblaganjem PEG-om i time se umanjuje adsorpcija opsonina na površinu nanosustava.

Preferencijalno nakupljanje nanofarmaceutika i njihova raspodjela u tumorskom tkivu ovise o veličini, strukturi i fiziologiji tumora, a posredovani su s najmanje dva različita ali međusobno povezana fenomena, (i) ekstravazacijom iz krvnih žila te (ii) kretanjem kroz intersticij tumora difuzijom ili konvekcijom.

Ekstravazacija terapijskih nanosustava određena je njihovom koncentracijom u krvi, relativnom permeabilnošću stijenke krvnih žila i svojstvima tumorskog tkiva. Ukupni fluks nanosustava prema tumoru može se opisati kao posljedica difuzije i konvekcije, a moguće i nekih drugih fenomena (3). Difuzija je posljedica Brownovog gibanja zbog razlike u koncentraciji nanosustava u krvi i intersticiju tumora. Pomak tekućine iz vaskularnog prostora u intersticijski uzrokuje konvekcijske sile koje usmjeravaju koloide iz krvi, pa tako i nanosustave, prema tumorskom tkivu. Proces filtracije tekućine iz krvi u intersticij (na arterijskom kraju kapilare) i reapsorpcije iz intersticija u krv (na venskom kraju) ovisi o silama (tlakovima) koje vladaju u kapilarama odnosno u intersticiju. To su: kapilarni tlak, koloidnoosmotski (onkotski) tlak krvne plazme, intersticijski tlak i koloidnoosmotski tlak intersticijske tekućine. Odnos tih tlakova je takav da na arterijskom kraju kapilare prevladavaju sile filtracije, a na venskom sile reapsorpcije. Kapilarna stijenka propušta sve sastojke plazme, ali proteine samo u maloj mjeri. Veličina filtracije ovisi najviše o kapilarnom tlaku. Kada je ovaj povišen (pri povišenju arterijskog tlaka), povećava se filtracija, što uz jednak intenzitet reapsorpcije na venskom kraju kapilare rezultira smanjenjem volumena krvi a povećanjem volumena intersticijske tekućine.

Po ekstravazaciji u tumorsko tkivo, kretanje u tumorskom intersticiju također je određeno silama konvekcije i difuzije. Intersticij tumora obuhvaća prostor ispunjem intersticijskom tekućinom, tumorskim stanicama, stanicama strome i izvanstaničnim matriksom. Tlak intersticijske tekućine

povećava se veličinom tumora te približavanjem središtu tumora. Povećanje tlaka posljedica je kombinacije više čimbenika: ubrzana stanična proliferacija u ograničenom prostoru, visoka vaskularna permeabilnost u intersticiju te nedostatak limfne drenaže iz intersticija (32, 33). Konvekcija lijekova u intersticij tumorskog tkiva se smanjuje povećanjem intersticijskog tlaka. Zbog toga postoji tendencija smanjenog nakupljanja lijeka u jezgri tumorske mase gdje je intersticijski tlak najveći (22). Nadalje, izvanstanični matriks, gusta mreža fibrilarnih proteina (npr. kolagen i elastin) i polisaharida predstavlja fizičku barijeru kretanju terapijskih nanosustava (32, 34) .

Ako je mjesto učinka lijeka unutar stanice, a permeabilnost lijeka zbog njegovih fizičko-kemijskih svojstava je ograničena, tad nanosustav s uklopljenim lijekom mora biti internaliziran procesom endocitoze u tumorsku stanicu. Nakon ulaska u stanicu nanosustav s uklopljenim lijekom se nalazi u vezikulama kojima se prenosi kroz citoplazmu. Nanosustav se prenosi iz ranog endosoma u kasni endosom te na kraju u lizosom gdje se razgrađuje. Tijekom ovog prijenosa dolazi do pada pH vrijednosti s 7,4 na otprilike 5,0. Osim toga, stanični organeli sadržavaju i brojne enzime koji pomažu u razgranji stranih tijela. Molekule lijeka stoga moraju zadržati stabilnost tijekom smanjenja pH vrijednosti i intenzivne enzimске aktivnosti (35). Nanosustavi mogu biti dizajnirani tako da oni sami ili molekule lijeka mogu napustiti endosome prije njihovog sazrijevanja u lizosome (36).

3.1.1.2. Antitumorski nanofarmaceutici u kliničkoj primjeni i ispitivanjima

Na temelju koncepta EPR učinka, odnosno pasivne ciljane dostave, razvijeno je nekoliko antitumorskih nanofarmaceutika koji se već dulji niz godina koriste u kliničkoj praksi (Tablica 1). Određen broj nanofarmaceutika trenutno je u fazi kliničkih ispitivanja. Antitumorski nanofarmaceutici biti će opisani prema djelatnoj tvari koja je uklopljena u terapijski nanosustav ili vezana za polimer.

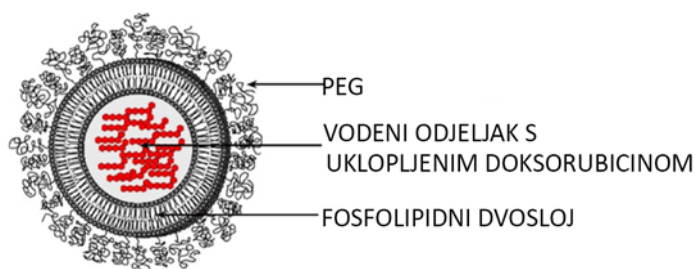
3.1.1.2.1 Nanofarmaceutici doksorubicina

Doksorubicin je antitumorski lijek iz skupine antraciklinskih antibiotika, a prvi puta je izoliran 1967. godine iz medija kulture *Streptomyces peucetius* var. *caesius* (F. Arcamone, Farmitalia Research Laboratories). Antitumorsko djelovanje doksorubicina posljedica je više mehanizama (inhibira vezanje DNA i RNA polimeraze što sprečava replikaciju DNA i sintezu proteina), no, očito je da se glavno antitumorsko djelovanje ostvaruje djelovanjem na topoizomerazu II. Aktivnost topoizomeraze osobito je povećana u proliferirajućim stanicama. Topoizomeraza tijekom replikacije DNA sprječava zapletanje uzvojnica i omogućuje njezino odmatanje, tako da katalizira reverzibilno prekidanje i ponovno spajanje lanaca. Doksorubicin se umeće u DNA te stabilizira kompleks DNA-topoizomeraza II inhibirajući tako proces diobe na spomenutoj točki (1). Doksorubicin je indiciran u liječenju mnogih maligniteta (akutna limfoblastična leukemija, karcinom dojke, karcinom želuca, Hodgkinov limfom, ne-Hodgkinov limfom, neuroblastom, karcinom jajnika, karcinom malih stanica pluća, karcinomi mekih tkiva i kostiju, sarkom i drugi). Lijek se daje intravenskom infuzijom. Međutim, primjenu mu limitira toksični učinak što za posljedicu ima nuspojave poput supresije hematopoeze, mučnine, povraćanja, apopleksije, alopecije, lokalne nekroze tkiva na mjestu primjene te posebno kardiotoksičnosti koja može biti i fatalna. Vjerojatnost razvoja kardiotoksičnosti je u velikoj mjeri ovisna o dozi. Uobičajena doza je 60-75 mg/m² svaka tri tjedna. Kardiomiopatija i kongestivno zatajenje srca najčešće se pojavljuju iznad kumulativne doze od 450-550 mg/m² doksorubicina. Najčešći uzrok kardiotoksičnosti povezane s doksorubicinom je oksidativni stres. Specifična

osjetljivost stanica srčanog mišića na oksidativni stres je vjerovatno posljedica niske razine antioksidativnih enzima u srcu (5).

Doxil®/Caelyx®

Lijek Doxil® (SAD, 1995)/Caelyx® (EU, 1996) je prvi odobren antitumorski nanofarmaceutik. Molekule doksorubicina uklopljene su u liposomski nosač, a liposomi su obloženi slojem PEG-a u cilju smanjenja uklanjanja nanosustava iz cirkulacije putem MPS-a. Pripravak je pokazao produljeno vrijeme zadržavanja u sistemske cirkulaciji ($t_{1/2}$ 3-4 dana) što se smatra preduvjetom za postizanje značajne pasivne akumulacije na mjestu tumora. Liposomi Doxil®/Caelyx®-a u prosjeku su veličine oko 100 nm te imaju uklopljeno 10000- 15000 molekula doksorubicina po liposomu (24).



Slika 3. Shematski prikaz pegiliranih liposoma s uklopljenim doksorubicinom koji su odobreni pod zaštićenim imenom Doxyl® na tržištu SAD-a te Caelyx® na tržištu EU (preuzeto i prilagođeno iz reference (5)).

Potencijalno ograničenje su oslobađanje lijeka iz liposoma i stabilnost u cirkulaciji, no dodatak kolesterola povećana je kohezivnost fosfolipidnog dvosloja, što je smanjilo prerano oslobađanje lijeka iz nosača. Dodatno, nastanak čvrste faze smanjuje osmotsko djelovanje i smatra se da pridonosi stabilnosti te više od 98 % lijeka u sistemske cirkulaciji ostaje unutar liposoma. Volumen raspodjele Doxil®/Caelyx®-a približan je volumenu krvi, što ukazuje na to da se liposomi minimalno raspodjeljuju u zdrava tkiva. Površina ispod krivulje (AUC) koncentracije lijeka u plazmi pripravka je velika, uslijed malog volumena distribucije i dugog vremena polueliminacije, za razliku od vrlo velikog volumena raspodjele slobodnog doksorubicina (ukazuje na značajnu raspodjelu unutar zdravih tkiva) i $t_{1/2}$ od 20-25 sati.

Pri primjeni lijeka Doxil®/Caelyx® javljaju se manje teške nuspojave u usporedbi sa slobodnim lijekom. Kardiotsičnost, najvažnija nuspojava doksorubicina, koja ograničava dozu, je ovim liposomskim oblikom drastično smanjena. Međutim pri primjeni tog liposomskog oblika zamijećene su dvije nove nuspojave: mukozitis i palmarno-plantarna eritrodizestezija (PPE). Doksorubicin ne pokazuje PPE kao nuspojavu te je ona jedinstvena za liposomske pripravke doksorubicina, a objašnjava se produljenim vremenom polueliminacije i tendencijom pegiliranih liposoma nakupljanju u koži (5).

Iako je Doxil®/Caelyx® pokazao veliki napredak u liječenju Kaposijevog sarkoma i multiplog mijeloma (poboljšane stope odgovora i produljenje vremena preživljenja), u solidnim tumorima poput raka jajnika i dojke nije došlo do značajnog poboljšanja učinkovitosti unatoč produljenom vremenu polueliminacije i nakupljanju u tumorskom tkivu (37, 38) . Lijek Caelyx® indiciran je: (i) kao monoterapija u bolesnika s metastatskim karcinomom dojke kod kojih postoji povećani rizik od srčanih poremećaja; (ii) u liječenju uznapredovalog karcinoma jajnika u žena u kojih liječenje prvom linijom kemoterapije na bazi platine nije bilo uspješno; (iii) u kombinaciji s bortezomibom za liječenje progresivnog multiplog mijeloma u bolesnika koji su prethodno primili najmanje jednu liniju liječenja i koji su prošli presađivanje koštane srži ili za isto nisu bili pogodni; (iv) u liječenju Kaposijevog sarkoma povezanog s AIDS-om u bolesnika s niskim brojem CD4 stanica (< 200 CD4 limfocita/mm³) i proširenom mukokutanom ili visceralnom bolešću. Caelyx® se može koristiti kao prva linija sistemske kemoterapije ili kao druga linija kemoterapije u bolesnika s Kaposijevim sarkomom povezanim s AIDS-om u kojih je bolest napredovala unatoč prethodnoj kombiniranoj sistemskoj kemoterapiji koja je uključivala najmanje dva od ovih lijekova: vinka alkaloid, bleomicin i standardni doksorubicin (ili drugi antraciklin), ili koji nisu podnosili tu terapiju (39).

Myocet®

Lijek Myocet® odobren je u liječenju metastatskog karcinoma dojke u kombinaciji s ciklofosamidom od strane Europske komisije 2000. godine. Doksorubicin uklopljen je u liposome koji za razliku od

liposoma lijeka Doxyl®/Caelyx® nisu pegilirani. Osim toga liposomi na kojima se temelji lijek Myocet® različitog su lipidnog sastava i različite veličine od liposoma lijeka Doxyl®/Caelyx® (150 vs 100 nm) te im je različita i metoda priprave (40). Lijek dolazi na tržište kao komplet triju bočica. Jedna sadrži 50 mg liofiliziranog praška doksorubicin hidroklorida, druga sadrži najmanje 1,9 ml suspenzije liposoma u citratnom puferu, a treća najmanje 3 ml karbonatnog pufera (41). Uklapanje doksorubicina postiže se zbog razlike pH vanjske faze (pH 7,8) i pH vodenog odjeljka liposoma (pH 4,0) (40). Stoga je potrebno prvo pomiješati karbonatni pufer s suspenzijom liposoma kako bi se podesio pH vanjske faze na 7,8. Uklapanje doksorubicina u liposome premašuje teoretska predviđanja jer doksorubicin stvara komplekse s citratnim ionima u unutrašnjem vodenom odjeljku. Doksorubicin je stoga uklopljen u vodeni odjeljak znatno iznad granice topljivosti te se postiže omjer lijeka i lipida znatno veći u usporedbi s pasivnim metodama uklapanja lijeka. Kompleksacija također umanjuje i oslobađanje doksorubicina iz liposoma.

Farmakokinetički parametri doksorubicina razlikuju se pri primjeni konvencionalne formulacije doksorubicina i lijeka Myocet, a zbog razlike u fizičko-kemijskim svojstvima liposoma razlikuju se i od onih pri primjeni lijeka Doxyl®/Caelyx® (tablica 2). Koncentracije ukupnog doksorubicina u plazmi znatno su više s lijekom Myocet® nego sa standardnim doksorubicinom, dok podaci ukazuju da su vršne plazmatske vrijednosti slobodnog doksorubicina (neuklopljenog u liposome) niže s lijekom Myocet® nego sa standardnim doksorubicinom.

Tablica 2. Usporedba farmakokinetičkih parametara doksorubicina pri primjeni konvencionalne formulacije doksorubicina, lijeka Myocet® i lijeka Doxyl®/Caelyx® (preuzeto i prilagođeno iz reference (40)).

	Konvenc.	Myocet®	Caelyx®
DOX			
Broj ispitanika	10	10	23
Spol	Ž	Ž	M
Dob (godine)	37-74	40-67	28-50
Tjelesna površina (m²)	1,71	1,60	1,89
Doza (mg/m²)	60	60	20
Doza (mg)	101,7	98,6	37,8
Cl (L/h/m²)	27,14	3,05	0,04
V_D (L/m²)	851	34,20	2,72
AUC (µg/ml*h)	2,23	45,98	590

Analize kardiotsičnosti u kliničkim ispitivanjima pokazale su statistički značajno smanjenje srčanih događaja u bolesnika liječenih Myocet®-om u usporedbi s bolesnicama liječenim standardnim doksorubicinom pri istoj dozi lijeka (41, 42). Metaanaliza je pokazala statistički značajno nižu stopu i kliničkog zatajenja srca i kombiniranog kliničkog i subkliničkog zatajenja srca u bolesnika liječenih Myocet®-om naspram onih liječenih standardnim doksorubicinom. Smanjeni rizik od kardiotsičnosti također je pokazala retrospektivna analiza bolesnika koji su prethodno adjuvantno liječeni doksorubicinom. PPE se pri primjeni lijeka Myocet® javlja rijetko, s incidencijom <0,5% u bolesnika s metastatskim karcinomom dojke.

S obzirom da je kliničkim ispitivanjima dokazana jednaka učinkovitost Myocet®-a u usporedbi s konvencionalnom formulacijom doksorubicina a značajno se smanjena pojavnost kardiotsičnosti čak i u pacijenata s visokim rizikom ili u onih koji prethodno bili liječeni antraciklinima, lijek Myocet® predstavlja značajan napredak u liječenju.

PK1(FCE 28068) je bio prvi polimer-lijek konjugat koji je ušao u fazu kliničkih ispitivanja. Doksorubicin je konjugiran sa sintetičkim N-(2-hidroksipropil)metakrilamid (HPMA) polimerom pomoću Gly-Phe-Leu-Gly peptidnog linkera, kojeg razgrađuju tiol-ovisne lizosomske proteaze (43, 44). Polimer-lijek konjugat stvara jednomolekularne micle u vodenoj otopini promjera od oko 8 nm (25, 45). Hidrofilnost HPMA polimera ograničava djelovanje MPS-a, a relativno velika molekularna masa (~20-30 kDa) omogućuje izbjegavanje eliminacije bubrezima. Ta svojstva omogućuju produljeno vrijeme zadržavanja u sistemskej cirkulaciji, što u konačnici bi trebalo rezultirati i povećanim nakupljanjem u tumoru. Nadalje, velika molekulska masa sprečava difuziju kroz staničnu membranu, čime se unos u stanicu ograničava na endocitozu te se omogućava cijepanje linkera i oslobađanje doksorubicina unutar endosoma. Unosom u stanicu procesom endocitoze te kontroliranim oslobađanjem u endosomu prevladava se i rezistencija na taj lijek, koja je posljedica prekomjerne ekspresije P-gp-a.

S obzirom da je doksorubicin konjugiran s HPMA, slobodni doksorubicin se ne detektira u plazmi i tkivima nakon primjene PK1 u miševa. Farmakokinetička ispitivanja na miševima su pokazala da je vrijeme polueliminacije otprilike 15 puta dulje u usporedbi sa slobodnim doksorubicinom (46). Nekoliko ispitivanja pokazalo je i relativno visok stupanj nakupljanja unutar tumora, jetre i slezene što je posljedica produljenog vremena zadržavanja u krvotoku. Molekulska masa konjugata PK1 korelira s visokim stupnjem nakupljanja u tumoru i niskim stupnjem nakupljanja u drugim tkivima. Osim toga, nakupljanje u zdravim tkivima je tijekom 30 dana bilo 6-50 puta niže u usporedbi sa slobodnim doksorubicinom (47-49). Smanjeno nakupljanje u zdravim tkivima značajno je unaprijedilo profil toksičnosti doksorubicina posebice kardiotoksičnosti (50, 51). Pretklinička ispitivanja djelotvornosti na različitim tumorskim modelima pokazala su veću djelotvornost u usporedbi sa slobodnim doksorubicinom i to ne samo u osjetljivim već i rezistentim ksenograft modelima (5).

Provedena su i klinička ispitivanja faze I (N=36) i II (N=62) u bolesnika s rakom nemalih stanica pluća (NSCLC), kolorektalnim te rakom dojke. Farmakokinetički profil se pokazao sličan onome iz pretkliničkih ispitivanja: produljeno vrijeme zadržavanja u krvotoku i distribucijski $t_{1/2}$ 1,8-3,0 sati (nekoliko minuta za slobodni doksorubicin). No u fazi I ispitivanja, 24 sata nakon primjene, zabilježeno je minimalno nakupljanje u jetri, bubrezima i tumoru. Kod svega 6 bolesnika je došlo do nakupljanja u tumoru tijekom ispitivanja faze I, dok u fazi II nisu zabilježeni dokazi nakupljanja PK1 konjugata u tumoru (52, 53).

PK1 nije pokazao toksičnost povezanu s polimerom, a kardiotoksičnost nije zabilježena ni pri kumulativnim dozama od 1680 mg/m^2 (ekvivalentno doksorubicinu). Iako rezultati ispitivanja djelotvornosti nisu pokazali značajan napredak, važno je istaknuti da je PK1 pokazao antitumorsku aktivnost kod tumora koji se smatrao rezistentnim/refraktornim na konvencionalnu kemoterapiju. To se može protumačiti kao dokaz koncepta (*proof of concept*) da polimer-lijek konjugati mogu imati prednosti u liječenju rezistentnih malignih bolesti (5) .

Iako je utvrđena korelacija između farmakokinetičkog profila u pretkliničkim i kliničkim ispitivanjima, u kliničkim ispitivanjima nije dokazano nakupljanje u tumoru niti povećanje djelotvornosti što ukazuje na jaz između pretkliničkih i kliničkih ispitivanja.

3.1.1.2.2 Nanofarmaceutici daunorubicina

Daunorubicin je antitumorski lijek iz skupine antraciklinskih antibiotika, koji je kao i doksorubicin inicijalno izorliran iz vrste *Streptomyces peucetius*. Poznato je da antraciklini mogu ometati različite biokemijske i biološke funkcije eukariotskih stanica, ali točan mehanizam citotoksičnih i/ili antiproliferativnih svojstava daunorubicina još nije u potpunosti razjašnjen. Čini se da lijek inhibira sintezu DNA i RNA koja ovisi o DNA kroz stvaranje molekularnog kompleksa s istom DNA ili kroz interkalaciju planarnih prstenova lijeka između parova nukleotidnih baza, uz odmotavanje dvostruke uzvojnice i sprječavanje glavnih aktivnosti DNA. Daunorubicin može također

ometati aktivnost polimeraze, mijenjajući regulaciju genske ekspresije te uključujući reakcije oksidacije i redukcije, uz stvaranje visoko reaktivnih ili toksičnih slobodnih radikala. Antiproliferativno i citotoksično djelovanje daunorubicina moglo bi biti rezultat jednog ili više gore navedenih mehanizama; a moguće je da postoje i drugi. Daunorubicin ima najveću citotoksičnost u S fazi, ali to nije lijek koji je specifičan za određeni ciklus ili fazu (54).

DaunoXome®

DaunoXome® (Gilead Sciences Ltd, SAD) je liposomski pripravak u obliku koncentrata za otopinu za infuziju. Indiciran je za liječenje Kaposijevog sarkoma povezanog sa HIV-om. Primjenjuje se u obliku intravenske infuzije. Pri pripravi liposoma korištena je citratna sol daunorubicina. Uklapanjem daunorubicina u nepegilirane liposome (srednjeg promjera oko 45 nm) postignuta su različita farmakokinetička svojstva u odnosu na konvencionalni daunorubicin (54). Mali volumen raspodjele ukazuje na manju raspodjelu lijeka u periferna tkiva, dok relativno kratko vrijeme polueliminacije (<10h) ukazuje na relativni brzi unos u MPS. Pri dozi od 80 mg/m², vršna koncentracija lijeka u plazmi iznosila je 33,4-52,3 µg/ml za DaunoXome®, a koncentracija pri primjeni konvencionalne formulacije daunorubicina iznosila je 0,40 µg/ml. Klirens daunorubicina pri primjeni lijeka DaunoXome® iznosi 6.6 ml/min, a 223 ml/min pri primjeni konvencionalne formulacije daunorubicina. Primjena DaunoXome® stoga rezultira zanačajnim povećanjem AUC-a, od približno 36 puta (375,3 naspram 10,33 µg hr/ml). Kao što je slučaj i kod liposomskih pripravaka doksorubicina i kod ovog pripravka je zabilježeno smanjenje kardiotoksičnosti u usporedbi sa slobodnim daunorubicinom (24).

3.1.1.2.3 Nanofarmaceutici citarabina

Citarabin je antineoplastički agens koji djeluje na specifičnu fazu staničnog ciklusa, tj. djeluje samo na stanice koje se nalaze u S-fazi stanične diobe. Intracelularno on se konvertira u citarabin-5'-trifosfat (ara-CTP), koji je njegov aktivni metabolit. Mehanizam djelovanja nije još potpuno jasan, ali izgleda da ara-CTP prvenstveno djeluje inhibicijom sinteze DNA. Ugradnja citarabina u DNA i RNA

može pridonijeti njegovoj citotoksičnosti. Citarabin je citotoksičan za čitav niz proliferirajućih stanica sisavaca u staničnim kulturama (55).

DepoCyte®

DepoCyte® (Pacira Limited, Velika Britanija) je pripravak citarabina sa kontinuiranim oslobađanjem, namijenjen izravnoj primjeni u cerebrospinalnu tekućinu. Liposomski je pripravak koji se temelji na Pacirinoj DepoFoam® tehnologiji. DepoFoam® vezikule su zapravo multivezikularni liposomi (MVL), a glavna strukturna razlika u usporedbi s unilamelarnim ili multilamelarnim liposomima je što MVL sadrže više vodenih odjeljaka unutar jednog liposoma. Za razliku od multilamelarnih liposoma vodeni odjeljci MVL-a nisu koncentrični. Prisutnost ovakvih internih vodenih odjeljaka povećava mehaničku čvrstoću liposoma. Multivezikularna priroda ovakvih liposoma također omogućava da i nakon kidanja vanjske membrane MVL-a ne dolazi do oslobađanja cjelokupnog sadržaja vodenog odjeljka. DepoCyte® je namijenjen za liječenje limfomatoznog meningitisa (životno ugrožavajuća komplikacija limfoma) izravnom primjenom u cerebrospinalnu tekućinu (intratekalno). Ta liposomska formulacija citarabina omogućuje doziranje svaka dva tjedna za razliku od konvencionalnih pripravaka koji zahtijevaju doziranje dva puta tjedno. Tijekom kliničkih ispitivanja u odnosu na pripravak slobodnog citarabina pokazane su veće stope odgovora na liječenje pripravkom DepoCyte® te produljeno vrijeme do progresije bolesti (55, 56).

3.1.1.2.4 Nanofarmaceutici mifamurtida

Mifamurtid (muramil tripeptid fosfatidiletanolamin, MTP-PE) je potpuno sintetski derivat muramil dipeptida (MDP), najmanje imunostimulacijske komponente stanične stijenke *Mycobacterium sp.* koja se javlja u prirodi. Ima slično imunostimulirajuće djelovanje kao i prirodni MDP uz dodatnu prednost duljeg vremena polueliminacije. MTP-PE je specifični ligand NOD2, receptora koji se prvenstveno nalazi na monocitima, dendritičkim stanicama i makrofazima. MTP-PE je potentni aktivator monocita i makrofaga. Aktivacija ljudskih makrofaga mifamurtidom povezana je

sa stvaranjem citokina, uključujući tumor nekrotizirajući faktor (TNF- α), interleukin-1 (IL-1 β), IL-6, IL-8 i IL-12 te adhezijskih molekula, uključujući limfocitni funkcionalni antigen-1 (LFA-1) i međustaničnu adhezijsku molekulu-1 (ICAM-1). *In vitro* tretirani ljudski monociti ubijali su alogene i autologne tumorske stanice (uključujući melanom, karcinom jajnika, kolona i bubrega), ali nisu toksično djelovali na zdrave stanice.

In vivo primjena mifamurtida rezultirala je inhibicijom tumorskog rasta kod miševa i štakora s metastazama na plućima, s karcinomom kože i jetre te s fibrosarkomom. Mifamurtid kao adjuvantna terapija značajno je produljio preživljavanje bez bolesti kod pasa s osteosarkomom i hemangiosarkomom. Točni mehanizam kojim aktivacija monocita i makrofaga mifamurtidom dovodi do antitumorske aktivnosti kod životinja i ljudi nije još poznat (57). MPT-PE se ponaša kao površinski aktivna tvar koja tvori dvosloj. U mediju ulje-voda tvori micelarne strukture i može uklapati u dvosloje drugih lipida, kao što su fosfolipidi. Tijekom razvoja lijeka, sistemska primjena MPTE-PE u životinja dovela je do aktivacije makrofaga s baktericidnim, virucidnim, fungicidnim, paraziticidnim i tumoricidnim posljedicama. Međutim, sistemska primjena vodene otopine MTP-PE, čije molekule su organizirane u micele, rezultirala je pogubnim nuspojavama zbog čega se pristupilo razvoju liposomske formulacije (58).

Mepact®

Mepact® (Takeda France SAS, Francuska) je liposomska formulacija mifamurtida koja je posebno dizajnirana za *in vivo* ciljanje makrofaga. Lijek se primjenjuje putem intravenske infuzije. Djelatnoj tvari muramiltripeptidu (MTP) dodan je fosfatidiletanolamin (PE) u svrhu olakšavanja uklapanja u liposome.

Indiciran je kod djece, adolescenata i mladih odraslih za liječenje resektabilnog nemetastatskog osteosarkoma visokog stupnja malignosti nakon makroskopski potpune kirurške

resekcije, a koristi se u kombinaciji s postoperacijskom polikemoterapijom (57). Budući da je broj bolesnika s osteosarkomom mali, dotična se bolest smatra „rijetkom” te se Mepact označava kao lijek za liječenje rijetkih i teških bolesti od 21. lipnja 2004.

3.1.1.2.5 Nanofarmaceutici paklitaksela

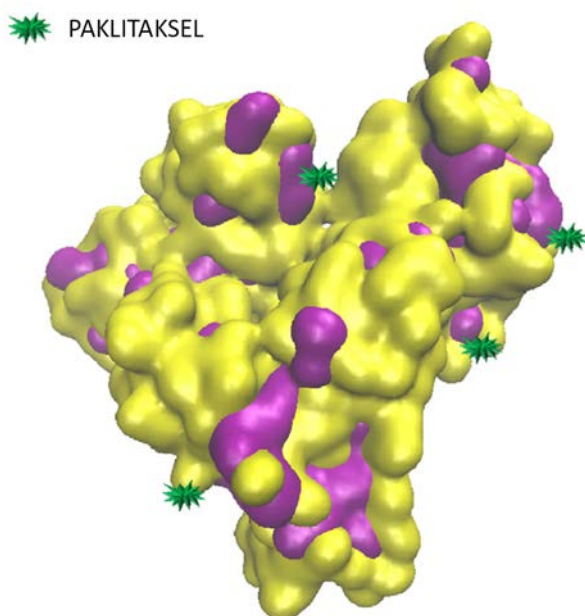
Paklitaksel je antitumorski lijek iz skupine taksana. Otkriven je početkom 60-tih godina prošlog stoljeća u sklopu inicijative Nacionalnog instituta za tumore SAD-a za probir sintetičkih i prirodnih tvari s antitumorskim djelovanjem (5). Prvotno je izoliran iz kore rijetke i vrlo otrovne vrste pacifičke tise. Sve do 80-tih godina prošlog stoljeća kliničku uporabu paklitaksela ograničavale su kako poteškoće s dobivanjem dovoljnih količina, tako i nemogućnost dobivanja prikladne formulacije te vrlo teško topljive djelatne tvari. Krajem 80-tih godina, kada su razvijene nove metode sinteze paklitaksela (polazni materijal je izoliran iz rasprostranjenijih vrsta tise) započinju klinička ispitivanja s paklitakselom, ali i malo bolje topljivim docetakselom. Dolaskom na tržište taksani su imali značajan utjecaj na liječenje i počeli su se koristiti kao prva ili druga linija liječenja brojnih vrsta raka, uključujući i rak pluća, dojke i jajnika. Taksani djeluju na način da se vežu na beta-tubulin podjedinicu čime stabiliziraju mikrotubule u staničnoj citoplazmi. Na taj način je tijekom mitoze spriječeno odvajanje mikrotubula od centromera, što zaustavlja stanični ciklus i pokreće apoptozu.

Razvoj formulacije slabo topljivog paklitaksela za parenteralnu primjenu predstavlja veliki izazov. Prva formulacija paklitaksela je bio Taxol® (Corden Pharma Latina S.p.A., Sermoneta, Italija) u kojoj je paklitaksel otopljen u smjesi Cremofor®-a EL (BASF Corp., Ludwigshafen, Njemačka) i etanola. Međutim, Cremophor® EL može biti vrlo toksičan te često uzrokovati akutne reakcije preosjetljivosti što ograničava dopuštene doze za bolesnika. Akutna toksičnost koja je bila posljedica prisutnosti Cremophor®-a EL u svakodnevnoj kliničkoj praksi nastoji se zbrinuti premedikacijom (5). Ograničavajuća toksičnost u liječenju paklitakselom općenito je neutropenija, što se nastoji ublažiti premedikacijom faktorom stimulacije rasta granulocita (engl. *granulocyte colony stimulating factor*, G-CSF).

Abraxane®

Među najuspješnije formulacije paklitaksela druge generacije spada lijek Abraxane® (Celgene Europe Ltd, Uxbridge, Velika Britanija) i to je ujedno jedini lijek koji se temelji na tehnologiji polimernih nanočestica na tržištu. Formulacija ne sadrži Cremophor®-a EL i klinička ispitivanja su zaista pokazala smanjenje akutne toksičnosti. U slučaju lijeka Abraxane®, smanjenje toksičnosti omogućava primjenu paklitaksela u većim dozama i brzinu infuzije veću od one za lijek Taxol®. Dodatno, nije potrebna premedikacija kako bi se smanjile akutne nuspojave (7) .

Lijek Abraxane® na tržište dolazi kao prašak za suspenziju za infuziju, koji nakon rekonstitucije s fiziološkom otopinom daje koloidnu suspenziju. Formulacija se temelji na albuminskim nanočesticama veličine približno 130 nm na koje je vezan paklitaksel. Sam je paklitaksel zastupljen u nekristaliničnom, amorfnom stanju. Prilikom intravenske primjene nanočestice se brzo raspadnu u topljive komplekse paklitaksela vezanog na albumin, veličine približno 10 nm (59).



Slika 4. Shematski prikaz albuminskih nanočestica na koje je vezan paklitaksel. Lijek je odobren pod zaštićenim imenom Abraxane®(preuzeto i prilagođeno iz reference (5)).

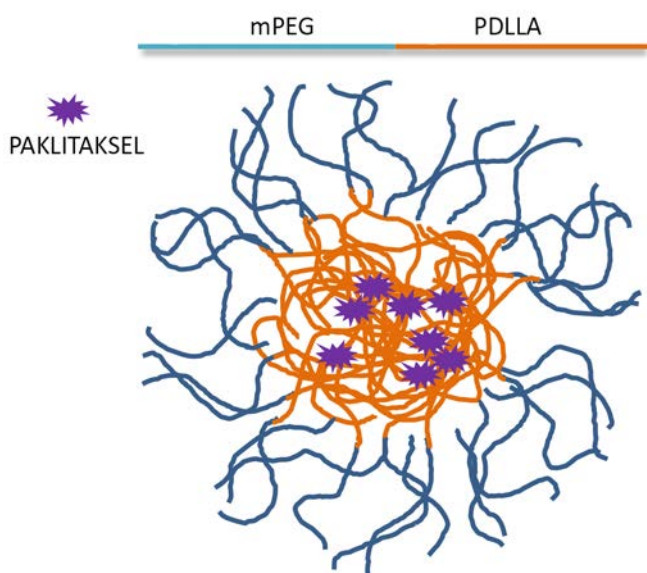
Lijek Abraxane® se pokazao djelotvornijim od lijeka Taxol® u pretkliničkim i kliničkim ispitivanjima. To povećanje djelotvornosti tumači se mogućnosti primjene veće doze zbog smanjenja toksičnosti, ali i pasivnoj i aktivnoj ciljanoj dostavi paklitaksela u tumorsko tkivo. Dokazi iz pretkliničkih ispitivanja upućuju na pojačano nakupljanje albumina u tumoru u usporedbi s okolnim tkivom. Ovaj fenomen je posljedica višestrukih mehanizama koji uključuju EPR učinak te aktivno ciljanje tumora (5). Albumin posreduje u endotelnoj kaveolarnoj transcitozi sastojaka plazme, a *in vitro* ispitivanja pokazala su da prisutnost albumina u lijeku Abraxane® povećava prijenos paklitaksela preko endotelnih stanica. Pretpostavlja se da je taj povećani transendotelni kaveolarni prijenos posredovan albuminskim receptorom gp-60. Smatra se da do povećane akumulacije paklitaksela u području tumora dolazi zbog povećane količine izlučenog kiselog proteina bogatog cisteinom (engl. *secreted protein acidic and rich in cysteine*, SPARC) koji na sebe veže albumin (59). Naime, SPARC je protein do čije povećane ekspresije dolazi u mnogim tumorima. Moguće je da kroz interakciju proteina SPARC i albumina dolazi do nakupljanja lijekova vezanih na albumin u tumoru (5).

Abraxane® se koristi za liječenje metastatskog karcinoma dojke kod bolesnika koji nisu reagirali na prvu liniju liječenja za metastatsku bolest, i za koje nije indicirana standardna terapija antraciklinima. Također, koristi se u kombinaciji s gemcitabinom kao prva linija liječenja u odraslih bolesnika s metastatskim adenokarcinomom pankreasa te u kombinaciji s karboplatinom kao prva linija liječenja karcinoma nemalih stanica pluća u odraslih bolesnika koji nisu kandidati za potencijalno kurativni kirurški zahvat i/ili terapiju zračenjem (59).

Genexol-PM®

Genexol®-PM (Samyang Biopharmaceuticals, Seoul, Južna Koreja) je polimerna micelarna formulacija paklitaksela. Polimerne micle građene su od diblok kopolimera monometoksi-PEG-a i polimera D, L mliječne kiseline (mPEG-PDLLA). Micle su pripravljene metodom solidne disperzije i tvore stabilne strukture promjera 20-50 nm (5). Formulacije je trenutno u kliničkim ispitivanjima za liječenje različitih tumora uključujući fazu IV za metastatski karcinom dojke.

U pretkliničkim ispitivanjima Genexol®-PM je pokazao jedinstvenu raspodjelu. Unatoč višim dozama u odnosu na Taxol® (50 mg/ kg vs. 20 mg/ kg) AUC Genexol®-a PM je bio oko 30 % niži, dok je nakupljanje paklitaksela u tumoru bilo i do 100 % veće. Jedinstvena farmakokinetika paklitaksela po primjeni lijeka Genexol® PM može biti posljedica relativno nestabilne prirode micela, koje vrlo brzo nakon primjene oslobađaju lijek u krvotok. Zbog toga dolazi do brže eliminacije lijeka, ali zbog veće doze poboljšana je raspodjela lijeka u tumor. U pretkliničkim ispitivanjima pokazano je značajno povećanje djelotvornosti u usporedbi s Taxol®-om. Dok je lijek Taxol® usporio rast tumora u miševa, lijek Genexol® PM uzrokovao značajno smanjenje tumorske mase ili čak potpunu remisiju u određenom broju životinja.



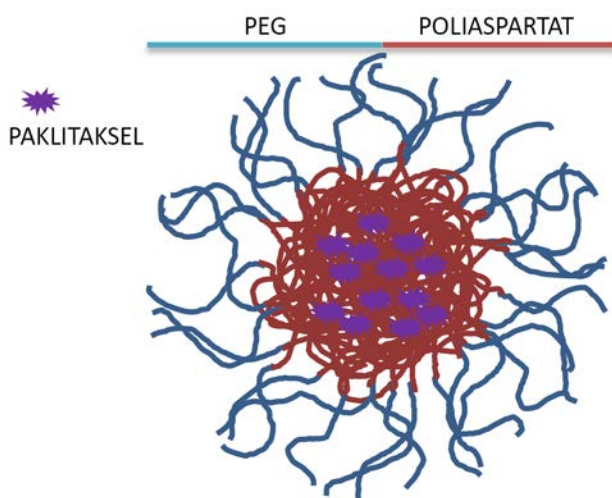
Slika 5. Shematski prikaz polimernih micela s uklopljenim paklitakselom koje su odobrene pod zaštićenim imenom Genexol-PM® u Južnoj Koreji, a trenutno su u fazi III nekoliko kliničkih ispitivanja u SAD-u. Genexol®-PM će najvjerojatnije biti odobren u EU pod imenom CynvilogTM (preuzeto i prilagođeno iz reference (5)).

U kliničkim ispitivanjima, lijek Genexol®-PM je pokazao sličan farmakokinetički profil kao i u pretkliničkim ispitivanjima. U usporedbi s lijekom Taxol®, Genexol®-PM pokazuje sličnu citotoksičnost prema raznim ljudskim stanicama raka, uključujući rak dojki, kolona, jajnika i nemalih stanica raka pluća (60). Genexol®-PM je odobren u Južnoj Koreji, dok je u fazi III nekoliko kliničkih ispitivanja u

SAD-u. Genexol®-PM će najvjerojatnije biti odobren u EU pod imenom Cynvilog™ (61). Dok ova formulacija dozvoljava primjenu mnogo većih doza paklitaksela u odnosu na Taxol®, bez povećane toksičnosti, znatno poboljšanje u djelotvornosti liječenja nije još dokazano. Pretpostavlja se da će odobrenje u SAD biti dano temeljem istih razloga kao i za Doxil®, a to je da ga izmjenjeni profil toksičnosti čini pogodnijim za liječenje određenih podskupina bolesnika (5).

NK 105

NK 105 je micelarna formulacija paklitaksela koja je trenutno u III fazi kliničkih ispitivanja u SAD, a završetak kliničkog ispitivanja predviđa se za prosinac 2017. godine (62). Micele su građene od koopolimera koji se sastoji od hidrofilnog PEG-a te hidrofobnog poliaspartata. Paklitaksel je uklopljen unutar hidrofobne jezgre micela prosječnog promjera 85 nm. Jedan od najimpresivnijih rezultata pretkliničkih ispitivanja bila je razlika u intratumorskoj koncentraciji koja je bila i do 100 puta veća u odnosu na slobodni paklitaksel nakon 72 sata (63).



Slika 6. Shematski prikaz polimernih micela s uklopljenim paklitakselom pod nazivom NK 105. Micele su građene od koopolimera koji se sastoji od hidrofilnog PEG-a te hidrofobnog poliaspartata. U tijeku je III fazi kliničkih ispitivanja u SAD, a završetak kliničkog ispitivanja predviđa se za prosinac 2017. godine (preuzeto i prilagođeno iz reference (5)).

Dostupni rezultati kliničkih ispitivanja pokazuju deveterostruko povećanje AUC unatoč primijenjenim nižim dozama u usporedbi s lijekom Taxol® (150 mg/ kg vs. 210 mg/ kg). Unatoč velikom povećanju ukupnoj izloženosti lijeku, primarna toksičnost paklitaksela, neutropenija, se nije znatno promijenila u odnosu na Taxol®. Ostale hematološke toksičnosti se također malo razlikuju u odnosu na Taxol® dok su reakcije preosjetljivosti značajno smanjene kao i kod drugih nanoformulacija paklitaksela bez Cremophor® CL-a (5).

Xyotax™

Jedna od formulacija paklitaksela druge generacije je i paklitaksel-poliglumeks konjugat (PPX; Xyotax™ ili Opaxio™). Paklitaksel je preko razgradivog linkera povezan s linearnim polimerom L-glutaminske kiseline te tvori sustav veličine oko 48 kDa. Veza paklitaksela i polimera djelotvorno štiti aktivno mjesto taksana sve dok se ne oslobodi iz konjugata. S obzirom da je veza paklitaksela i polimera relativno stabilna, paklitaksel se relativno sporo oslobađa. Kao što je bio slučaj i sa drugim nanosustavima s paklitakselom i ovdje je farmakokinetički profil u odnosu na slobodni paklitaksel značajno promijenjen. Rana pretklinička ispitivanja pokazala su kod nekih tumorskih staničnih linija poboljšanje djelotvornosti tog konjugata lijeka. Uspjeh PPX-a u pretkliničkim ispitivanjima u eradikaciji nekih vrsta tumora potaknula je veliki broj i kliničkih ispitivanja od kojih su neka došla i do faze III. Xyotax™ općenito pokazuje manju toksičnost od ostalih formulacija paklitaksela, a posebno se ističe smanjena alopecija i neutropenija. Što se tiče poboljšanja djelotvornosti ni u ovom slučaju nije dokazan značajan pomak (5) .

3.1.1.2.6 Nanofarmaceutici cisplatina

Cisplatin je prvi antitumorski lijek koji sadrži anorgansku platinu (Pt) i jedan je od najčešće korištenih antitumorskih lijekova. Pripada skupini alkilirajućih lijekova. Smatra se da proizvodi unutarlančane i međulančane ukrižene veze koje modificiraju strukturu DNA te inhibiraju sintezu

DNA. Cisplatin također, u nešto manjoj mjeri, inhibira sintezu proteina i RNA. Izgleda da nije specifičan za fazu staničnog ciklusa (64). Od odobrenja u SAD 1978. godine za liječenje raka testisa i jajnika, koristi se za liječenje različitih maligniteta (rak mokraćnog mjehura, grlića maternice, mezotelioma, rak nemalih stanica pluća, jajnika, testisa, karcinom skvamoznih stanica glave i vrata). Cisplatin se daje sporom intravenskom injekcijom ili infuzijom. Glavna toksičnost cisplatinskog liječenja je ireverzibilna nefrotoksičnost. Nadalje, antitumorska aktivnost je ograničena različitim tipovima stečene rezistencije kao što je pojačan efluks iz stanice, inaktivacija spojevima s tiolnom skupinom (npr. glutation) te povećan popravak oštećene DNK (65).

NC-6004

U nastojanjima da se reducira toksičnost cisplatina razvijene su polimerne micelle s uklopljenim cisplatinom. NC-6004 polimerne micelle građene su od blok kopolimera, pri čemu PEG predstavlja hidrofilni dio kopolimera, a poliglutaminska kiselina hidrofobni dio. U toj formulaciji cisplatin formira kompleks s karboksilnim skupinama poliglutaminske kiseline. NC-6004 se razlikuje od tipičnih micela građanih od amfifilnih polimera jer je nastanak micela potaknut susptitucijom klorida vezanog na platinu (II) sa karboksilnim skupinama glutamata. Spoj je izuzetno stabilan u vodi, a u otopinama bogatim kloridima disocira u unimere što je popraćeno oslobađanjem cisplatina (5) .

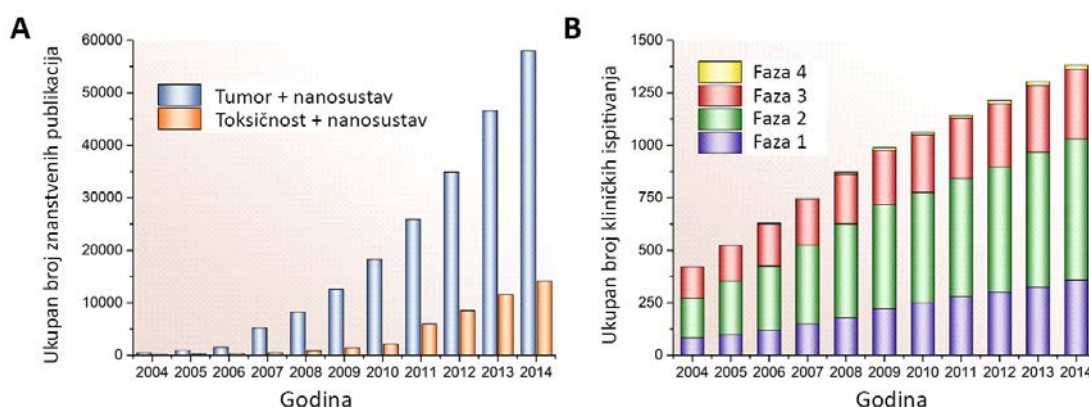
Pretklinička ispitivanja su pokazala značajno produljenje zadržavanja lijeka u krvotoku u odnosu na slobodni ciplatin u miševa, smanjeno nakupljanje u bubrezima te povećano nakupljanje u jetri i slezeni. Također je ispitivanjima nefrotoksičnosti i neurotoksičnosti pokazana smanjena toksičnost u usporedbi sa slobodnim cisplatinom (5). NC6004 je od 2000. godine u kliničkim ispitivanjima (faze I, II, III) i općenito je pokazana manje učestala toksičnost i to smanjenog intenziteta u usporedbi sa slobodnim cisplatinom. S druge strane, zabilježeni su česti slučajevi nepredviđene preosjetljivosti koja je dovela do prekida liječenja. Mehanizam ove preosjetljivosti još uvijek nije razjašnjen. Iako manjeg intenziteta, kod nekih bolesnika je još uvijek zabilježena i nefrotoksičnost pri dozama od 120 mg/m² (unatoč režimu hidracije prije i nakon primjene lijeka). Općenito, smanjena

nefrotoksičnost je svakako bitna prednost naspram cisplatina zbog poboljšane kvalitete života bolesnika.

Unatoč nepredviđenoj preosjetljivosti, rezultati kliničkih ispitivanja se općenito podudaraju s rezultatima pretkliničkih ispitivanja. To se može pripisati produljenom oslobađanju platine iz NC-6004. Produljeno oslobađanje bi moglo prevenirati nagli porast plazmatske koncentracije aktivne platine što zauzvrat smanjuje toksičnost. Ipak, čini se da oslobođena, slobodna aktivna platina djeluje na isti način kao i cisplatin (5).

3.1.1.3. (Ne)uspješnost kliničkog transfera antitumorskih nanofarmaceutika

EPR učinak, odnosno pasivna ciljna dostava, je svakako postao dominantan princip istraživanja dostave antitumorskih lijekova. Optimizam koji je unio u ovo područje rezultirao je tijekom 30 godina velikim novčanim ulaganjima i bezbrojnim znanstvenoistraživačkim satima rada, stotinama projekata i nizom novih nanotehnoloških platformi za dostavu lijekova. Unatoč vrlo intenzivnom znanstvenoistraživačkom radu, temeljenom na ovom učinku, vrlo mali broj nanofarmaceutika transferiran je u kliničko okruženje. U kliničkim ispitivanjima, vrlo često izostaje povećanje djelotvornosti lijeka koje je dokazano u pretkliničkim ispitivanjima.



Slika 7. Ukupan broj znanstvenih publikacija (Web of Science®) i kliničkih ispitivanja (clinicaltrials.gov) tijekom posljednjih 10 godina. (A) Broj znanstvenih radova eksponencijalno raste, a omjer između publikacija u području tumorskih oboljenja i toksikologije se nije mijenjao u posljednje 4 godine. (B)

Broj kliničkih ispitivanja (faza 1, 2, 3, i 4) antitumorskih nanofarmaceutika se stalno povećava. Međutim, ukupan broj kliničkih ispitivanja čini samo 2% ukupnog broja znanstvenih publikacija u tom području (preuzeto i prilagođeno iz reference (17)).

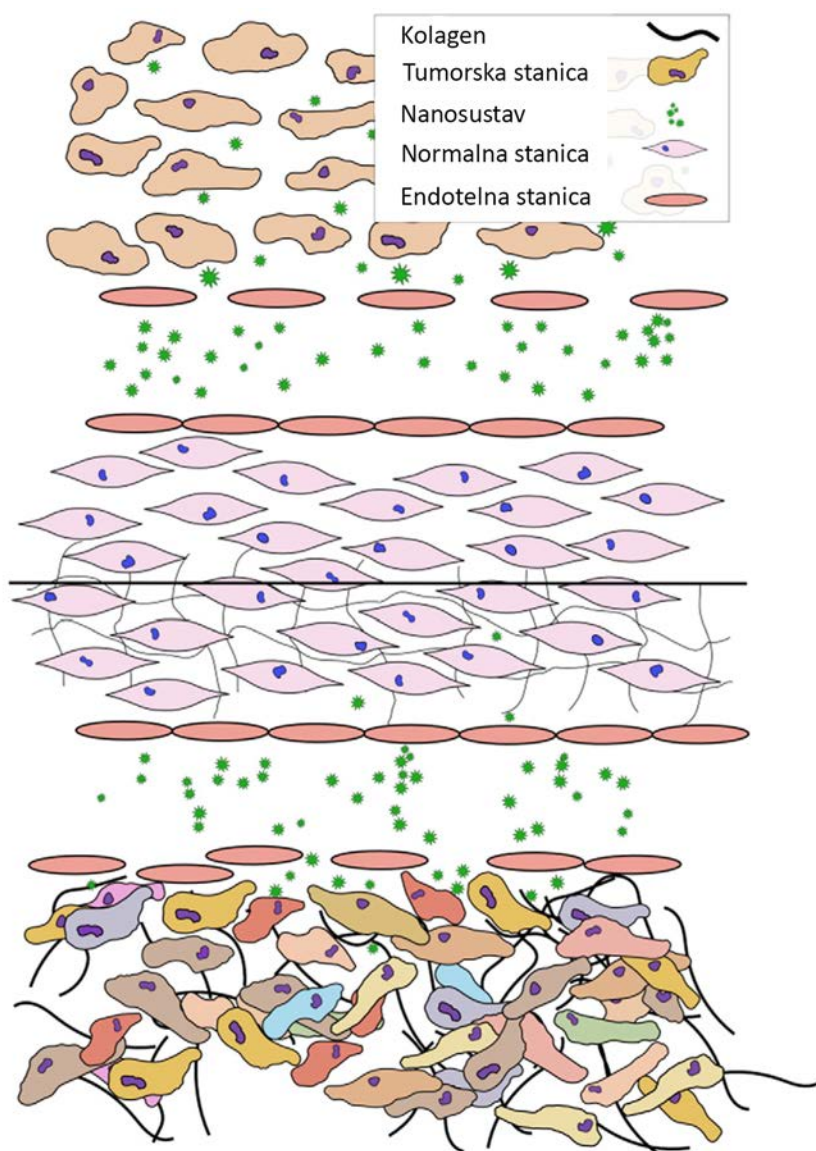
Izostanak napretka u kliničkoj praksi koji bi korelirao s naporima uložnim u istraživanjima koja se oslanjaju na EPR učinak, opravdano je potaknuo i intenzivniju kritiku ovog fenomena. Među najglasnijim kritičarima su i Rakesh Jain i njegove kolege koji su u preglednom članku iz 90-tih godina prošlog stoljeća naveli tri čimbenika koja pridonose slaboj intratumorskoj lokalizaciji makromolekula/nanosustava: (i) nejednakomjerna opskrba tumora krvlju, (ii) povišeni tlak intersticijske tekućine tumora, te (iii) velike transportne udaljenosti u tumorskom intersticiju. I 25 godina kasnije ovi čimbenici su još uvijek glavne prepreke pasivnoj ciljanoj dostavi lijekova (66) .

Nejednakomjerna opskrba tumora krvlju posljedica je neorganizirane mreže tumorskih kapilara i krvnih žila. Novonastale krvne žile često formiraju gustu mrežu na tumorskoj periferiji, a u slučaju većih tumora ne uspijevaju prodrijeti duboko u srž tumorske mase, ostavljajući ju hipoksičnom i kiselom ili čak nekrotičnom (67, 68). Također, uslijed brze proliferacije tumorskih stanica slabi dotok krvi, čime unutar tumorskog tkiva nastaju područja s vrlo malom ili nikakvom opskrbom krvlju. Posljedica toga je neodgovarajuća raspodjela lijekova u tumorskom tkivu (34) te česta otpornost tumora sa slabim protokom krvi na liječenje (69). Nadalje, tumorske stanice su u takvom okruženju posljedično manje aktivne i manje je vjerojatno da će endocitirati veće čestice odnosno nanosustave. Ukupna izloženost antitumorskom lijeku ovisna je o protoku krvi te u područjima lošije prokrvljenosti ne dolazi do izražaja EPR učinak.

Drugi ograničavajući čimbenik dostavi antitumorskih lijekova temeljem EPR učinka upravo je i sam temelj tog učinka, a to je povećana propusnost krvnih žila tumora. Propusne tumorske krvne žile propuštaju u tumorski intersticij kako nanosustave, tako i čitav niz proteina i drugih sastojaka krvne plazme (70, 71). Ta pojava nije karakteristična za zdrava tkiva u kojima su cjelovite krvne žile prepreka nekontroliranom izlasku proteina plazme u intersticij, a u svrhu održavanja osmotskog

gradijenta između kapilara i intersticija. Povećani tlak tumorske intersticijske tekućine, prisiljava nanočestice da napuštaju krvne žile procesom difuzije, umjesto puno djelotvornijim konvektivnim transportom (72, 73).

U dijelove tumora koja nisu prožiljeni, lijek bi morao doprijeti difuzijom kroz tumorsko tkivo. Čak i kod prividno dobro prožiljenih tumora, može postojati znatna tumorska masa vrlo slabe prokrvljenosti koja predstavlja značajnu prepreku difuziji. Postoje eksperimentalni podaci koji pokazuju da su makromolekulama za difuziju od 200 μm kroz intersticij potrebni sati ili čak dani. Difuziju dodatno otežava interakcija sa sastavnicama izvanstaničnog matriksa. Svakako ovakva, za makromolekule nedostupna, tumorska područja onemogućuju dostatno nakupljanje nanosustava u tumorskom tkivu za adekvatno liječenje (74).



Slika 8. Shematski prikaz konceptualnog i više realističnog shvaćanja EPR učinka. Pojednostavljeno shvaćanje EPR učinka podrazumijeva tumorske krvne žile podjednake i široke fenestracije koje omogućavaju brzo nakupljanje lijeka u intersticiju tumora. Stvarna slika je složenija. Fenestracije nisu jednake u svakom području tumorskih krvnih žila. Tumorske stanice i izvanstanični matriks su također neravnomjerno raspoređeni unutar tumora što otežava difuziju/konvekciju nanosustava/lijeka. Tome pridonosi i visoki tlak intersticijske tekućine tumora (preuzeto i prilagođeno iz reference (74)).

Kritičari pasivne dostave lijekova u tumorsko tkivo temeljem EPR učinka smatraju da se klinička primjenjivost tog učinka može predviđati od slučaja do slučaja (74). Smatraju da je upravo jedna od zamki u području istraživanja ciljane dostave antitumorskih lijekova činjenica da se EPR

učinak često precjenjuje i/ ili pogrešno tumači. Znanstvenici koji se bave istraživanjem ciljane dostave antitumorskih lijekova općenito imaju nepotpuno znanje o biologiji tumora te anatomskim i (pato)fiziološkim osobinama tumora, zbog čega zanemaruju činjenicu da je EPR izuzetno heterogen fenomen, koji se razlikuje kako među tumorskim modelima tako i od bolesnika do bolesnika (2) . Čak i sam Hiroshi Maeda u svom recentom članku (75) ističe da su tumori u ljudi (bilo primarni ili metastatski) izuzetno raznoliki te je stoga i heterogenost EPR učinka u humanim tumorima veoma kompleksno pitanje. U cilju prevladavanja spomenute heterogenosti i posljedične loše dostave lijekova u tumore Maeda predlaže nekoliko metoda koje bi mogle potpomoći pozitivne učinke EPR učinka (75). To primjerice uključuje povišenje sistoličkog krvnog tlaka što bi vodilo poboljšanju ekstravazacije nanosustava u tumorsko tkivo te aktivaciju kolagenaza u tumorskom tkivu što bi olakšalo difuziju nanosustava kroz tumorski intersticij.

I kritičari EPR učinka slažu se oko činjenice da je kod brojnih vrsta tumora potrebno potpomoći EPR učinak dodatnim mehanizmima kako bi se ostvarila dostava antitumorskih lijekova do slabije prokrvljenih tumorskih regija. Osim farmakološki aktivnih tvari i metoda koje pospješuju ekstravazaciju (i penetraciju) koje navodi Maeda, neki autori predlažu nanofarmaceutike koji u sebi sadrže i kontrastna sredstva (tzv. teranostici) putem kojih bi se, uz odgovarajuće tehnike vizualizacije, moglo pratiti nakupljanje u tumoru. Tako bi se mogao vršiti probir bolesnika kod kojih tumori pokazuju relativno visok stupanj EPR učinkom posredovane ciljane dostave lijeka, a koji su stoga pogodni za tu vrstu liječenja (76, 77).

3.1.1.4. Animalni modeli u istraživanju EPR učinka

Razumijevanje EPR učinka primarno se temeljilo na rezultatima istraživanja koja su koristila animalne modele, a koji su dosljedno ukazivali da bi EPR trebao imati dalekovidan učinak na djelotvornost liječenja, značajno poboljšavajući terapijski indeks. Doxil®/Caelyx®, Myocet®, Abraxane® i niz drugih formulacija započeli su klinička ispitivanja na osnovu iznimno obećavajućih

pretkliničkih rezultata. Uz iznimku specifičnih oboljenja poput Kaposijevog sarkoma i multiplog mijeloma (karakterizira ih manje prepreka na putu lijeka do tumorskih stanica), malo je kliničkog napretka u usporedbi s konvencionalnim antitumorskim lijekovima. Ovo nepodudaranje u rezultatima pretkliničkih i kliničkih ispitivanja sugerira da animalni modeli koji se koriste za proučavanje intratumorske raspodjele lijeka nisu odgovarajući (74). Pronalaženje odgovarajućih modela čini samu srž moderne znanosti i razumijevanje problematike može biti dobro koliko su dobri animalni modeli korišteni za ispitivanje intratumorske raspodjele lijekova (74).

Do sada korišteni animalni modeli u pretkliničkim ispitivanjima daleko su od idealnih. Najčešće se koriste miševi u kojih tumori nastaju nakon subkutane ili ortotopikalne injekcije tumorskih stanica. Modeli tumora uzgojeni iz jedne stanične linije tijekom nekoliko tjedana bitno se razlikuju od tumora u bolesnika koji nastaju godinama iz kompleksnih tkiva praćeni djelovanjem imunološkog sustava. Osim toga, tumori u miševa mogu činiti i do 10% tjelesne mase, čime takav tumor filtrira značajan dio primijenjene doze lijeka te djeluje kao svojevrsni depo lijeka (74).

Razlike u režimu doziranja također mogu biti razlog pogrešnog tumačenja EPR učinka. Bolesnici obično primaju kemoterapiju u intervalima 2-4 tjedna, kako bi imali dovoljno vremena da se oporave od toksičnog djelovanja citostatika. Tijekom tog perioda i stanice raka se oporavljaju te razvijaju rezistanciju (78, 79). Režim doziranja u miševa je općenito mnogo agresivniji i s kraćim intervalima između primjene lijeka, što tumoru ostavlja manje vremena za oporavak i daljnji razvoj. Kratak životni vijek miševa također ograničava mogućnost dugoročnog praćenja. U većini ispitivanja miševi su konačno i žrtvovani, no čak i u ispitivanjima u kojima su miševi zadržani nakon remisije malo je nade da bi se moglo pratiti preživljenje bez bolesti u istim razmjerima kao u ljudi (74).

S obzirom na očite razlike u veličini, životnom vijeku, fiziologiji, metabolizmu i imunologiji ljudi i miševa, nije iznenađujuće da kod mnogih nanofarmaceutika koji pokazuju obećavajuće rezultate na animalnim modelima izostane uspjeh u kliničkom okruženju (2, 5). Pregledom podataka prikupljenih u pretkliničkim ispitivanjima ustanovljeno je da je vjerojatnost kliničke djelotvornosti

veća u slučaju pozitivnih rezultata na više ksenografskih modela (80). Nužni su napori da se pronađu realističniji animalni modeli za ispitivanje ciljane dostave antitumorskih lijekova, kako bi vršio bolji probir kandidata za klinička ispitivanja.

3.1.2. Aktivna ciljana dostava antitumorskih lijekova

Aktivna ciljana dostava lijekova, poznata još kao i ligandima posredovana ciljana dostava, temelji se na prisustvu liganada na površini terapijskog nanosustava, koji prepoznaju membranske receptore prekomjerno eksprimirane na površini tumorskih stanica ili antigene prisutne samo kod tumorskih stanica, a u cilju konačnog unosa u tumorske stanice. Cilj tog pristupa je značajno smanjenje ili eliminacija dostave antitumorskih lijekova u zdrava tkiva (22). Razlikujemo neselektivnu i selektivnu aktivnu ciljnu dostavu. Neselektivna aktivna dostava temelji se na prisustvu liganada na površini terapijskog sustava koji prepoznaju membranske receptore do čije prekomjerne ekspresije dolazi u tumorskim stanicama. Primjer tih receptora su transferin receptor i receptor folne kiseline koje u manjoj mjeri nego tumorske stanice eksprimiraju i zdrave stanice. Selektivna aktivna dostava temelji se na prisustvu liganada na površini terapijskog sustava koji prepoznaju antigene prisutne samo kod tumorskih stanica (primjerice membranski antigen specifičan za tumorske stanice prostate, engl. *prostate specific membrane antigen*, PSMA).

Priprava nanosustava za aktivnu dostavu je vrlo složena, a ograničavajuće čimbenike predstavljaju konjugacija liganda na površinu nanosustava kao i vrste dostupnih liganada. Uz fizičko-kemijska svojstva nanosustava koja određuju partikulokinetiku te dostavu lijeka u tumor, ključnu ulogu predstavlja gustoća liganada na površini nanosustava (3). Interakcija sustava s ciljnim antigenom pojačana je multivalentnom prirodom arhitekture nanosustava: veći broj liganda vezan na površinu nanosustava povećava mogućnost vezanja na željeni cilj (3).

Ligandi mogu biti različite molekule poput antitijela, proteina, peptida, nukleinskih kiselina, ugljikohidrata ili malih molekula. Ciljni supstrati koje ligandi prepoznaju mogu biti proteini, glikani ili lipidi prisutni na površini tumorskih stanica.

Naravno, i kod aktivne ciljane dostave sistemski klirens nanosustava određuje koncentraciju lijeka u krvi, a time i količinu koja se raspodjeljuje u tumorsko tkivo. Kako je protok krvi kroz tumor niži u usporedbi s organima MPS-a, povećanje afiniteta nanosustava za tumorsko tkivo ne može

uvijek kompenzirati sistemski klirens. Stoga terapijske nanosustave za aktivnu dostavu lijeka treba dizajnirati tako da što dulje se zadržavaju u cirkulaciji. Slično, molekularni ciljevi su obično smješteni izvan krvožilnog sustava tumora pa nanosustavi za aktivnu ciljanu dostavu lijeka, u procesu dolaska do odabranog cilja ovise o EPR učinku. To objašnjava zašto strategije aktivnog ciljanja ne mogu značajno promijeniti profil raspodjele nanosustava i zašto je potrebno optimirati vrijeme cirkulacije nanosustava krvotokom u svrhu optimalnog ciljanja (3). Općenito, aktivnim ciljanjem nastoji se poboljšati prepoznavanje ciljnih stanica kao i unos sadržaja nanočestica u stanice, prije nego ukupna akumulacija lijeka u tumoru (2).

Odabir odgovarajućeg liganda ključan je za djelotvornost nanočestica za aktivnu ciljanu dostavu antitumorskog lijeka. Prvi ciljajući sustavi sadržavali su uglavnom antitijela kao ligande zbog njihove specifičnosti i dostupnosti (81). Kasnije su kao ligandi opisani i drugi proteini, peptidi, ligandi temeljeni na nukleinskim kiselinama i male molekule.

Nekoliko pripravaka nanočestica s vezanim antitijelima nalazi se u fazi kliničkih ispitivanja. MCC-465, MBP-426 i SGT-53 su primjeri nanočestica s vezanim fragmentima antitijela (Tablica 2). MCC-465 je pripravak pegiliranih imunoliposoma s uklopljenim doksorubicinom koji su funkcionalizirani F(ab')₂ fragmentom humanog monoklonskog antitijela (36). U pretkliničkim ispitivanjima taj pripravak je pokazao pozitivne rezultate sa zadovoljavajućom raspodjelom u organizmu i vrlo učinkovitom dostavom doksorubicina u stanice raka želuca. Dokazana je povećana antitumorska aktivnost u odnosu na doksorubicin ili njegove „neciljajuće“ pripravke u ksenograft animalnim modelima nekoliko vrsta humanog raka želuca. Rezultati su pokazali da se MCC-465 dobro tolerira te je preporučena faza II kliničkog ispitivanja (36).

U kliničkim ispitivanjima su također i dvije transferin-ciljajuće liposomske formulacije: MBP-426 (Mebiopharm Co., Ltd, Japan) s uklopljenim oksaliplatinom i SGT53-01 (SynerGene Therapeutics, SAD) s uklopljenom DNA koja kodira p53 tumor supresorski protein. U kliničkom ispitivanju faze II procjenjuje se učinkovitost MBP-426 u kombinaciji s leukovorinom (u vodi topljivi

oblik folata) i/ili 5-fluorouracilom u bolesnika s metastaskim gastroezofagealnim adenokarcinomom. SG53-01 je pripravak koji se preko jednostrukog lanca fragmenta antitijela ciljano veže na transferinski receptor na površini tumorskih stanica u cilju dostave gena za p53. Nalazi se u fazi I kliničkih ispitivanja kako bi se utvrdila sigurnost primjene u kombinaciji s docetakselom (36).

Tablica 2. Nanotehnološke platforme temeljene na aktivnoj ciljanoj dostavi (preuzeto iz (36)).

Nanotehnološki pristup	Naziv formulacije/zaštićeno ime lijeka	Proizvođač	Formulacija	Indikacija	Klinički status	Kliničko ispitivanje/ referenca
Liposomi	MCC-465	National cancer center; Japan	GAH[F(ab') ₂] Imunoliposomi s doksorubicinom	Rak želuca	Faza 1	Matsumura, Gotohet i sur.2004
	MBP-426	Mebiopharm Co., Ltd	Transferin ciljajući liposomi s oksaliplatinom	Adenokarcinom	Faza 1/2	NCT00964080
	SGT53-01	SynerGene Therapeutics	Transferin-ciljajući liposomi s p53 genom	Neoplazme	Faza 1	NCT00470613
	MM-302	Merrimack Pharmaceuticals	Her2-ciljajući liposomi s doksorubicinom	Rak dojke	Faza 1	NCT01304797
Polimerne nanočestice	BIND-014	BIND Therapeutics	PSMA ciljajuće polimerne nanočestice s uklopljenim docetakselom	Uznapredovali ili metastatski rak	Faza 1	NCT01300533
				Rak prostate	Faza 2	NCT01812746
				Karcinom nemalih stanica pluća	Faza 2	NCT01792479
	CALAA-01	Arrowhead Reasearch Corp.	Transferin ciljajuća cikloestrinska formulacija siRNA	Solidni tumori	Faza 1	NCT00689065 (prekinuto)
	Abraxane®	Celgene Corp.	Paklitaksel vezan na albuminske nanočestice	Metastatski rak dojke	odobreno	
				Rekurentni i refraktorni limfom	Faza 1/2	NCT01555853
				Metastatski rak gušterače	Faza 2	NCT01461915

Između ostalog, važno je spomenuti i CALAA-01, prvi pripravak koji je 2008. godine započeo klinički razvoj za ciljanu dostavu siRNA (od eng. *small interference RNA*) u ljudi. Radi se transferin receptor-ciljajućim cikloestrinskim polimernim nanočesticama s uklopljenom siRNA, koja samostalno ne može ući u tumorske stanice te joj je potrebna dostava u citoplazmu tumorske

stanice kako bi pokazala antitumorsko djelovanje. Unatoč svom potencijalu daljnji razvoj tog pripravka je nedavno obustavljen. Međutim, ova je formulacija uspjela dostaviti velike količine uklopljene siRNA, nakon endocitoze nanočestica oslobađanjem u endosome. Time je svakako pokazana potreba za daljnim istraživanjem sličnih sustava u cilju optimizacije *in vivo* dostave siRNA (36).

Unatoč značajnom napretku postignutom u pretkliničkim istraživanjima vezanim za aktivnu ciljanu dostavu lijekova, samo su nanofarmaceutici s monoklonskim antitijelima kao što su Zevalin® (Spectrum Pharmaceuticals B.V., Nizozemska), Mylotarg® (Pfizer INC, SAD; povučen u SAD 2010. godine, u EU nije dobio odobrenje), Ontak® (Eisai Co. of North America, SAD; nije odobren u EU), Bexxar® (Corixa Corporation, SAD; nije odobren u EU), Adcetris® (Takeda Pharma A/S, Danska) te Kadcyła® (Roche Registration Limited, Velika Britanija) odobreni za kliničku upotrebu (2).

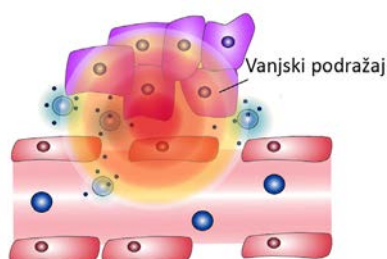
3.1.2.1. Aktivna ciljana dostava u endotelne stanice

Kako bi se prevladali nedostaci pasivne i aktivne ciljane dostave u tumorsko tkivo, razvila se ideja o aktivnoj ciljanoj dostavi u endotelne stanice tumorskih krvnih žila (2). Naime, za razliku od antitumorskih nanofarmaceutika kojima je ciljno mjesto učinka tumorska stanica, nanofarmaceutici kojima je ciljno mjesto učinka tumorska vaskulatura ne moraju prodrijeti duboko u tumorsko tkivo što onda isključuje probleme vezane uz ekstravazaciju i penetraciju kroz stanične slojeve pericita, stanica glatkih mišića i/ili fibroblasta. Cilj tog liječenja bio bi uništiti tumorske krvne žile solidnih tumora čime bi, zbog manjka kisika i nutrijenata, došlo do odumiranja tumorskog tkiva (82). Jedna od važnih prednosti ovog pristupa temelji se na činjenici da su markeri tumorskih endotelnih stanica eksprimirani neovisno o tipu tumora, a neovaskularizacija je karakteristična za većinu tumora. I slučaju aktivne dostave u endotelne stanice, neophodno je osigurati dovoljno dugo zadržavanje nanosustava u sistemskej cirkulaciji kako bi se povećala vjerojatnost vezanja za metu. Mete koje su razmatrane u dosadašnjim istraživanjima su VEGF i njegovi receptori, receptori za proteine izvanstaničnog matriksa odnosno integrini, vaskularna adhezijska molekula (engl. *vascular cell*

adhesion molecule-1, VCAM-1) koja inducira adheziju stanica, ključni korak u angiogenezi, i matriksne metaloproteaze koje su odgovorne za razgradnju izvanstaničnog matriksa, također ključni korak u angiogenezi, ali i metastaziranju (82). Ligandi korišteni u tu svrhu uključuju antitijela koja se vežu VEGF ili se vežu za njegove receptore, fragment antitijela L19 (veže se na EDB domenu onkofetalnog proteina fibronektina), nekoliko cikličkih i linearnih derivata oligopeptida RGD (Arg-Gly-Asp) koji se vežu za integrine te peptid NGR (Asn-Gly-Arg) koji se veže na metaloproteazu aminopeptidaza-N/CD13. Proveden je velik broj pretkliničkih ispitivanja nanofarmaceutika koji se temelje na ideji dostave lijeka u tumorske endotelne stanice. Primjerice jedan od obećavajućih nanofarmaceutika L-19 ciljajući interleukin -2, ušao je u klinička ispitivanja (u tijeku kliničko ispitivanje faze I/II). Za očekivati je da će u budućnosti sve više nanofarmaceutika te vrste ući u klinička ispitivanja (2).

3.1.3. Oslobađanje lijeka iz terapijskog nanosustava ovisno o određenom podražaju

Unaprjeđenje ciljane dostave antitumorskih lijekova nastoji se postići razvojem nanofarmaceutika osjetljivih na podražaj. Radi se o nanosustavima koji oslobađaju uklopljeni/vezani lijek po dolasku u tumorsko tkivo djelovanjem različitih podražaja poput topline, svjetla, ultrazvučnog ili magnetskog polja (2). Jedan od primjera ove skupine nanofarmaceutika je svakako i ThermoDox® (Celsion Corporation, SAD). Radi se o pripravku koji se temelji na termosenzitivnim pegliranim liposomima s uklopljenim doksorubicinom, koji prilikom zagrijavanja na temperaturu $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$ oslobađaju lijek unutar nekoliko sekundi (trenutno u fazi III kliničkih ispitivanja za liječenje hepatocelularnog karcinoma). To svojstvo omogućuje doksorubicinu da na tumorsko mjesto dođe u udarnoj koncentraciji, a bez izazivanja sistemske toksičnosti povezane s primjenom slobodnog lijeka. Za dostavu toplinske energije potrebne za oslobađanje doksorubicina pogodna je radiofrekventna ablacija (RFA) koja se i inače koristi u liječenju hepatocelularnog karcinoma. Kombinacijom ThermoDoxa® i RFA prevladavaju se problemi neučinkovitosti RFA u slučaju tumora većih od 3 cm i perifernih tumorskih stanice te se postiže sinergistički učinak. Naime, doksorubicin oslobođen pomoću RFA iz liposomskog pripravka povećava učinkovitost ablacije na marginama tumora dok ablacija povećava citostatski učinak samog doksorubicina. Indikacije u fazi istraživanja za primjenu ThermoDox®-a su različite vrste tumora dojke te metastaze na kostima (83).



Slika 9. Shematski prikaz oslobađanja lijeka iz terapijskog nanosustava ovisno o određenom podražaju. Radi se o nanosustavima koji oslobađaju uklopljeni/vezani lijek po dolasku u tumorsko tkivo djelovanjem različitih podražaja poput topline, svjetla, ultrazvučnog ili magnetskog polja (preuzeto i prilagođeno iz reference (17)).

Pri razvoju formulacija osjetljivih na podražaj veliki izazov predstavlja njihova stabilnost. Zabilježeni su slučajevi oslobađanja značajne količine lijeka i prije primjene odgovarajućeg podražaja ili su pak sustavi bili toliko stabilni da su uvjeti potrebni za induciranje oslobađanja gotovo nekompatibilni s fiziološkim procesima (sami podražaji postaju toksični). U prevladavanje tih nedostataka uloženo je mnogo napora od strane znanstvene zajednice te industrije bilo kroz poboljšanja nanosustava osjetljivih na podražaj ili razvoj sustava koji omogućuju što djelotvorniji i/ili selektivniji podražaj (npr. kateteri koji se temelje na optičkim vlaknima, a omogućuju izlaganje svjetlu dubokih tkiva ili fokusirani ultrazvuk visokog intenziteta vođen magnetskom rezonancijom koji istodobno generira, kvantificira i kontrolira zagrijavanje dubokih tkiva) (2).

3.1.4. Poboljšanje topljivosti slabo topljivih lijekova nanotehnološkim pristupom

Nanotehnološkim pristupom pokušalo se pristupiti i problemu dostave slabo topljivih djelatnih tvari. Procjenjuje se da je trenutno čak 70 % novih djelatnih tvari slabo topljivo u vodi (84) te oni lijekovi čiji je razvoj je prekinut zbog problema topljivosti mogu postati ponovo predmetom istraživanja uklapanjem u odgovarajuće terapijske nanosustave (16). Nekoliko nanotehnoloških pristupa je do sad primijenjeno za razvoj formulacija slabo topljivih djelatnih tvari, a uključuju polimerne micelle, polimerne nanočestice, liposome, polimer-lijek konjugate, čvrste lipidne nanočestice te nanokristale. Značajan uspjeh postignut je u dostavi paklitaksela i docetaksela, a ti lijekovi već su opisani jer, osim poboljšanja topljivosti, njihov učinak se temelji i na pasivnoj ciljanoj dostavi u tumor. Primjerice, to su vezano za paklitaksel lijek Genexol®-PM (Samyang Biopharmaceuticals, Seoul, Južna Koreja), lijek Abraxane® te paklitaksel-poliglumeks konjugat (PPX; Xyotax ili Opaxio).

U slabo topljive djelatne tvari svrstava se kamptotecin (inhibitor topoizomeraze I, enzima uključenog u replikaciju DNA), koji iako otkriven 60-ih godina prošlog stoljeća, zbog slabe topljivosti i ozbiljnih nuspojava nije dobio odobrenje za stavljanje u promet. Ciklodestrinske polimerne

nanočestice s kamptotecinom (CRLX 101, Cerulean Pharma Inc., SAD) nalaze se u fazi II kliničkih ispitivanja kao i formulacija koja se temelji na razgranatom PEG polimeru na koji je vezan derivat kamptotecina irinotekan (EZN-2208, Enzon Pharmaceuticals, Inc., SAD) (85).

3.1.5. Poboljšanje stabilnosti antitumorskih lijekova nanotehnološkim pristupom

Nanotehnološkim pristupom pokušava se također razriješiti i problem nestabilnosti odnosno prerane razgradnje lijeka nakon intravenske primjene. Primjerice antitumorski biofarmaceutici koji se temelje na nukleinskim kiselinama podliježu razgradnji nukleazama u krvi te se ujedno i brzo eliminiraju iz sistemske cirkulacije. Stoga je neophodno njihovo uklapanje u nanosustave kako bi se osigurala njihova stabilnost, a potom i ciljna dostava u tumorske stanice. Zbog svoje veličine i anionske prirode nukleinske kiseline ne mogu difundirati preko stanične membrane te zahtjevaju aktivnu internalizaciju u stanice putem endocitoze. Razvijan je veliki broj sustava za dostavu siRNA i microRNA, temeljenih na kompleksima polielektrolita koji sadržavaju kationske polimere ili lipide, no još uvijek velik dio njih pokazuje nedostatke u području stabilnosti, specifičnosti ili biokompatibilnosti. Razvoj nekih formulacija je dosegao kliničku fazu kao primjerice već spomenuta formulacija CALAA-01 (Calando Pharmaceuticals, SAD) (2). Iako je to kliničko ispitivanje započeto 2008. godine nedavno prekinuto, radi se o prvim nanočesticama za ciljanu dostavu siRNA u ljudi, koje su ušle u fazu kliničkog ispitivanja (36, 86).

3.2. Antitumorski nanofarmaceutici u liječenju metastatskih tumora

Metastaziranje je proces širenja stanica primarnog tumora u druge dijelove organizma. Metastaziranje je složeni proces, a uključuje migraciju stanica primarnog tumora u krvotok i njihovo širenje kroz tijelo, zaustavljanje u nekom udaljenom organu i izlazak iz krvotoka te stvaranje novih krvnih žila oko sekundarnog tumora. Primarni tumor je obično izlječiv, međutim, udaljene metastaze koje nastaju od njega su najčešći uzrok smrti u oboljelih od tumora. Stoga metastaze predstavljaju jedan od najvećih izazova u liječenju, posebice kad se uzme u obzir da su prisutne kod većeg broja bolesnika u vrijeme postavljanja dijagnoze. Lokalno ograničeni solidni tumori se općenito liječe operativno i/ ili radioterapijom, a kemoterapija se primjenjuje s ciljem smanjenja volumen tumora prije operativnog zahvata/radioterapije ili preveniranja/liječenja metastaza nakon lokalne intervencije. Svi dosadašnji razvijeni antitumorski nanofarmaceutici dizajnirani za ciljanje i liječenje solidnih tumora (2). Potencijal antitumorskih nanofarmaceutika u liječenju metastatskih tumora temelji se na činjenici da se nanosustavi uglavnom nakupljaju u organima u kojima najčešće dolazi do pojave metastaza, kao što su jetra, pluća i limfni čvorovi (87). Ostali pristupi uključuju i djelovanje antitumorskih nanofarmaceutika na imunološki sustav te primjenu nanofarmaceutika u ograničeno područje organizma gdje se nalaze metastaze.

Vezano za aktivaciju imunološkog sustava, jedan primjer nanofarmaceutika u istraživanju je polimer-lijek konjugat PK1 (doksorubicin-HPMA konjugat) modificiran s humanim imunoglobulinom (Hulg) (88). U kliničkom ispitivanju zabilježena je aktivacija limfocitima aktiviranih stanica ubojica (engl. *lymphocyte-activated killer cells*, LAK) i prirodnih stanica ubojica (engl. *natural killer cells*, NK). U pretkliničkim ispitivanjima, zabilježeni su slični rezultati vezano za imunostimulativno djelovanje nekoliko drugih polimernih nanofarmaceutika temeljenih na antitijelima, a koji su stoga iskazali veću djelotvornost u usporedbi s polimer-lijek konjugatima bez antitijela (89-91). Nadalje, nekoliko konjugata lijek-polimera s antitijelima pokazalo se učinkovitima u poticanju antitumorskog imuniteta (tj. relativno dugotraje imunološke zaštite), što pokazuje primjer miševa koji su nakon liječenja bili otporni na ponovno apliciranu letalnu dozu stanica raka (92).

Jedna od alternativnih strategija za unapređenje liječenja metastatskih tumora nanofarmaceuticima može biti i lokalno ograničena dostava lijeka. U slučaju metastatskog karcinoma jajnika, bolesnicama se npr. mogu intraperitonealno primijeniti nanofarmaceutici koji aktivno ciljaju stanice tumora jajnika. Lijek bi tada bio prisutan u odjeljku (peritonealna šupljina) u kojem se nalaze i metastaze i unutar kojeg se očekuje djelotvorno ciljanje i liječenje metastaza. Sličan pristup se može primijeniti i na druge abdominalno lokalizirane i lokalno metastazirane tumore, kao što su karcinomi jetre, kolorektalni i karcinom gušterače. Povezano s tim, za liječenje metastaza karcinoma jetre treba razmotriti i intraarterijsku primjenu aktivno ciljajućih nanofarmaceutika u jetrenu arteriju. Kako se tumori općenito, a posebice tumori jetre, oslanjaju na arterijsku opskrbu kisikom i nutrijentima, to bi omogućilo dostavu veće količine stanično-specifičnih nanofarmaceutika kako do primarnih tumora jetre tako i do metastaza jetre (2).

3.3. Racionalni pristup razvoju antitumorskih nanofarmaceutika

Sudbina terapijskog nanosustava u organizmu, a time i lijeka vezanog ili uklopljenog u nanosustav, ovisi o fizičko-kemijskim svojstvima sustava. Veličina, oblik, površinski naboj i druga svojstva površine (e.g. pegilacija, ligandi) te sastav nanočestica određuju partikulokinetiku sustava odnosno farmakokinetiku lijeka, penetraciju u tumorsko tkivo i bioraspoloživost lijeka u tumoru.

Tri glavne faze u dostavi lijeka u tumor uključuju (i) zadržavanje u sistemske cirkulaciji, (ii) ekstravazaciju i penetraciju u tumor te (iii) interakciju s tumorskim stanicama. Svaka od tih faza zahtjeva određena fizičko-kemijska svojstva sustava iz čega postaje jasno kakav izazov predstavlja razvoj učinkovitog i sigurnog antitumorskog nanofarmaceutika.

Veličina nanočestica utječe na partikulokinetiku te stupanj tumorske akumulacije, s obzirom da je ona jedan od faktora koji utječu na stupanj uklanjanja iz krvi putem bubrega, jetre i slezene. Donja granica veličine čestica određena je fenestriranom strukturom endotela glomerularnih kapilara (22). Kao što je spomenuto ranije, čestice veće od 10 nm ne mogu prijeći tu barijeru. Drugu donju granicu određuje fenestrirana struktura endotela jetre (promjer fenestri 50-100 nm). Stoga čestice manje od 50 nm dospijevaju u jetreni parenhim. Gornju granicu veličine nanočestica određuju dva čimbenika: permeabilnost krvnih žila tumora i stupanj filtracije u slezeni (10). Ovisno o tipu tumora, fenestracije endotela tumorskih kapilara mogu biti promjera 200-2000 nm. Ispitivanjem biodistribucije liposoma u rasponu od 30 do 400 nm pokazno je da su 4 sata nakon intravenske primjene liposomi veličine 100-200 nm postigli četiri puta veće koncentracije u tumorskom tkivu u usporedbi s liposomima manjim od 50 nm odnosno većim od 300 nm. Nakon prolaska kroz jetru ukloni se 25 % injicirane doze liposoma manjih od 50 nm i većih od 300 nm, u usporedbi s 10 %-tnim smanjenjem injicirane doze liposoma veličine 100 i 200 nm. Nadalje, čestice veće od 400 nm uklanjaju se putem slezene (40-50 % injicirane doze). Čestice veličine 300-400 nm zadržavaju se u slezeni, ali ovisno o fleksibilnosti i obliku mogu izbjeći fagocitozu makrofazima slezene te dolazi do njihovog oslobađanja u sistemske cirkulaciju kroz nekoliko dana.

Pokazano je da se i čestice promjera nekoliko stotina nanometara mogu nakupljati u tumorskom tkivu. U ispitivanju s dekstranom kao modelnom makromolekulom, povećanjem molekulske mase s 3,3 kDa na 2 MDa smanjena je permeabilnost za dva reda veličine. Veće molekule su se također nakupljale u tumoru, ali su primarno bile smještene blizu površine krvnih žila u tumoru, dok su manje molekule prodirale dublje u intersticij tumora uz homogeniju raspodjelu unutar tumora. Ekstrapolacijom navedenih podataka dobivenih za makromolekule, za postizanje pasivnog ciljanog učinka postavljena je gornja granica veličine od 400 nm. Veće čestice ne mogu difundirati u tumorsko tkivo u dovoljnim količinama te nemaju klinički značaj (22).

Unutar određene vrste nanočestica, veličina će svakako utjecati na adsorpciju proteina što određuje uklanjanje iz cirkulacije putem MPS-a. Primijećeno je da je adsorpcija proteina na česticama veličine 80 nm manja u odnosu na veće čestice (171 nm i 240 nm), što je posljedica veće površinske gustoće PEG-a na manjim česticama. U konačnici je klirens čestica veličine 80 nm bio dvostruko manji u odnosu na veće čestice. Nadalje, i nakupljanje u tumoru unutar 24 sata bilo je dvostruko veće za čestice veličine 80 nm (93).

S obzirom na sve navedeno, zaključeno je da optimalni promjer nanočestica s obzirom na zadržavanje u cirkulaciji i povećano nakupljanje u tumorskom tkivu iznosi oko 100 nm (10).

Oblik nanočestica svakako spada u ključne parametre koji mogu utjecati na vrijeme cirkulacije i stupanj nakupljanja u tumorskom tkivu (10). Primjerice pokazano je smanjenje interakcije filamentoznih micela (filomicela) s MPS-om u usporedbi s pegiliranim nanonosačima sferičnog oblika. Stoga su filomicelle pokazale zadržavanje u krvotoku do tjedan dana, za razliku od sferičnih pegliranih nosača koji su uklonjeni iz krvotoka unutar 2 dana (10). Jednistivena hidrodinamička svojstva filomicela rezultirala su značajnim produljenjem vremena cirkulacije.

Oblik je vrlo važan i pri internalizaciji nanočestica u tumorske stanice. Istraživanja su pokazala da je internalizacija sferičnih nanočestica promjera 14 nm i 75 nm 3,75-5 veća u odnosu na štapičaste čestice dimenzije 14x75 nm. Pretpostavlja se da bi razlika u obliku i stupnju zakrivljenosti

nanočestica mogla biti uzrokom različite internalizacije u stanice tumora. To je rezultat različite dodirne površine s receptorima na membranama stanica kao i različite gustoće liganada na površini nanočestica.

Površina nanočestica je primarni medij preko kojeg čestice ulaze u interakciju s okolinom. Za nanočestice su takve interakcije posebno važne zbog velikog omjera njihove površine i volumena. Površina se može prilagoditi oblaganjem hidrofilnim polimerom i funkcionalizacijom, čime se utječe na međudjelovanje nanočestice i okoline (22). Naboj na površini nanočestica važan je fizički čimbenik koji utječe na partikulokinetiku (10). Površinski naboj može utjecati na profil opsonizacije te stupanj prepoznavanja od strane MPS-a odnosno na sveukupni profil zadržavanja u cirkulaciji. Negativni površinski naboj može povećati, smanjiti ili pak biti bez utjecaja na uklanjanje nanočestica iz krvotoka. Za pozitivni površinski naboj se općenito smatra da smanjuje vrijeme zadržavanja nanočestica u krvotoku (3). Vezano za raspodjelu u tumorskom tkivu, neutralne nanočestice (± 10 mV) prevladavaju i do tri puta veće udaljenosti u odnosu na svoje nabijene analoge te pokazuju homogeniju tkivnu raspodjelu. Kationske čestice pokazuju interakciju s negativno nabijenim sastavnicama izvanstaničnog matriksa kao što je hijaluronska kiselina, dok anionske čestice ulaze u interakciju s pozitivno nabijenim kolagenom (94, 95). Spomenute interakcije svakako umanjuju intratumoralni transport nanočestica.

U ispitivanjima na životinjama, unatoč smanjenom vremenu cirkulacije krvotokom, nepegilirani, pozitivno nabijeni liposomi su postigli više koncentracije u tumorskom tkivu u usporedbi s njihovim negativno nabijenim analogima. Pozitivni naboj vjerojatno favorizira interakciju nanočestica s epitelom tumorskih krvnih žila i smanjuje njihovu difuziju dublje u tumor, dok istovremeno spriječava ponovno vraćanje u sistemsku cirkulaciju. Na tom fenomenu se može primjerice temeljiti dostava lijekova u endotel tumorskih krvnih žila (3).

Nanočestice koje su sterički stabilizirane (npr. vezanjem PEG) i imaju slabo pozitivni ili negativni površinski naboj pokazuju nizak stupanj međudjelovanja (čestica-čestica i čestica-okoliš).

Unutrašnja površina krvnih žila kao i stanična površina obiluje mnogim negativno nabijenim komponentama koje odbijaju negativno nabijene nanočestice. Također, kako površinski naboj čestica raste (bilo u pozitivnom ili negativnom smjeru) povećava se i stupanj fagocitiranja od strane makrofaga i uklanjanja putem MPS-a.

Pri razvoju antitumorskih nanofarmaceutika susrećemo se s izazovima koje se razlikuju od onih pri razvoju konvencionalnih lijekova. Sustavnim istraživanjima iskristaliziralo se nekoliko područja u koja je potrebno uložiti dodatne napore kako bi razvoj antitumorskih nanofarmaceutika bio uspješniji, a to su (i) razvoj robusnih metoda kontrole kakvoće za točnu karakterizaciju veličine, oblika i sastava nanočestica, (ii) proizvodni procesi koji se mogu prenijeti iz laboratorijsko u industrijsko mjerilo, (iii) smanjenje nespecifične citotoksičnosti terapijskih nanosustava, (iv) optimizacija površinskih svojstava u poboljšanja ciljane dostave a smanjenja nespecifične adsorpcije, (v) razvoj metoda za kvantificiranje gustoće liganada na površini nanočestica te (vi) dizajn multifunkcionalnih nanofarmaceutika za kombinacijsko liječenje (4).

4. RASPRAVA

Razvoj terapijskih nanosustava za dostavu antitumorskih lijekova pokazao se izuzetno zahtjevnim. Razlozi tome su nedostatak svjesnosti o fiziološkim i anatomskim ograničenjima, ali i ograničenjima vezanim za pripravu nanočestica za dostavu antitumorskih lijekova. Relativno malen broj odobrenih antitumorskih nanofarmaceutika ukazuje da je potrebno unaprijediti razumijevanje fiziološki i anatomske nametnutih ograničenja kao i razumijevanje sudbine nanočestica u organizmu ovisno o njihovim fizičko-kemijskim svojstvima. Općenite smjernice za razvoj antitumorskih nanofarmaceutika prikazane su u Tablici 3. Treba imati na umu da nisu svi uvjeti primjenjivi na sve vrste nanofarmaceutika (24).

Kroz brojna provedena pretklinička i klinička ispitivanja antitumorskih nanofarmaceutika identificirano je nekoliko značajnih ograničenja uspješnoj ciljanoj dostavi lijeka u tumorsko tkivo. Smatra se da je jedan od glavnih razloga, a o čemu je već bilo govora u poglavlju 3.1, razmatranje samo pozitivnih učinaka EPR učinka na dostavu lijeka u tumor. Drugi vrlo važan razlog je ograničena penetracija nanofarmaceutika u srž tumora. Vezano za aktivnu ciljanu dostavu, ograničenje predstavlja neracionalni dizajn formulacija čija bi proizvodnja u industrijskom mjerilu bila nemoguća ili preskupa. Zatim, pri razvoju nanofarmaceutika ne promišlja se dovoljno o njihovom uklapanju u klinički relevantne kombinacijske režime. Nadalje, zanemaruje se činjenica da su metastaze, a ne solidni tumori najveća medicinska potreba. Iz svega navedenog razvidno je, da umjesto razvoja sve većeg broja formulacija nanofarmaceutika, napore je potrebno usmjeriti na konceptualne nedostatke tumorske ciljane dostave kao i razvoj strategija za njihovo prevladavanje (2).

Tablica 3. Zahtjevi pri dizajnu antitumorskih nanofarmaceutika (preuzeto iz (24)).

Funkcija	Željena svojstva	Moguće strategije
Cirkulacija	•stabilnost pri protoku medija na 37°C	•izbjegavanje vezanja proteina plazme
		•neutralni ili mali negativni zeta potencijal
Raspodjela	•smanjiti tkivni (periferni) volumen	
	•smanjiti vezanje na endotel	
	•smanjiti paracelularni transport	
Eliminacija	•smanjiti opsonizaciju	•pegiliranje
	•smanjiti prepoznavanje od strane MPS-a	•d > 8 nm ne bi li se izbjegao brzi klirens bubrezima
	•povećati vrijeme cirkulacije	
	•smanjiti brzi bubrežni klirens	
Nakupljanje u tumoru	•povećati ekstravazaciju preko tumorske vaskulature	•d < 200 nm za prijenos preko propusne vaskulature putem EPR učinka
		•održavanje visoke koncentracije u plazmi
		•poboljšanje EPR učinka
Unos u tumorske stanice	•povećati prepoznavanje i vezanje za tumorske stanice	•vezanje liganda za aktivno ciljanje tumorskih stanica na površinu nanosustava
Oslobađanje lijeka	•oslobađanje lijeka/cijepanje veze polimer-lijek	•aktivno ili pasivno oslobađanje lijeka u tumoru
	•prijenos u stanične odjeljke	•povećati endosomski bijeg čestica koje su podvrgnute endocitozi

Iako je znatan broj nanofarmaceutika odobren u posljednjih nekoliko desetljeća, nedostatak specifičnih općih protokola za njihovu karakterizaciju, pretklinički i klinički razvoj umanjuje potencijal njihovog transfera u kliničku praksu. Globalni regulatorni trendovi nisu još definirani iako se posljednjih godina ulažu na tom području veliki naponi.

Nanofarmaceutici su vrlo kompleksni lijekovi koji zahtijevaju specifičnu karakterizaciju. Dodatno, svojstva ovako složenih sustava su lako promjenjiva, bilo kao posljedica malih promjena u polaznim sirovinama ili manjih modifikacija proizvodnog procesa. Čak i vrlo male promjene koje dovode do ograničenih promjena u strukturi, mogu dovesti do značajnih promjena bioloških svojstava te raspodjele u organizmu (96). Stoga *in vitro* karakterizacija nanofarmaceutika mora biti usko povezana s *in vivo* karakterizacijom (97). O njihovoj ocjeni, karakterizaciji i razumijevanju ključnih svojstava ovisi klinička primjena uključujući izbjegavanje neželjenih djelovanja, kao što je potencijalna neželjena imunološka reaktivnost. Nameće se potreba razvoja novih i robusnih metoda kontrole

kakvoće s ciljem djelotvornog praćenja i karakterizacije njihovih fizičko-kemijskih svojstava (npr. veličina i raspodjela veličina, morfologija, površinski naboj), ali i sadržaja lijeka, oslobađanja lijeka, procjene metabolizma, vezanja proteina i specifičnog unosa u stanice. Ovakve bi metode omogućile daljnje povezivanje fizičko-kemijskih svojstava s biološkim svojstvima, biokompatibilnošću i terapijskim učinkom. Tablica 4 prikazuje parametre za procjenu kakvoće i sigurnosti nanofarmaceutika.

Tablica 4. Parametri evaluacije kakvoće i sigurnosti nanofarmaceutika (preuzeto iz (98)).

Parametar		Cilj	Procjena
Fizičko-kemijska svojstva		Karakterizacija: Prosječna veličina, raspodjela veličina čestica i agregacija Morfologija Površinski naboj Kristaliničnost Rigidnost/ fleksibilnost Kemijska i molekularna struktura te arhitektura	Kakvoća intermedijarnog proizvoda
Proizvodni procesi		Kontrola kritičnih proizvodnih točaka	Kakvoća lijeka
Mikrobiologija	Mikrobiološka kontaminacija	Ispitivanje sterilnosti	Mikrobiološka čistoća
	Razina endotoksina	Procijena prisutnosti pirogena	
	Razina virusa/mikoplazmi	Kvantifikacija dušikovog oksida (indirektna procjena) Ispitivanje sterilnosti	
Imunologija	Stvaranje citokina Citotoksičnost stanica ubojica Unos u makrofage Aktivacija komplementa Vezanje proteina plazme Proliferacija leukocita <i>In vivo</i> imunološki odgovor	Identifikacija i kvantifikacija induciranih citokina Procjena: • Učinak na glavne funkcije NK stanica (prepoznavanje i uništavanje) • Fagocitoza nanosustava • Učinak na kaskadu sustava komplementa • Površinski naboj i učinak hidrofobnosti • Utjecaj na odgovor leukocita • Funkcija stanica ubojica • Razina citokina • Imunoglobulini • Proliferacija T (Th1/ Th2) i B stanica	Imunogeničnost (imunosupresija ili imunostimulacija)/ sigurnost
Hematologija	Vrijeme koagulacije Agregacija trombocita Hemoliza	Ocjena: • Učinak na koagulacijske faktore • Utjecaj na koagulacijsku kaskadu • Učinak na eritrocite	Interakcija s krvlju/ biokompatibilnost/ sigurnosti
<i>In vivo</i> ispitivanja toksičnosti pojedinačne doze		Toksičnost spram različitim organima/ stanicama, poglavito stanicama imunološkog sustava	Toksičnost/sigurnost
Ispitivanja raspodjele		Partikulokinetika i farmakokinetika	Sigurnost lijeka

Jedan od najvećih izazova u razvoju i prijenosu nanofarmaceutika u kliničko okruženje je i prilagodba proizvodnih procesa na industrijsko mjerilo. Ključna je identifikacija, razumijevanje i kontrola kritičnih točaka svakog pojedinog proizvodnog procesa. Primjena koncepta kvalitete ugrađene u dizajn“ (engl. *Quality by design*; QbD), kao što je procesno-analitička tehnologija (PAT) osigurava pristup kontroli kakvoće tijekom same proizvodnje (engl. *in-line/at-line quality*). QbD pristup promiče ideju da u razvoj formulacije treba ugraditi kontrolu nad kakvoćom, djelotvornosti i sigurnosti. Taj pristup uključuje jasnu definiciju željenog svojstva (tj. očekivanu specifikaciju ciljane formulacije), dizajn nanosustava (tj. osobine nanosustava koje osiguravaju djelotvornost i sigurnost), dizajn proizvodnje (tj. uspostavljanje parametara procesa koji osiguravaju reproducibilnost svojstava nanosustava) i dizajn terapije (tj. modaliteti liječenja koji osiguravaju djelotvornost i sigurnost lijeka). Na postupak razvoja optimalne formulacije utječe složeni splet međusobno povezanih ili neovisnih parametara, koji uključuju kritične parametre postupka proizvodnje, kritična svojstva u kakvoći lijeka i klinička svojstva kao što su sigurnost i djelotvornost (7, 96) .

Na izazove koje sa sobom nosi razvoj nanofarmaceutika ukazala je EMA 2006. godine kroz nacrt mišljenja s općim preporukama (tzv. „*Reflection paper*“) o humanim lijekovima temeljenim na nanotehnologiji (99). Nacrti mišljenja razvijaju se s ciljem komuniciranja trenutnog stanja rasprave ili kao poziv za davanje komentara za razvoj određenih lijekova ili specifičnih tema. Nacrti mišljenja također mogu ponuditi okvir za raspravu ili pojašnjenja posebno u područjima u kojima znanost brzo napreduje ili je iskustvo ograničeno. Iako sami po sebi ne nude znanstvene, tehnološke ili regulatorne smjernice, mogu pridonijeti budućem razvoju potrebnih smjernica, s obzirom da predstavljaju jasne stavove i trenutna očekivanja regulatornih tijela (100).

Nanofarmaceutici, zbog svog složenog mehanizma djelovanja zahtijevaju dodatnu stručnu ekspertizu za procjenu njihove kakvoće, sigurnosti, djelotvornosti te upravljanja rizicima. Iako su trenutno regulirani konvencionalnim regulatornim okvirom, EMA kroz niz aktivnosti nastoji dati dodatne regulatorne smjernice za specifična područja te pomoć u obliku znanstvenih savjeta za

određena ispitivanja. CHMP je 2009. godine osnovao multidisciplinarnu skupinu stručnjaka (*ad hoc expert group on nanomedicines*) s ciljem pružanja podrške kroz stručna mišljenja o novim znanstvenim dosezima i rasprave s međunarodnim partnerima na području nanofarmaceutika. Nadalje, 2011. godine CHMP je započeo razvijati nekoliko nacrti mišljenja s ciljem razvoja znanstvenih i regulatornih smjernica unutar specifičnog područja razvoja nanofarmaceutika. Tako je 2013. godine izdana konačna verzija nacrti mišljenja o potrebnim podacima za intravenske liposomske pripravke razvijene u odnosu na inovatorski liposomski pripravak (101), a početkom 2014. stupio je na snagu i zajednički nacrt mišljenja MHLW/EMA o razvoju lijekova temeljenih na blok kopolimernim micelama (102). Taj dokument se može smatrati gotovo „revolucionarnim“ i to na dva načina: obrađuje temu tehnologije u razvoju prije nego je izašla na tržište i rezultat je suradnje EMA-e i japanskog Ministarstva zdravlja, rada i socijalne skrbi (engl. *Ministry of health, labour and welfare*, MHWL) čime predstavlja prvi primjer globalnog regulatornog dokumenta na području nanofarmaceutika (96). Također je izdan i nacrt mišljenja o oblaganju površine nanočestica namijenjenih za parenteralnu primjenu (103). Navedeni nacrti mišljenja jasno ukazuju na trenutne regulatorne izazove s kojima se suočava ne samo EMA već i ostala regulatorna tijela, a to je ocjena prve generacije nanosličnih lijekova (odnosno lijekova razvijenih u odnosu na prvu generaciju nanofarmaceutika) kao i budućih, sve složenijih nanofarmaceutika. Također je i Europski direktorat za kakvoću lijekova (EDQM) 2011. godine, na inicijativu švicarske agencije za lijekove Swissmedic, uspostavio specifičnu radnu skupinu za nebiološke kompleksne lijekove (NBC, eng. *non –biological complex working party*). Zadatak te radne skupine je izraditi monografije Europske farmakopeje za nebiološke kompleksne lijekove u koje se svrstavaju antitumorski nanofarmaceutici (104).

U svrhu dokazivanja sličnosti s određenim referentnim nanofarmaceutikom potrebno je provesti ispitivanja usporedivosti kako bi se prikupili podaci koji dokazuju sličnu prirodu po pitanju kakvoće, sigurnosti i djelotvornosti. U tom smislu se smatra da konvencionalna ispitivanja bioekvivalencije nisu primjenjiva te značajni regulatorni izazov predstavlja određivanje opsega kliničkih podataka koje bi proizvođači trebali podastrijeti regulatornom tijelu pri traženju odobrenja

za nanoslične lijekove. EMA i FDA su zasad usvojili princip ocjene od slučaja do slučaja (*case by case evaluation*), koji je iterativan, prilagodljiv i fleksibilan.

Nanoslični lijekovi, kao što je primjerice LipoDox (pegilirani liposomi s uklopljenim doksorubicinom), odobravani su do sada i temeljem generičkog pristupa (98). Međutim, dokazi o terapijskoj nejednakosti koji su prikupljeni pri ocjeni nanokompleksa (koloidni sustavi složene strukture koja se sastoji polinuklearnog željezovog (III) hidroksida obloženog najčešće šećerima) podigli su regulatornu osviještenost u ocjeni nanosličnih lijekova što je dovelo i do izdavanja ranije spomenutih nacrtu mišljenja. Smatra se da bi princip dokazivanja sličnosti, kao što je usvojeno u ocjeni biosličnih lijekova, trebalo primijeniti i na nanofarmaceutike. Svakako u tom smislu postoji potreba za dodatnim smjernicama koje bi obrađivale različite skupine nanosličnih lijekova.

Potencijalne terapijske prednosti nanofarmaceutika mogu se ostvariti samo ako su takvi proizvodi dostupni i komercijalno održivi. Stoga regulatorni zahtjevi moraju biti dovoljno strogi da osiguraju sigurnost i kakvoću nanofarmaceutika, ali se također mora uzeti u obzir i potencijalni negativni utjecaj prekomjerne regulacije na uvođenje inovativnih lijekova na tržište. Mnogi inovativni nanofarmaceutici usmjereni na rijetke bolesti neće dospjeti na tržište zbog činjenice da su troškovi dobivanja odobrenja za stavljanje lijeka u promet mnogo viši u usporedbi s očekivanom prodajom (7). Također, dodatno smanjenje troškova liječenja očekuje se ulaskom nanosličnih lijekova na tržište. Tu se nameće i pitanje zamjenjivosti inovatorskog i nanosličnog lijeka, odnosno postojanje dokaza o istom. Dok u SAD to pitanje regulira FDA (ne daju odobrenje tzv. „follow on“ verziji nanofarmaceutika bez dokaza o zamjenjivosti s inovativnim lijekom), u Europi je pitanje zamjenjivosti nacionalna odluka te nije pod ingerencijom EMA-e (98).

Potrebu za diseminacijom globalnog akademskog, industrijskog i regulatornog iskustva te konstruktivnom raspravom na području nanofarmaceutika prepoznali su europski i međunarodni stručnjaci i regulatorne agencije EU, SAD-a, Japana i Kanade. EMA je 2010. godine bila domaćin prve međunarodne radionice o nanofarmaceuticima, koja je okupila više od 200 sudionika iz cijelog

svijeta. Rasprava je bila fokusirana na postojeće nanofarmaceutike, kao i na one u razvoju te je pokrila nekoliko specifičnih aspekata kao što su karakterizacija, raspodjela u organizmu i interakcije nanofarmaceutika s biološkim sustavima. Glavni cilj takve interaktivne komunikacije je usmjeriti razvoj nanofarmaceutika prema pravodobnom i učinkovitom prijenosu nanofarmaceutika iz istraživačkih laboratorija u kliničku primjenu. Osim aktivnosti pri EMA-i, postoje druge inicijative čiji je cilj jačanje veza između akademske zajednice i industrije te promicanje istraživanja i razvoja nanofarmaceutika. Jedna od tih inicijativa, Europsko udruženje za nanofarmaceutike (engl. *European Society for Nanomedicine*; ESNAM), osnovano je 2007. godine. Europska tehnološka platforma za nanolijekove (engl. *European Technology Platform Nanomedicine*; ETPN), inicijativa vođena od strane industrije i podržana od strane Europske komisije, bavi se primjenom nanotehnologije za postizanje pomaka u zdravstvu i jačanja inovativnosti. Primjer suradnje između EU i SAD-a je „Joint Workshop“, skupina usmjerena na istraživanje nanosigurnosti, otvorena znanstvenicima, političarima, regulatornim tijelima, administratorima, donositeljima odluka (iz akademske zajednice, istraživačkih instituta i industrije) te tijelima iz EU i SAD-a. Prvi „Joint Workshop“ se održao 2011. godine u Washingtonu. Drugom „Joint Workshop-u“, održanom 2012. godine, domaćin je bio Finski institut za zaštitu zdravlja na radu (11). Početkom 2014. godine u SAD-u je organiziran i „Product Quality Research Institute Workshop“ (PQRI) na kojem su također međunarodni predstavnici akademije, industrije i regulatornih tijela, uključenih u razvoj nanofarmaceutika, raspravljali o dosadašnjim iskustvima te o upravljanju mogućim rizicima koji proizlaze iz korištenja „nanomaterijala“ u proizvodnji lijekova, a u cilju usmjeravanja napora za razvoj budućih regulatornih smjernica. Cilj ove radionice bio je obraditi ključna područja kakvoće, sigurnosti i djelotvornosti nanofarmaceutika s posebnim naglaskom na: (i) pregled znanstvenih dostignuća na polju analitičkih metoda za karakterizaciju nanomaterijala te mogu li se iste primijeniti za kontrolu kakvoće; (ii) razmjenu iskustava o djelatnim tvarima uklopljenim u različite nanosustave s obzirom na kakvoću, sigurnost i djelotvornost pripravaka; (iii) raspravu o načinima upravljanja mogućim rizicima koje nose „nanomaterijali“ od faza ranog razvoja pa kroz čitav životni ciklus lijeka; predstaviti iskustvo i

perspektive različitih regulatornih tijela; (iv) kroz diskusiju identificirati područja u kojima su potrebna dodatna istraživanja o utjecaju nanosustava na apsorpciju, raspodjelu, metabolizam, izlučivanje i toksičnost lijeka.

Nakon ovog značajnog skupa, FDA je u lipnju 2014. godine izdala vodič za industriju koji razmatra uključuju li proizvodi koje regulira FDA (npr. lijekovi, hrana, kozmetika) primjenu nanotehnologije te daje u tom smislu neobvezujuće preporuke (97). Za razliku od FDA i drugih globalno utjecajnih regulatornih tijela, EMA je usvojila radnu definiciju nanofarmaceutika. Ovaj termin odnosi se na pripravke osmišljene za kliničku primjenu, s najmanje jednom sastavnicom u nanometarskom području, što im daje određena specifična svojstva. Istovremeno takav pripravak mora odgovarati definiciji lijeka prema europskoj legislativi (farmakološki, imunološki ili metabolički način djelovanja/ in vivo dijagnostik).

EMA i u praktičnom smislu na različite načine nudi potporu kompanijama koje se bave razvojem nanofarmaceutika kroz tzv. ITF (od engl. *Innovation Task Force*), znanstvene savjete uz opciju i paralelnog znanstvenog savjeta pri FDA, a također je 2005. osnovala i ured za mala i srednje velika poduzeća-SME (engl. *small- and medium sized enterprises office*). ITF, je multidisciplinarna skupina stručnjaka koja nudi prostor za rani dijalog s podnositeljima zahtjeva i to kroz sastanke na kojima je moguće raspraviti znanstvena i tehnološka pitanja u nastajanju kao i njihov potencijalni regulatorni utjecaj. Ovakvi sastanci se ne naplaćuju s obzirom da im je cilj omogućiti neformalnu razmjenu informacija te usmjeravanje u ranoj fazi razvojnog procesa. Unutar ITF je osnovana ciljana skupina čiji su fokus nanotehnološki znanstveni i regulatorni aspekti. Kroz instituciju znanstvenog savjeta CHMP pruža EU pogled na znanstvena pitanja koja nisu pokrivena ili odstupaju od postojećih smjernica. S obzirom da su, u odnosu na druga područja, iskustva s nanofarmaceuticima ograničena, podnositelje zahtjeva se potiče da zatraže znanstveni savjet u ranim razvojnim fazama. Iako EMA ovu uslugu naplaćuje, za mala poduzeća (najčešće uključena u razvoj nanofarmaceutika) omogućeni su značajni popusti (do 90%) kroz SME (97).

5. ZAKLJUČAK

- Put komercijalizacije antitumorskih lijekova dugačak je i obilježen značajnim rizicima, a nanotehnološki pristup je jedan od načina koji bi mogao pridonijeti uspješnijem razvoju tih lijekova.
- Povećanje učinkovitosti i sigurnosti antitumorske terapije povezano je s mogućnošću selektivnog ciljanja oboljelog tkiva, prevladavanja bioloških barijera te „inteligentnog odgovora“ na mikrookolinu tumora kako bi se antitumorski lijek dostavio na mjesto učinka.
- Uklapanjem antitumorskih lijekova u odgovarajuće terapijske nanosustave mogu se optimirati biofarmaceutska i farmakokinetička svojstva lijeka, a time povećati djelotvornosti i/ili sigurnosti već poznatih, ali i novih molekula, kandidata za antitumorske lijekove.
- S obzirom na broj provedenih pretkliničkih istraživanja, transfer u kliničko okruženje je relativno neuspješan čemu su uzrok nedovoljno poznavanje tumorske patofiziologije, odnosno nerazumijevanje bioloških barijera, nedogovarajući animalni modeli u pretkliničkim istraživanjima, usredotočenost na razvoj sve složenijih nanofarmaceutika te nemogućnost prevođenja iz laboratorijskog u industrijsko mjerilo.
- Napori u istraživanju i razvoju novih formulacija antitumorskih lijekova moraju biti popraćeni istraživanjima koja se bave mijenjanjem tumorskog okoliša, kako bi postao prijemčljiviji za liječenje.
- Partnerstvo i razmjena znanja akademske zajednice, industrije i regulatornih tijela nužni su da se osigura dostupnost antitumorskih nanofarmaceutika bolesnicima.
- Potencijalne terapijske prednosti nanofarmaceutika mogu se ostvariti samo ako su takvi proizvodi dostupni i komercijalno održivi. Stoga regulatorni zahtjevi moraju biti dovoljno strogi da osiguraju sigurnost i kakvoću nanofarmaceutika, ali se također mora uzeti u obzir i potencijalni negativni utjecaj prekomjerne regulacije na uvođenje inovativnih lijekova na tržište.

6. LITERATURA

1. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmakologija Geber J, urednik. Golden Marketing-Tehnička knjiga; 2005, str.
2. Lammers T, Kiessling F, Hennink WE, Storm G. Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *J Control Release*. 2012;161:175-87.
3. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;66:2-25.
4. Wei A, Mehtala JG, Patri AK. Challenges and opportunities in the advancement of nanomedicines. *J Control Release*. 2012;164:236-46.
5. Stirland DL, Nichols JW, Miura S, Bae YH. Mind the gap: a survey of how cancer drug carriers are susceptible to the gap between research and practice. *J Control Release*. 2013;172:1045-64.
6. Nanomedicine European Technology Platform: 2020 Contribution of Nanomedicine to Horizon 2020: white paper to the Horizon 2020 Framework Programme for Research and Innovation – recommendations from the nanomedicine community. 2013, Available from: <http://www.etp-nanomedicine.eu/public/press-documents/publications/etpn-publications/etpn-white-paper-H2020>. Accessed November 24, 2015.
7. Hafner A, Lovric J, Lakos GP, Pepic I. Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:1005-23.
8. Davis ME, Chen ZG, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7:771-82.
9. Jain RK, Stylianopoulos T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7:653-64.
10. Ernsting MJ, Murakami M, Roy A, Li SD. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. *J Control Release*. 2013;172:782-94.
11. Valencia PM, Pridgen EM, Perea B, Gadde S, Sweeney C, Kantoff PW, et al. Synergistic cytotoxicity of irinotecan and cisplatin in dual-drug targeted polymeric nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)*. 2013;8:687-98.
12. Xu X, Xie K, Zhang X-Q, Pridgen EM, Park GY, Cui DS, et al. Enhancing tumor cell response to chemotherapy through nanoparticle-mediated codelivery of siRNA and cisplatin prodrug. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110:18638-43.
13. Jabir NR, Tabrez S, Ashraf GM, Shakil S, Damanhour GA, Kamal MA. Nanotechnology-based approaches in anticancer research. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:4391-408.
14. Chidambaram M, Manavalan R, Kathiresan K. Nanotherapeutics to overcome conventional cancer chemotherapy limitations. *J Pharm Pharm Sci*. 2011;14:67-77.
15. Koziara JM, Whisman TR, Tseng MT, Mumper RJ. In-vivo efficacy of novel paclitaxel nanoparticles in paclitaxel-resistant human colorectal tumors. *J Control Release*. 2006;112:312-9.
16. Guo S, Huang L. Nanoparticles containing insoluble drug for cancer therapy. *Biotechnol Adv*. 2014;32:778-88.
17. Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *J Control Release*. 2015;200:138-57.
18. Baxalta: Oncaspar, Sažetak opisa svojstava lijeka. 2016, Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/003789/human_med_001949.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. Accessed May 24, 2016.
19. Takeda: Adcetris, Sažetak opisa svojstava lijeka. 2016, Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002455/human_med_001588.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. Accessed May 24, 2016.
20. Roche: Kadcyła, Sažetak opisa svojstava lijeka. 2016, Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002389/human_med_001712.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. Accessed 24.05.2016.

21. Chang HI, Yeh MK. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:49-60.
22. Steichen SD, Caldorera-Moore M, Peppas NA. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *Eur J Pharm Sci*. 2013;48:416-27.
23. Pepić I, Lovrić J, Filipović-Grčić J. How do polymeric micelles cross epithelial barriers? *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;50:42-55.
24. Dawidczyk CM, Kim C, Park JH, Russell LM, Lee KH, Pomper MG, et al. State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: lessons learned from FDA-approved nanomedicines. *J Control Release*. 2014;187:133-44.
25. Duncan R. Development of HPMA copolymer-anticancer conjugates: clinical experience and lessons learnt. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61:1131-48.
26. Lammers T. Improving the efficacy of combined modality anticancer therapy using HPMA copolymer-based nanomedicine formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010;62:203-30.
27. Lammers T, Subr V, Peschke P, Kuhnlein R, Hennink WE, Ulbrich K, et al. Image-guided and passively tumour-targeted polymeric nanomedicines for radiochemotherapy. *Br J Cancer*. 2008;99:900-10.
28. Roy V, LaPlant BR, Gross GG, Bane CL, Palmieri FM, North Central Cancer Treatment G. Phase II trial of weekly nab (nanoparticle albumin-bound)-paclitaxel (nab-paclitaxel) (Abraxane) in combination with gemcitabine in patients with metastatic breast cancer (N0531). *Ann Oncol*. 2009;20:449-53.
29. Lobo C, Lopes G, Baez O, Castrellon A, Ferrell A, Higgins C, et al. Final results of a phase II study of nab-paclitaxel, bevacizumab, and gemcitabine as first-line therapy for patients with HER2-negative metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2010;123:427-35.
30. European Commission: VOLUME 2A, Procedures for Marketing Authorization. Chapter 4, centralised procedure. 2006, Available from: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-2/a/chap4rev200604_en.pdf. Accessed November 25, 2015.
31. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nano*. 2007;2:751-60.
32. Jain RK. Transport of molecules across tumor vasculature. *Cancer Metastasis Rev*. 1987;6:559-93.
33. Jain RK. The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics. *Nat Med*. 1998;4:655-7.
34. Jang SH, Wientjes MG, Lu D, Au JL. Drug delivery and transport to solid tumors. *Pharm Res*. 2003;20:1337-50.
35. Jones A, Harris AL. New developments in angiogenesis: a major mechanism for tumor growth and target for therapy. *Cancer J Sci Am*. 1998;4:209-17.
36. Fonseca NA, Gregorio AC, Valerio-Fernandes A, Simoes S, Moreira JN. Bridging cancer biology and the patients' needs with nanotechnology-based approaches. *Cancer Treat Rev*. 2014;40:626-35.
37. O'Brien ME, Wigler N, Inbar M, Rosso R, Grischke E, Santoro A, et al. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 2004;15:440-9.
38. Gabizon A, Shmeeda H, Barenholz Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42:419-36.
39. Janssen-Cilag: Caelyx Product information, Summary of product characteristics. 2015, Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000089/human_med_000683.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. Accessed June 25, 2015.
40. Swenson CE, Perkins WR, Roberts P, Janoff AS. Liposome technology and the development of Myocet (liposomal doxorubicin citrate). *The Breast*. 2001;10:1-7.

41. Teva: Myocet, Summary of product characteristics. Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000297/human_med_000916.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. Accessed May 24, 2016.
42. Leonard RC, Williams S, Tulpule A, Levine AM, Oliveros S. Improving the therapeutic index of anthracycline chemotherapy: focus on liposomal doxorubicin (Myocet). *Breast*. 2009;18:218-24.
43. Duncan R. Drug-polymer conjugates: potential for improved chemotherapy. *Anticancer Drugs*. 1992;3:175-210.
44. Muggia FM. Doxorubicin-polymer conjugates: further demonstration of the concept of enhanced permeability and retention. *Clinical Cancer Research*. 1999;5:7-8.
45. Paul A, Vicent MJ, Duncan R. Using Small-Angle Neutron Scattering to Study the Solution Conformation of N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide Copolymer-Doxorubicin Conjugates. *Biomacromolecules*. 2007;8:1573-9.
46. Seymour LW, Ulbrich K, Strohalm J, Kopecek J, Duncan R. The pharmacokinetics of polymer-bound adriamycin. *Biochem Pharmacol*. 1990;39:1125-31.
47. Minko T, Kopečková P, Kopeček J. Efficacy of the chemotherapeutic action of HPMAC copolymer-bound doxorubicin in a solid tumor model of ovarian carcinoma. *International Journal of Cancer*. 2000;86:108-17.
48. Seymour LW, Miyamoto Y, Maeda H, Brereton M, Strohalm J, Ulbrich K, et al. Influence of molecular weight on passive tumour accumulation of a soluble macromolecular drug carrier. *Eur J Cancer*. 1995;31A:766-70.
49. Noguchi Y, Wu J, Duncan R, Strohalm J, Ulbrich K, Akaike T, et al. Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues. *Jpn J Cancer Res*. 1998;89:307-14.
50. Yeung TK, Hopewell JW, Simmonds RH, Seymour LW, Duncan R, Bellini O, et al. Reduced cardiotoxicity of doxorubicin given in the form of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide conjugates: and experimental study in the rat. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1991;29:105-11.
51. Rihova B, Bilej M, Vetricka V, Ulbrich K, Strohalm J, Kopecek J, et al. Biocompatibility of N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymers containing adriamycin. Immunogenicity, and effect on haematopoietic stem cells in bone marrow in vivo and mouse splenocytes and human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Biomaterials*. 1989;10:335-42.
52. Vasey PA, Kaye SB, Morrison R, Twelves C, Wilson P, Duncan R, et al. 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.
53. Seymour LW, Ferry DR, Kerr DJ, Rea D, Whitlock M, Poyner R, et al. Phase II studies of polymer-doxorubicin (PK1, FCE28068) in the treatment of breast, lung and colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2009;34:1629-36.
54. MHRA: Daunoxome, Summary of product characteristics. 2014, Available from: [http://www.mhra.gov.uk/spc-pil/index.htm?prodName=DAUNOXOME INJECTION 2MG/ML CONCENTRATE FOR SOLUTION FOR INFUSION&subsName=&pageID=ThirdLevel&searchTerm=daunoxome - retainDisplay](http://www.mhra.gov.uk/spc-pil/index.htm?prodName=DAUNOXOME+INJECTION+2MG/ML+CONCENTRATE+FOR+SOLUTION+FOR+INFUSION&subsName=&pageID=ThirdLevel&searchTerm=daunoxome+-retainDisplay). Accessed May 24, 2016.
55. Pacira: Depocyte, Sažetak opisa svojstava lijeka. 2015, Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000317/human_med_000740.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. Accessed May 24, 2016.
56. EMA: DepoCyte, EPAR summary for the public. 2011, Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000317/human_med_000740.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. Accessed May 24, 2016.
57. Takeda: Mepact, Sažetak opisa svojstava lijeka. 2016, Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000802/human_med_000899.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. Accessed May 24, 2016.

58. EMA: Mepact, EPAR summary for the public. 2013, Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000802/human_med_000899.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. Accessed May 24, 2016.
59. Celgene: Abraxane Product Information, Summary of product characteristics. 2015, Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000778/human_med_000620.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. Accessed June 22, 2015.
60. Yokoyama M. Clinical Applications of Polymeric Micelle Carrier Systems in Chemotherapy and Image Diagnosis of Solid Tumors. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 2011;3 (4):151-8.
61. Sorrento Therapeutics: Cynvilog. 2014, Available from: <http://sorrentotherapeutics.com/cynvilog>. Accessed November 17, 2015.
62. U.S. National Institute of Health: A Phase III Study of NK105 in Patients With Breast Cancer. 2015, Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01644890>. Accessed October 22, 2015.
63. Hamaguchi T, Matsumura Y, Suzuki M, Shimizu K, Goda R, Nakamura I, et al. NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend in vivo antitumour activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel. *British Journal of Cancer*. 2005;92:1240-6.
64. Pfizer: Cisplatin Pfizer 1 mg/ml koncentrat za otopinu za infuziju, Summary of product characteristics. 2015, Available from: <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Cisplatin-Pfizer-1-mgml-koncentrat-za-otopinu-za-infuziju/8799/>. Accessed March 15, 2016.
65. Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res*. 2001;478:23-43.
66. Jain RK. Vascular and interstitial barriers to delivery of therapeutic agents in tumors. *Cancer Metastasis Rev*. 1990;9:253-66.
67. Fox SB, Gatter KC, Bicknell R, Going JJ, Stanton P, Cooke TG, et al. Relationship of endothelial cell proliferation to tumor vascularity in human breast cancer. *Cancer Res*. 1993;53:4161-3.
68. Graff BA, Benjaminsen IC, Brurberg KG, Ruud EB, Rofstad EK. Comparison of tumor blood perfusion assessed by dynamic contrast-enhanced MRI with tumor blood supply assessed by invasive imaging. *J Magn Reson Imaging*. 2005;21:272-81.
69. Hori K, Suzuki M, Tanda S, Saito S. Characterization of heterogeneous distribution of tumor blood flow in the rat. *Jpn J Cancer Res*. 1991;82:109-17.
70. McDonald DM, Baluk P. Significance of blood vessel leakiness in cancer. *Cancer Res*. 2002;62:5381-5.
71. Dvorak HF, Nagy JA, Dvorak JT, Dvorak AM. Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. *The American Journal of Pathology*. 1988;133:95-109.
72. Navaltloha Y, Schwartz ES, Groothuis EN, Allen CV, Levy RM, Groothuis DR. Therapeutic implications of tumor interstitial fluid pressure in subcutaneous RG-2 tumors. *Neuro Oncol*. 2006;8:227-33.
73. Licht T, Fiebig HH, Bross KJ, Herrmann F, Berger DP, Shoemaker R, et al. Induction of multiple-drug resistance during anti-neoplastic chemotherapy in vitro. *Int J Cancer*. 1991;49:630-7.
74. Nichols JW, Bae YH. EPR: Evidence and fallacy. *J Control Release*. 2014;190:451-64.
75. Maeda H. Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;91:3-6.
76. Sun D. Nanotheranostics: integration of imaging and targeted drug delivery. *Mol Pharm*. 2010;7:1879.
77. Lammers T, Aime S, Hennink WE, Storm G, Kiessling F. Theranostic Nanomedicine. *Accounts of Chemical Research*. 2011;44:1029-38.
78. Esteva FJ, Valero V, Booser D, Guerra LT, Murray JL, Pusztai L, et al. Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002;20:1800-8.
79. Baker J, Ajani J, Scotté F, Winther D, Martin M, Aapro MS, et al. Docetaxel-related side effects and their management. *European Journal of Oncology Nursing*. 13:49-59.

80. Stern ST, Hall JB, Yu LL, Wood LJ, Paciotti GF, Tamarkin L, et al. Translational considerations for cancer nanomedicine. *J Control Release*. 2010;146:164-74.
81. Allen TM. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:750-63.
82. Danhier F, Feron O, Préat V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2010;148:135-46.
83. Wang R, Billone PS, Mullett WM. Nanomedicine in Action: An Overview of Cancer Nanomedicine on the Market and in Clinical Trials. *Journal of Nanomaterials*. 2013;2013:12.
84. Lu Y, Park K. Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013;453:198-214.
85. Venditto VJ, Szoka FC, Jr. Cancer nanomedicines: so many papers and so few drugs! *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65:80-8.
86. U.S. National Institute of Health: Safety Study of CALAA-01 to Treat Solid Tumor Cancers. 2013, Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00689065?term=CALAA-01&rank=1>. Accessed October 22, 2015.
87. Schroeder A, Heller DA, Winslow MM, Dahlman JE, Pratt GW, Langer R, et al. Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:39-50.
88. Rihova B, Kovar M. Immunogenicity and immunomodulatory properties of HPMa-based polymers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62:184-91.
89. Rihova B, Strohalm J, Kubackova K, Jelinkova M, Hovorka O, Kovar M, et al. Acquired and specific immunological mechanisms co-responsible for efficacy of polymer-bound drugs. *J Control Release*. 2002;78:97-114.
90. Kovar M, Mrkvan T, Strohalm J, Etrych T, Ulbrich K, Stastny M, et al. HPMa copolymer-bound doxorubicin targeted to tumor-specific antigen of BCL1 mouse B cell leukemia. *J Control Release*. 2003;92:315-30.
91. Kovar M, Tomala J, Chmelova H, Kovar L, Mrkvan T, Joskova R, et al. Overcoming immunoescape mechanisms of BCL1 leukemia and induction of CD8+ T-cell-mediated BCL1-specific resistance in mice cured by targeted polymer-bound doxorubicin. *Cancer Res*. 2008;68:9875-83.
92. Sirova M, Strohalm J, Subr V, Plocova D, Rossmann P, Mrkvan T, et al. Treatment with HPMa copolymer-based doxorubicin conjugate containing human immunoglobulin induces long-lasting systemic anti-tumour immunity in mice. *Cancer Immunol Immunother*. 2007;56:35-47.
93. Fang C, Shi B, Pei YY, Hong MH, Wu J, Chen HZ. In vivo tumor targeting of tumor necrosis factor- α -loaded stealth nanoparticles: effect of MePEG molecular weight and particle size. *Eur J Pharm Sci*. 2006;27:27-36.
94. Stylianopoulos T, Poh MZ, Insin N, Bawendi MG, Fukumura D, Munn LL, et al. Diffusion of particles in the extracellular matrix: the effect of repulsive electrostatic interactions. *Biophys J*. 2010;99:1342-9.
95. Lieleg O, Baumgartel RM, Bausch AR. Selective filtering of particles by the extracellular matrix: an electrostatic bandpass. *Biophys J*. 2009;97:1569-77.
96. Sainz V, Conriot J, Matos AI, Peres C, Zupancic E, Moura L, et al. Regulatory aspects on nanomedicines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;468:504-10.
97. Bartlett JA, Brewster M, Brown P, Cabral-Lilly D, Cruz CN, David R, et al. Summary report of PQRI Workshop on Nanomaterial in Drug Products: current experience and management of potential risks. *AAPS J*. 2015;17:44-64.
98. Muhlebach S, Borchard G, Yildiz S. Regulatory challenges and approaches to characterize nanomedicines and their follow-on similars. *Nanomedicine (Lond)*. 2015;10:659-74.
99. EMA: Reflection Paper on Nanotechnology-Based Medicinal Products for Human Use. 2006, Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Regulatory_and_procedural_guideline/2010/01/WC500069728.pdf. Accessed November 12, 2015.

100. Ehmann F, Sakai-Kato K, Duncan R, Hernan Perez de la Ossa D, Pita R, Vidal JM, et al. Next-generation nanomedicines and nanosimilars: EU regulators' initiatives relating to the development and evaluation of nanomedicines. *Nanomedicine (Lond)*. 2013;8:849-56.
101. EMA: Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product. 2013, Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/pages/includes/document/open_document.jsp?webContentId=WC500140351. Accessed February 22, 2016.
102. EMA: Joint MHLW/EMA reflection paper on the development of 4 block copolymer micelle medicinal products. 2013, Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/pages/includes/document/open_document.jsp?webContentId=WC500138390. Accessed February 22, 2016.
103. EMA: Reflection paper on surface coatings: general issues for consideration regarding parenteral administration of coated nanomedicine products. 2013, Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/pages/includes/document/open_document.jsp?webContentId=WC500147874. Accessed February 22, 2015.
104. Tinkle S, McNeil SE, Muhlebach S, Bawa R, Borchard G, Barenholz YC, et al. Nanomedicines: addressing the scientific and regulatory gap. *Ann N Y Acad Sci*. 2014;1313:35-56.