

Nanomedisin i kreftterapi

Marianne Lilletvedt Tovsen

Forskningsgruppen PharmaLuxLab, Avdeling for farmasi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo
E-post: m.l.tovsen@farmasi.uio.no

HOVEDBUDSKAP

Det er behov for mer spesifikk legemiddelbehandling innen kreftterapi.

Nanobærere kan fremme spesifikk levering (målstyring) av legemidler bl.a. til kreftvev.

Utvikling av kreftterapi basert på nanobærere er et voksende forskningsområde.

SAMMENDRAG

Kreft er en ledende dødsårsak på verdensbasis. De viktigste behandlingsformene er kirurgi, radioterapi og kjemoterapi. Høy dødelighet viser at disse behandlingsformene ofte er utilstrekkelige. Begrensninger til kjemoterapi er knyttet til blant annet skade på friskt vev og mangel på spesifisitet. Det er derfor et stort behov for forbedret og mer spesifikk legemiddelbehandling innen kreftterapi.

Nanobærere er materialer i nanostørrelsesområdet som kan bære legemiddelmolekyler. Ved anvendelse innen kreftterapi må nanobærerne ha en farmakokinetisk profil som fremmer levering (målstyring) av legemiddelet til kreftområdet for å gi maksimal terapeutisk effekt. Nanobærere benyttes også for å øke vandig løselighet av legemidler, deaggregere legemidler og gi forbedret legemiddelstabilitet. Utvikling av nanobærere for målstyrt levering av legemidler utgjør et bredt område av dagens kreftforskning.

Artikkelen beskriver ulike typer nanobærere som er på markedet eller under klinisk utprøving, samt publiserte *in vitro*- og *in vivo*-eksperimenter for parenteral administrasjon av fysisk assosierte legemidler til anvendelse innen kreftterapi. Det blir gitt eksempler på parenterale produkter som inneholder ulike typer nanobærere: liposomer, polymere miceller, polymere nanopartikler som nanosfærer og nanokapsler, og lipoproteiner. Bruk av nanobærere innen kreftterapi er et voksende forskningsområde, som har potensial til å gi mer spesifikk kjemoterapeutisk behandling av ulike kreftformer.

BAKGRUNN OG HENSIKT

Kreft er karakterisert ved unormal vekst av celler som kan utvikle seg på en ukontrollert måte. På verdensbasis er dette en ledende dødsårsak, og rundt 13 prosent av alle dødsfall var relatert til kreft i 2008 (WHO, 2013). De eksisterende formene for kreftbehandling er hovedsakelig kirurgi, radioterapi og kjemoterapi, ofte i kombinasjon. Høy dødelighet viser at de eksisterende behandlingsformene ofte er utilstrekkelige. Viktige begrensninger knyttet til disse terapiformene er skade på friskt vev og mangel på spesifisitet. Det er derfor behov for forbedret og mer spesifikk kreftbehandling.

Nano er definert som 10^{-9} meter (nm). Nanobærere til anvendelse innen kreftterapi kan være inntil rundt 200 nm i diameter, og bære flere legemiddelmolekyler. Til sammenlikning er røde blodceller rundt 7–8 mikrometer i diameter. Nanomedisiner bør spesifikt leveres (målstyres) til virkestedet for å gi maksimal terapeutisk effekt. De kan også benyttes for å øke vandig løselighet av tungtløselige legemidler i en formulering. Videre kan nanobærere løse legemiddelaggregater, som er en utfordring for flere kreftlegemidler som aggregerer i vandig miljø, og gi forbedret legemiddelstabilitet, for eksempel hydrolytisk stabilitet både *in vitro* og *in vivo* (Torchilin, 2007).

Anvendelse av nanobærere innen kreftterapi har som mål å redusere bivirkninger og øke effekt av legemiddelet. Dette kan oppnås ved å (Peer et al., 2007):

- målstyre legemiddelet til kreftvev
- unngå legemiddellekkasje under transittd
- beskytte legemiddelet mot metabolisme og prematur clearance
- ha tilstrekkelig retensjon på målstedet og fasilitere transport av legemiddelet inn i cellen
- levere legemiddelet til intracellulære målsteder
- benytte nanobærere som er biokompatible, biodegraderbare og ikke-antigene

Målstyring av parenterale nanomedisiner kan skje passivt og aktivt. Passiv målstyring av parenterale nanomedisiner mot kreft involverer legemiddelakkumulering i tumorområder gjennom den såkalte «økt permeabilitet og retensjons (EPR)-effekten»: Målstyring skjer på grunn av utett vaskulatur i tumor sammenliknet med normalt vev og ineffektiv lymfatisk drenering. Nanobærere under 200 nm, som er rundt størrelsen på åpningene i tumorvaskulaturen, kan derfor målstyres passivt til tumorvevet. Denne størrelsesgrensen er ikke absolutt, da åpningene i tumorvaskulaturen kan variere i størrelse (Bae og Park, 2011). I tillegg vil nanobærere under 200 nm av fysiskalkjemiske årsaker som størrelse, ladning og overflatehydrofilisitet ha lang sirkulasjonstid og lavt distribusjonsvolum, og dette øker sannsynligheten for passiv målstyring. Aktiv målstyring involverer spesifikke interaksjoner mellom nanobærere og kreftcellen, og skjer vanligvis gjennom spesifikke ligand-reseptor interaksjoner, for eksempel via bruk av folat-reseptorer. Dette er reseptorer som er overeksponert på mange typer kreftceller sammenliknet med normale celler. Aktiv målstyring kan oppnås ved å addere ligander til overflaten av nanobæreren som fremmer cellespesifikk gjenkjenning og binding til tumorstedet (Sudimack og Lee, 2000; Crommelin et al., 2001; Bae og Park, 2011; Lammers et al., 2012).

Tidligere har Singh publisert en relevant oversiktsartikkel i Norsk Farmaceutisk Tidsskrift om farmasøytisk nanoteknologi generelt. Kriterier for bruk av ulike nanobærere er gitt der (Singh, 2011). Denne artikkelen vil presentere bruk av nanomedisin innen kreftterapi. Nanobærere til anvendelse innen kreftterapi utgjør et bredt og økende forskningsområde. Hensikten med denne artikkelen er å gi en innføring i ulike typer nanobærere for parenteral administrasjon av kreftlegemidler. Kun fysisk assosierte nanobærersystemer vil beskrives (tabell 1), hvor legemiddelet ikke er avhengig av en kjemisk reaksjon for å frisettes *in vivo*. Dette gjelder en stor gruppe nanobærere som

både er på markedet og i kliniske studier. Artikkelen gir eksempler på nåværende og mulige fremtidige parenterale nano-produkter til krefterapi.

MATERIALE OG METODER

Grunnmaterialet ble innhentet ved søk etter oversiktsartikler med emneord som «nanocarrier», «cancer», «nano», «liposome», «polymeric micelle», «nanoparticle», «nanocapsule», «nanosphere» og «lipoprotein» i SciFinder Scholar i perioden 16.–29. august 2011. Supplerende litteratur ble innhentet ved behov. Bøkene «Drug Delivery and Targeting» (eds. Hillery et al., 2001) og «Nanotechnology in Drug Delivery» (eds. De Villiers et al., 2009) ble brukt. Denne artikkelen er basert på min oppgitte prøveforelesning med tittelen «Current status and future perspectives of nanocarriers for drugs in cancer therapy».

LIPOSOMER

Liposomer er en av de mest velstuderte nanobærerene innen krefterapi. De består av fosfolipider i ett eller flere dobbeltlag, som tilsvarer oppbyggingen av cellemembraner og gir stor fleksibilitet med hensyn til størrelse og bærekapasitet. Liposomene er biodegraderbare og kan innkapsle hydrofile (vannløselige) legemidler i det vandige hulrommet (tabell 1), og hydrofobe (fettløselige) legemidler i lipid-dobbeltlaget. Konvensjonelle liposomale preparater på markedet er DepoCyte® (cytarabin) og Myocet® (doksorubicin). Etter *i.v.* injeksjon vil liposomer ha kort sirkulasjonstid, siden fosfolipidoverflaten raskt gjenkjenner og immunsystemet. Forlenget sirkulasjonstid og forbedret farmakokinetisk profil kan oppnås ved å coate liposomene med den hydrofile polymeren polyetylen glykol (PEG), som beskytter nanobæreren fra immunologisk deteksjon ved å fungere som et frastøtende lag som forsinket og reduserer opptaket i makrofager. PEGylering av nanobæreren fører til forlenget tid til passiv målstyring. Caelyx® (doksorubicin) er et eksempel på PEGylerte liposomer som er på markedet (85 nm). Den farmakokinetiske profilen til Caelyx® sammenliknet med ubundet doksorubicin er karakterisert av forlenget sirkulasjonstid og redusert distribusjonsvolum, noe som fremmer opptak i tumor. På grunn av redusert vevs-distribusjon gir formuleringen redusert kardiotoxiskitet sammenliknet med fritt doksorubicin, som igjen tillater administrasjon av større legemiddeldoser (Taft og Yuan, 2008). Til tross

for dette har ikke Caelyx® vist bedre effekt enn ubundet doksorubicin i kliniske studier (Caelyx SPC, 2013).

Fremtidig bruk av liposomer i krefterapi inkluderer immunoliposomer, som har kreftspesifikke antistoffer knyttet til overflaten for å oppnå aktiv målstyring mot kreftceller. Lukyanov et al. studerte PEGylerte Caelyx® liposomer på ~110 nm med antistoffet mAb 2C5 som gjenkjenner et bredt utvalg av krefttyper. Liten partikkelstørrelse, coating med PEG og antistoffet mAb 2C5 på partikkeloverflaten resulterte i målstyring til kreftcellene og økte cytotoxiskiteten både *in vitro* og *in vivo* (Lukyanov et al., 2004). Det er kjent at legemiddelfrisetningen fra liposomer kan skje sakte og at det dermed kreves en ytre «trigger» slik som endring i pH, temperatur eller bruk av ultralyd for å frisette legemiddelet fra bæreren. Wu et al. benyttet økt temperatur lokalisert til tumorområdet for å fragmentere liposommembranen og frigjøre kreftlegemiddelet. Dette førte til forbedret farmakokinetisk profil og økt antitumoreffekt i eksperimentet på rotter. Liposomene hadde i tillegg langtidssirkulerende egenskaper på grunn av liten størrelse (~73 nm) og PEGylering (Wu et al., 2011).

Tabell 2 viser de parenterale antineoplastiske legemidlene med markedsføringstillatelse for humant bruk i Norge som inneholder en nanobærer.

POLYMERE MICELLER

Polymere miceller er bygget opp av overflateaktive polymere (langkjedede) forbindelser. Pluronic er en overflateaktiv polymer som består av to hydrofile og en hydrofob enhet. Over en viss konsentrasjon danner enhetene en hydrofob kjerne og et hydrert skall, hvor hydrofobe legemidler kan inkluderes i kjernen (tabell 1). Hydrofile legemidler lokaliseres i skallet. Polymere miceller har høy stabilitet *in vitro* og *in vivo*, god biokompatibilitet og liten størrelse (~10–100 nm). Litteraturen viser at polymere miceller har lang sirkulerings-tid *in vivo* og derved kan fungere som legemiddelbærere, selv om dette er noe omdiskutert da polymerene må holde seg over en viss konsentrasjon i lenger tid *in vivo* (Kabanov og Alakhov, 2002; Taft og Yuan, 2008; Soo et al., 2009; Cukierman og Khan, 2010; Kim et al., 2010; Wei et al., 2010; Torchilin, 2011).

Ingen produkter med polymere miceller er på markedet i Norge, men flere formuleringer er i kliniske studier: SP1049C som består av doksorubicin

solubilisert av Pluronic L61 og Pluronic F127, er i klinisk fase II i Europa (Soo et al., 2009; Valle et al., 2011). Denne legemiddelformuleringen fører til 200–3500 ganger økt cytotoxiskitet av doksorubicin i forskjellige multi-drug resistent (MDR) cellelinjer sammenliknet med doksorubicin alene, og er dermed lovende mot MDR-kreft. Formuleringen har også forbedret farmakokinetisk profil sammenliknet med doksorubicin alene. Genexol-PM, som består av paklitaksel solubilisert av polymeren polyetylen glykol-*b*-poly (melkesyre) PEG-*b*-PLA, er markedsført i Korea mot bryst- og lungekreft og er i klinisk fase II i USA mot kreft i bukspyttkjertelen (Soo et al., 2009; Genexol-PM, 2012; Lee et al., 2012). Denne formuleringen gir en dobbel eller nesten trippel økning i maksimal tolerert dose av paklitaksel sammenliknet med formuleringen Taxol®, som inneholder solubilisatoren (det vil si oppløsningsfremmeren) Cremophor® EL. Problemer knyttet til toksisitet gjør Cremophor® EL lite egnet i farmasøytiske produkter (Lee et al., 2012).

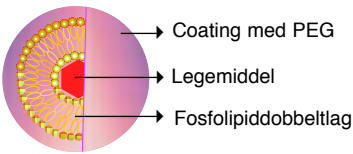
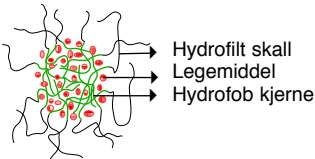
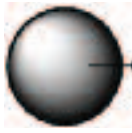
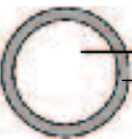
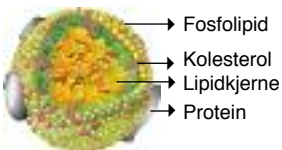
POLYMERE NANOPARTIKLER

Det finnes flere typer polymere nanopartikler (tabell 1), som kan bestå av en matriks av legemiddel og polymer (nanosfære) eller av en kjerne hvor legemiddelet er innkapslet med en polymer membran rundt (nanokapsel). Disse nanopartiklene kan være laget av syntetiske polymerer (for eksempel poly(melkesyre) PLA) og naturlige polymerer (for eksempel kitosan, kollagen).

Nanosfærer

Nanosfærer er sfæriske legemiddelbærere hvor legemiddelet kapsles inn i den polymere matriksen (tabell 1). Det markedsførte preparatet Abraxane® består av albuminnanopartikler som inneholder paklitaksel (tabell 2). Abraxane® ble formulert på grunn av løselighetsproblemer til paklitaksel, og eliminerte behovet for det toksiske hjelpestoffet Cremophor® EL som er benyttet i Taxol® for å solubilisere paklitaksel. I fremtiden kan nanosfærer benyttes til aktiv målstyring ved hjelp av en målstyrende ligand som folat. Werner et al. benyttet denne liganden til aktiv målstyring mot eggstokkreft, der cellene overuttrykker folatreseptoren på celleoverflaten i mye høyere grad enn normalt vev. Formuleringen besto av biodegraderbare polymerbaserte nanopartikler på ~75 nm med en poly(melkesyre)-*ko*-(glykolsyre)

Tabell 1. Partikulære bærere i kreftterapi: typisk sammensetning, størrelsesområde og bruk.

Partikulære bærere	Struktur	Matriks-materialer	Typisk størrelse	Bruk av bærere
Liposomer		Fosfolipider	50 nm–1 μm	<ul style="list-style-type: none"> Hydrofile (vannløselige) legemidler i det vandige hulrommet Hydrofobe (fettløselige) legemidler i lipiddobbeltlaget Makromolekyler kan også formuleres
Polymere miceller		Blokkopolymere	10–100 nm	<ul style="list-style-type: none"> Hydrofile legemidler i det hydrerte skallet Hydrofobe legemidler i den hydrofobe kjernen Blokkopolymerene kan spesialtilpasses legemiddelet
Polymere nanopartikler	 Nanosfære	F.eks. stivelse, albumin	50 nm–1 μm	<ul style="list-style-type: none"> Hydrofile legemidler i matriks (avhengig av matriksmateriale) Hydrofobe legemidler i matriks (avhengig av matriksmateriale)
	 Nanokapsel	F.eks. kopolymere	250–500 nm	<ul style="list-style-type: none"> Hydrofile legemidler i kjernen (avhengig av kjernemateriale) Hydrofobe legemidler i kjernen (avhengig av kjernemateriale) Kan innkapsle mer legemiddel per enhet enn nanosfærer Unngår vevsirritasjon, siden legemiddel og vev ikke kommer i direkte kontakt
Lipoproteiner		Lipider, proteiner	5–80 nm	<ul style="list-style-type: none"> Hydrofobe legemidler binder seg til lipoproteiner Amfifile (overflateaktive) legemidler kan også binde seg til lipoproteiner, siden de har en hydrofob del

Tabell 2. Antineoplastiske legemidler på markedet som bruker nanobærere.

Legemiddel	Handelsnavn	Nanobærere
Doksorubicin	Caelyx®	Liposomer
Cytarabin	DepoCyte®	Liposomer
Doksorubicin	Myocet®	Liposomer
Paklitaksel	Abraxane®	Albumin

PLGA/paklitaksel-kjerne, og ble testet på mus. Ved hjelp av disse nanopartiklene benyttet man en kombinasjon av kjemoterapi (paklitaksel) og radioterapi indusert av radionukleotiden, beta-emitteren yttrium-90 inkorporert i partiklene (Werner et al., 2011). Fremtidig bruk av nano-

sfærer muliggjør også frisetting ved hjelp av ytre stimuli. Deng et al. benyttet pH-sensitive hule nanosfærer laget av kitosan og silika (250 nm). Ved lav pH, som man har i tumorceller, vil bæreren svulle og porer åpnes i nanobæreren. Det inkorporerte legemiddelet kan dermed enkelt diffundere ut fra de hule nanosfærene. Størrelsen på disse nanobærerne vil være pH-avhengig (Deng et al., 2011).

Nanokapsler

Nanokapsler består av en kjerne og skallstruktur (tabell 1), hvor legemiddelet er innkapslet i kjernen. Både hydrofile og hydrofobe legemidler kan inkorporeres i nanokapslene avhengig av hva kjernen er laget av. Nanokapsler har høy legemiddelinnkapslingseffektivitet, med plass til

mange legemiddelmolekyler i kjernen. Det er ingen produkter med nanokapsler på markedet. I fremtiden kan nanokapsler gjøre det mulig å administrere svært toksiske legemidler. Santos et al. studerte nanoinkapsling av usnic-syre, som på grunn av høy hepatotoksitet og lav vannløselighet ikke kan benyttes innen kreftterapi. Legemiddelet ble innkapslet i den vandige kjernen av poly(melkesyre)-ko-(glykolsyre) PLGA-nanokapsler som inneholdt Pluronic F68 som solubilisator (315 nm). Formulering med nanokapsler medførte økt tumorinhibering og redusert hepatotoksitet i mus (Santos et al., 2006).

LIPOPROTEINER

Lipoproteiner er naturlig forekommende bærersystemer for fett i blodsirkulasjonen,

som består av en lipidkjerne og en proteinkappe (tabell 1). Kroppen har flere typer lipoproteiner, inklusive low density lipoproteiner (LDL), som kan transportere legemidler i blodsirkulasjonen. Hydrofobe legemidler viser tendens til å binde seg til lipoproteiner slik som LDL, men også amfifile (overflateaktive) legemidler har en hydrofob del som kan binde seg til lipoproteiner. Flere krefttyper har økt forekomst av LDL-reseptorer på celleoverflaten, og dette kan utnyttes i legemiddellevering ved bruk av nanobærere. Foreløpig er dette kun på forsøksstadiet. Xu et al. har laget en nanobærer for kreftlegemidler som skal etterlikne strukturen og størrelsen (ca. 120 nm) til naturlige lipoproteiner. Aktiv målstyring ved hjelp av en ligand brukes i tillegg. Denne bæreren er biodegraderbar og ble testet på kreftceller i leveren (Xu et al., 2010).

NANOTOKSISITET OG ANDRE UTFORDRINGER

Det finnes mange utfordringer ved bruk av nanobærere innen kreftterapi, og noen av disse er akkumulering av nanobærere *in vivo* med mulighet for nanotoksisitet. Flere av nanobærerne er ikke biodegraderbare, som for eksempel uorganiske nanopartikler. Spørsmålet er derfor: vil disse nanobærerne elimineres fullstendig *in vivo*? Liten størrelse og PEGylering som gir forlengede sirkulasjonsegenskaper medfører økt mulighet for akkumulering i indre organer og lymfesystemet. Selv om PEGylerte nanobærere får forlenget systemisk sirkulasjonstid, vil fraksjonen av partikler som når frem til tumor fortsatt være begrenset. Et eksempel viser at biotilgjengeligheten til tumor økte fra 1 % til kun 2 % ved PEGylering av nanobærere målt etter fire timers sirkulasjon (Bae og Park, 2011). Akkumulering av nanobærere *in vivo* vil medføre økt risiko for toksiske reaksjoner, trigget immunrespons og allergiske reaksjoner. Det er derfor viktig å studere de fysikalsk-kjemiske prosessene og molekylære-, fysiologiske- og immunologiske responsene knyttet til ulike typer nanobærere (Peer et al., 2007; Vega-Villa et al., 2008).

Andre utfordringer er suboptimal målstyring og manglende frisetting av legemiddel fra nanobæreren på virkestedet. Ved passiv målstyring vil forstørrede åpninger i blodkarene i tumorvev kun fremme passasjen av en fraksjon av små nanobærere (< ca. 200 nm; Bae og Park, 2011). En annen utfordring er knyttet til hastigheten av legemiddelfrisettingen fra

nanobæreren i tumorvevet. Bruk av ytre stimuli som ultralyd eller lysaktivering er mulig for å øke frisettingshastigheten og -graden. Referanser diskutert i de ulike avsnittene i denne artikkelen viser at mekanismene for frisetting av legemiddel ofte ikke er beskrevet (se referanselisten).

Aktiv målstyring involverer bruk av målselektive ligander, men interaksjonen mellom ligand og reseptor foregår på nm-avstand og forutsetter at bæreren er levert til kreftcellen fra blodsirkulasjonen. Passiv målstyring er derfor en forutsetning for at aktiv målstyring kan finne sted (Lammers et al., 2012). Selv om denne realiteten indikerer flere begrensninger, så gjøres det klare fremskritt i bruk av nanobærere for kreftterapi. Alle typene nanobærere beskrevet i denne artikkelen virker lovende for fremtidig bruk.

KONKLUSJON

Markedsførte kreftpreparater som anvender nanobærere benytter hovedsakelig liposomer. Litteraturen viser imidlertid lovende resultater for bruk av flere typer nanobærere innen kreftterapi, både via kliniske studier og *in vitro*- og *in vivo*-eksperimenter. Nanobærere kan gjøre det mulig å levere tilstrekkelige doser av legemidler som har ugunstige fysikalsk-kjemiske egenskaper (for eksempel lav vannløselighet og høy aggregering), og som ikke kan benyttes terapeutisk uten avansert formulerings-teknologi. Nanobærere vil endre farmakokinetisk profil, redusere legemiddeltoksisitet og øke effekten til det inkorporerte legemiddelet. Nanobærere til anvendelse innen kreftterapi er et voksende forskningsområde, som vil gi mer spesifikke behandlingsregimer mot kreft i fremtiden.

Takksigelser

Takk til professor Solveig Kristensen, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo (UiO), for faglige diskusjoner i forbindelse med denne artikkelen. Takk til Jon Reierstad, Biologisk institutt, UiO, for utarbeidelse av illustrasjoner.

Oppgitte interessekonflikter: Ingen

REFERANSER

Referanseliste finnes på:
www.farmatid.no/id/5635

Manuskriptet ble mottatt 5. februar 2013 og godkjent 30. april 2013. ■

REVIEW, SUMMARY

Nanomedicine in cancer therapy

Cancer is a leading cause of death worldwide. The existing therapy forms are mainly surgery, radio-, and chemotherapy. However, high mortality indicates that the existing cancer treatments in many cases are inadequate. Limitations of chemotherapy are e.g., damage to healthy tissues and lack of specificity. Therefore, improved and more specific cancer therapy is needed.

Nanocarriers are nanosized materials that can carry drug molecules. In cancer treatment, the aim is to obtain a pharmacokinetic profile which promotes specific delivery (targeting) of the nanocarrier to the cancer area for maximum therapeutic effect of the delivered drug. Nanocarriers may also be utilized in order to increase the aqueous solubility of drugs, deaggregate drugs and to obtain improved drug stability. Development of nanocarriers for delivery of drugs in cancer therapy comprises a wide area in cancer research.

This article describes different types of nanocarriers for parenteral administration of drugs for cancer therapy. Only physically associated drug nanocarrier systems are presented. This is a large group of nanocarriers in current use and in clinical trials. Examples of current and future parenteral products which contain nanocarriers with drugs for cancer therapy are presented: liposomes, polymeric micelles, polymeric nanoparticles as nanospheres and nanocapsules, and lipoproteins. The use of nanocarriers in cancer therapy is a growing research area, which has a future potential for a more specific chemotherapeutic treatment.