

## ROLA PEPTYDÓW W SELEKTYWNYM DOSTARCZANIU ANTRACYKLIN DO KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

### THE ROLE OF PEPTIDES IN SELECTIVE DELIVERY OF THE ANTHRACYCLINES TO NEOPLASMIC CELLS

Aneta ROGALSKA, Agnieszka MARCZAK, Marzena SZWED,  
Zofia JÓŹWIAK

Katedra Termobiologii, Instytut Biofizyki, Uniwersytet Łódzki

*Streszczenie:* Dokсорubicyna (DOX) i inne antracykliny są powszechnie stosowane w leczeniu nowotworów, zarówno białaczek jak i guzów litych. Kliniczne zastosowanie tych leków jest jednak ograniczone przez działania uboczne, szczególnie kardiotoxycyżność, uszkodzenie nerek czy mielosupresję. Podjęmowane są więc liczne badania mające na celu ograniczenie skutków ubocznych i podniesienie skuteczności leczenia dokсорubicyną i innymi antracyklinami. Jedną z rozważanych strategii jest wykorzystanie przenośników leków, takich jak: liposomy, dendrymery, nanocząsteczki czy przeciwciała. Przenośniki pozwalają na zwiększenie wewnątrz-komórkowego stężenia leków w komórkach nowotworowych oraz na ograniczenie zjawiska oporności wielolekowej. Niniejszy artykuł przedstawia aktualną wiedzę dotyczącą bardzo obiecującego kierunku badań przy użyciu przenośników białkowych i peptydowych. Peptydy wykorzystywane jako przenośniki leków zawierają powtarzające się reszty lizyny lub argininy. Połączone są one z DOX przez samoodłączający się łącznik, który w określonych warunkach spontanicznie uwalnia lek. Przykładem tego typu łącznika jest p-aminobenzylkarbonyl (PABC), który odłącza lek o niskim pH. Podczas syntezy peptydów, będących składnikami koniugatu, brane są pod uwagę takie sekwencje aminokwasów, które są specyficżnie rozpoznawane przez enzymy wykazujące nadekspresję w komórkach nowotworowych lub w ich otoczeniu. Należą do nich m.in. katepsyny, metaloproteinazy czy proteaza serynowa PSA. W pracy omówiono proleki, które zawierają w swojej strukturze peptydy będące substratami dla metaloproteinaz, szczególnie MMP2 i MMP9. Proteinazy te uczestniczą w procesie progresji nowotworu, angiogenezie i metastazie. Są one wytwarzane przez komórki nowotworowe oraz przez komórki podścieliska guza, dzięki czemu uwalnianie czynnika aktywnego z proleku ma miejsce w nowotworach. Drugim ważnym zagadnieniem omawianym w artykule jest wykorzystywanie, podczas otrzymywania koniugatu, określonych sekwencji aminokwasowych, rozpoznawanych przez receptory występujące w zwiększonych ilościach na komórkach nowotworowych. Do receptorów tych zalicza się m.in.  $\alpha$ v-integriny, receptory dla transferyny oraz dla hormonów peptydowych. Integriny, uczestniczące w selektywnej adhezji, rozpoznają w ligandach specyficżne ugrupowanie aminokwasów, trójpeptyd arginina – glicyna – kwas asparaginowy, nazywany także sekwencją RGD. Dołączanie takiego peptydu do antracyklin ułatwia wychwytywanie proleku przez komórki nowotworowe. Innymi receptorami wykorzystywanymi przez proleki są także receptory asjaloglikoproteinowe występujące na powierzchni hepatocytów. Koniugatem rozpoznawanym przez recep-

tory asjaloglikoprotein jest DOXO-EMCH, transportowana za pomocą laktozaminowanej pochodnej albuminy (L-HSA). Omówiono również receptor dla hormonu uwalniającego gonadotropiny, somatostatynę, bombezynę i kalcytoninę. Proleki DOX zawierające ligandy (peptydy), które wykazują duże powinowactwo do receptorów hormonów, dostają się do komórek nowotworowych w drodze endocytozy. Do proleków peptydowych bardzo często przyłączane są także duże makrocząsteczki ułatwiające transport leku wybiórczo do komórek nowotworowych. Jedną z takich makrocząsteczek jest albumina (egzogenna lub endogenna), która w wielu typach przenośników jest dołączana do koniugatu poprzez cysteinę (Cys) w pozycji 34. W obszarze guza brak jest często funkcjonalnego drenażu limfatycznego, czego wynikiem jest zatrzymywanie makrocząsteczek w guzie. Zwiększone stężenie albumin w tym obszarze jest także związane z intensywnym metabolizmem komórek nowotworowych, dla których albumina jest źródłem energii dla procesów życiowych. Poważnym problemem w chemioterapii jest także powszechnie występujące zjawisko oporności nowotworu na stosowane chemioterapeutyki. Głównym białkiem oporności wielolekowej jest glikoproteina P. Dużym osiągnięciem w badaniach nad systemami dostarczania leków okazały się koniugaty, które zawierały oprócz typowych elementów (nośnik, łącznik, lek) również inhibitor P-gp, który po odłączeniu w komórkach nowotworowych przywracał ich wrażliwość na działanie DOX.

*Słowa kluczowe:* doksorubicyna, antracykliny, koniugaty, peptydy.

*Summary:* Doxorubicin (DOX) and other anthracycline derivatives are effective antineoplastic agents with an antitumor activity against many solid tumors and leukaemias. The clinical application of these drugs is, however, limited due to cumulative, dose-dependent side effects for example cardiotoxicity, myelosuppression or kidneys failure. Therefore, several strategies have been developed to reduce these effects and to improve the chemotherapeutic potency of doxorubicin and other anthracyclines. One of the ways is using drug carriers, such liposomes, dendrimers, nanoparticles, antibodies and others. The drug delivery systems lead to increased intracellular concentration of the cytotoxic agents mainly in cancer cells and may help to overcome the chemoresistance of neoplastic cells. In this article we presented the most promising strategies based on protein or peptide carriers. Peptide linkers are a short sequences usually containing multiple lysine or arginine residues. They are linked to DOX via self-immolative spacer, which release the free drug spontaneously. The very useful spacer is p-aminobenzoyloxycarbonyl (PABC) releasing the anticancer agent at low pH. It is very important that peptide linker has usually a specific structure and can serve as a substrate for tumor-associated overexpressing proteases like cathepsin, metalloproteinases, urokinase type plasminogen activator or prostate specific antigen. We presented here, for example, prodrugs which contain in their structure peptide spacer which is specific substrate for metalloproteinases, especially MMP2 and MMP9. These proteinases play a critical role in tumor progression, angiogenesis and metastasis. The protease activity of MMP2 and MMP9 was exploited to release the anticancer agent from carrier. Since MMPs are primarily secreted in the interstitial stroma of tumor tissue, the drugs are selectively released in these tissues but not in normal cells. The second important strategy is using cellular receptors as targets for carrier-linked prodrug design. There are many tumor-associated receptors that have been investigated in receptor – targeting approaches, such as the transferrin receptor, integrins or asialoglycoprotein receptor. The  $\alpha v$ -integrins, cell adhesion molecules highly expressed on activated endothelial cells and tumor cells but not on normal ones, present an attractive target for tumor therapy. Prodrugs containing tumor-homing RGD (Arg-Gly-Asp) peptide have been shown to display high selectivity for binding to the integrin receptors. Asialoglycoprotein receptors are expressed on hepatocytes. These receptors have been also targeted using prodrugs. ASGP-R is a lectin mediating uptake of galactosyl terminating macromolecules which can be use as hepatotropic carrier of drugs like lactosaminated human albumin (L-HAS). We described also the receptor for peptide hormones such as luteinizing-hormone releasing hormone, somatostatin, bombesin or calcitonin. Prodrugs of DOX which contain ligands (peptides) with a high affinity to the hormone receptors are taken up by receptor-mediated endocytosis. The use of targeted cytotoxic peptide analogues could inhibit the growth of cancer and improves the tumor treatment outcome. The peptide prodrugs can be also conjugated with large impermeable macromolecules (for example albumin) to facilitate active drug entry. In these conjugates substrate peptide sequences bind with cysteine-34 position of endogenous or exogenous albumin via maleimide hydrazine spacer. An albumin preferentially accumulates in solid tumors due to vascular permeability of the blood vessels of tumor and impaired metabolic drainage. Besides, albumins are a major energy and nutrition source for tumor growth. Albumin prodrug may also contain acid-sensitive linkers that allow DOX to be realized either extra or intracellularly. Multidrug resistance (MDR) is a major problem in the treatment of

malignant diseases. Glycoprotein P (P-gp) is one of the best-studied cell-membrane efflux pumps responsible for MDR in cancer. The very interesting strategy are prodrugs which include an inhibitor of glycoprotein P. This kind of conjugate may help to overcome the chemoresistance of neoplastic cells.

*Key words:* doxorubicin, anthracyclines, conjugates, peptides.

## 1. WSTĘP

Chemioterapia jest obecnie jedną z najpowszechniej stosowanych metod leczenia nowotworów. Pomimo wieloletnich badań i olbrzymich nakładów finansowych stosowane leki są jednak wciąż niespecyficzne i większość z nich uszkadza zarówno komórki nowotworowe, jak i zdrowe, co skutkuje wysoką toksycznością ogólnoustrojową. Szczególnie leki z grupy antybiotyków antracyklinowych, zwłaszcza te I generacji, jak doksorubicyna (DOX) czy daunorubicyna (DNR), wywołują liczne działania niepożądane. Skutki uboczne towarzyszące leczeniu antracyklinami, takie jak: kardiotoxyczność [6, 17], uszkodzenie nerek [45, 48] czy mielosupresja [27], w znacznym stopniu ograniczają stosowanie tych cytostatyków, zwłaszcza u osób cierpiących na choroby serca czy nerek. Podejmowane są więc badania mające na celu polepszenie skuteczności chemioterapii. Ponieważ duże znaczenie dla zwiększenia selektywności leków ma sposób ich dostarczania do komórek nowotworowych, zastosowanie różnego typu przenośników pozwoliło uzyskać wyższy wskaźnik terapeutyczny i jednocześnie ograniczyć efekty uboczne leków. Głównymi zadaniami postawionymi przed nośnikami określanymi ogólnie jako systemy dostarczania leków – DDS (ang. *Drug Delivery Systems*) są: zredukowanie toksyczności ogólnoustrojowej poprzez ograniczenie kontaktu leku z komórkami zdrowymi oraz zwiększenie efektywności dostarczania leku wybiórczo do komórek nowotworowych [46]. Ponadto nośniki powinny ulegać rozpadowi do małych cząstek szybko wydalanych z organizmu. Nośniki można podzielić na dwie grupy [40]. Pierwszą tworzą koniugaty, do których zalicza się polimery, zarówno naturalne jak i syntetyczne, peptydy czy białka, w tym również przeciwciała [59, 37]. Lek jest tutaj związany z nośnikiem wiązaniem chemicznym. Drugą grupę stanowią nanocząsteczki, w których antybiotyk jest ulokowany wewnątrz nośnika, najczęściej w jego rdzeniu. Do tej grupy należą między innymi stosowane najczęściej liposomy [36], nanocząsteczki polimerowe, mikrosfery [49], micelle [3], a także dendrymery [7].

W niniejszej pracy przedstawiamy wybrane nośniki peptydowe, dzięki którym leki z grupy antybiotyków antracyklinowych, w szczególności doksorubicyna, są selektywnie dostarczane do komórek nowotworowych. Podkreślamy także rolę enzymów wykazujących nadekspresję w komórkach nowotworowych w uwalnianiu leków z nośników.

## 2. BUDOWA NOŚNIKÓW Z FRAGMENTEM PEPTYDOWYM

Jednymi z prostszych nośników peptydowych są syntetyczne poliaminokwasy, spośród których zastosowanie znalazły: poli(kwas L-glutaminowy), poli(kwas L-asparaginowy), poli(L-lizyna), poli(L-ornityna). Powyższe poliaminokwasy liniowe były

wiązane z metotreksatem (MTX), dokсорubicyną czy daunorubicyną. Wykazano, że te makrocząsteczki dołączone do leków zwiększają ich rozpuszczalność, zmieniają biodystrybucję i właściwości farmakokinetyczne [24, 55]. Badania prowadzono także z użyciem rozgałęzionych polipeptydów, takich jak na przykład poli [Lys (DL-Ala<sub>m</sub>)], poli [Lys (DL-Ser<sub>m</sub>)], poli [Lys (Ser<sub>m</sub>)] lub poli [Lys(DL-Ala<sub>m</sub>-Ser)], gdzie  $m \leq 3$ . Wykazano, że sekwencja aminokwasów i struktura przestrzenna peptydów wpływa na szybkość uwalniania koniugatów z krwi, immunogenność, a także na ich interakcje z błoną komórkową [25, 44]. Porównanie dwóch koniugatów cis-akonitylo-daunorubicyny (cAD) z przyłączonym rozgałęzionym łańcuchem polipeptydowym, nazwanym roboczo cAD-SAK i cAD-EAK wykazało, że nawet drobna różnica polegająca na zamianie jednego aminokwasu może mieć znaczenie dla aktywności przeciwnowotworowej koniugatu. Polipeptyd EAK zbudowany z poli [Lys (Glu<sub>1</sub>-DL-Ala<sub>m</sub>)] jest amfoteryczny, a polipeptyd SAK, w którym kwas glutaminowy został zastąpiony seryną, jest polikationem. Skutkuje to różną strukturą przestrzenną tych peptydów. W warunkach fizjologicznych (pH = 7,2, 0,2 M NaCl) zawartość  $\alpha$ -helisy oszacowano na 53,1% dla SAK i tylko 6,3% dla EAK, a w modelowej błonie lipidowej odpowiednio 71,9% dla SAK i 7,8% dla EAK. Badania wykazały, że ta różnica w ich budowie ma ogromne znaczenie dla aktywności przeciwnowotworowej daunorubicyny. Zaobserwowano między innymi, że tylko koniugat cAD-EAK był skuteczny przeciwko białaczce mysiej [51].

Uwalnianie antracyklin z prostych koniugatów peptydowych, w których lek jest związany z peptydem bezpośrednio poprzez grupę aminową reszty cukrowej cząsteczki leku, może zachodzić albo w wyniku enzymatycznej proteolizy w miejscu przyłączenia leku [35], albo cięcia wewnątrz sekwencji peptydowej, po którym zachodzi dalsza hydroliza i aktywacja leku [39]. Często jednak trudno w ten sposób uwolnić lek z uwagi na małą podatność wiązania między lekiem a peptydem na rozerwanie. Dlatego też obecnie takie proste połączenia są już coraz rzadziej spotykane. Zwykle peptyd jest związany z lekiem poprzez samoodłączający się związek, który ulegając spontanicznej eliminacji powoduje odłączenie leku od peptydu [2]. Łącznik ten, w zależności od struktury wykorzystanego związku, może się odcinać albo w wyniku reakcji eliminacji albo cyklizacji. Obie reakcje zachodzą spontanicznie, a czynnikiem inicjującym je może być między innymi niskie pH. Ponieważ badania potwierdzają, że pH komórek nowotworowych jest obniżone w stosunku do zdrowych [23, 63], pozwalałoby to na odłączenie leku właśnie w tych komórkach. Jednym z pierwszych tego typu ugrupowań, stosowanym z powodzeniem do dziś w wielu koniugatach, jest p-aminobenzylksykarbonyl – PABC (ang. *P-AminoBenzylOxyCarbonyl*) [21]. Doświadczenia z dokсорubicyną przyłączoną do dipeptydu Phe-Lys wykazały, że gdy lek był połączony bezpośrednio z peptydem jego czas połowicznego uwalniania wynosił ponad 7 godzin. Wprowadzenie do koniugatu PABC skróciło ten czas do 9 minut. Ponadto PABC może być przyłączony do DOX także w formie dimerów lub trimerów tworząc strukturę dendrymeryczną [29]. Przykładem łącznika może być także wspomniany już cis-akonityl (cA), który uwalnia lek z koniugatu w niskim pH. Niestety badania wykazały, że

nawet w pH 4 odzyskiwano tylko około 70% daunorubicyny. Znacznie lepszym łącznikiem okazał się hydrazon, który w podobnych warunkach był w 100% skuteczny [51].

Nowe typy przenośników zawierają także dodatkowe związki, których zadaniem jest skierowanie leku wybiórczo do komórek nowotworowych i ułatwienie ich uwolnienia. Przy ich wyborze bierze się pod uwagę różnice w biochemicznych i fizjologicznych właściwościach tkanek nowotworowych oraz zdrowych. Wykorzystuje się tu nie tylko obecne w komórkach nowotworowych markery powierzchniowe, takie jak specyficzne receptory czy antygeny, ale także enzymy proteolityczne o zwiększonej ekspresji w tkankach nowotworowych, które rozcinając specyficzne fragmenty koniugatu przyspieszają uwalnianie leku.

Dużą rolę w tworzeniu koniugatów z peptydami odgrywa albumina. Ułatwia ona transport koniugatu do obszaru guza. Intensywny napływ albuminy do komórek nowotworowych jest możliwy ze względu na zwiększoną przepuszczalność naczyń krwionośnych guza. Średnica szczelin w naczyniach włosowatych guza wynosi od 100–1200 nm, podczas gdy w prawidłowych tkankach jest około 100-krotnie mniejsza [56]. W obszarze guza brak jest często funkcjonalnego drenażu limfatycznego, czego wynikiem jest zatrzymywanie makrocząsteczek w guzie. Zwiększone stężenie albumin w tym obszarze jest także związane z intensywnym metabolizmem komórek nowotworowych, dla których albumina jest źródłem energii dla procesów życiowych [13]. Poza tym albumina jest białkiem stabilnym w szerokim zakresie pH od 4 do 9 oraz zachowuje aktywność przez 10 godzin w temperaturze 60°C. Albumina jest jednym z najmniejszych białek osocza krwi, co sprawia, że spełnia warunki stawiane idealnym nośnikom leków [31]. W wielu typach przenośników albumina jest dołączana do koniugatu, najczęściej poprzez cysteinę (Cys) w pozycji 34, a w wiązaniu tym uczestniczy kwas 6-maleimidokapronowy – EMC (ang. *6-maleimidocaproic acid*). Kolejne składniki koniugatu to peptyd, łącznik i lek przeciwnowotworowy [28, 58]. Znane są również przenośniki zawierające lek + łącznik + peptyd + EMC. Wprowadzone do organizmu przyłączają albuminę endogenną do EMC koniugatu [9, 30]. Tego typu nośniki leków są korzystniejsze nie tylko ze względów immunologicznych, ale także finansowych.

Na rycinie 1 przedstawiono schematycznie budowę przykładowego koniugatu zawierającego oprócz peptydu także omówione powyżej dodatkowe elementy, z których każdy spełnia określoną funkcję i przyczynia się do selektywnego dostarczenia leku do komórek nowotworowych i uwolnienia go z koniugatu.

Poważnym problemem w chemioterapii jest także powszechnie występujące zjawisko oporności nowotworu na stosowane chemioterapeutyki. Oporność ta jest definiowana jako nabycie przez komórki nowotworowe równoczesnej niewrażliwości na kilka grup różnych, niezwiązanych ze sobą czynników terapeutycznych, pojawiająca się w odpowiedzi na stosowanie pojedynczego leku cytostatycznego [60]. Główną przyczyną występowania tego zjawiska jest nadekspresja transporterów błonowych regulujących przepływ zarówno substancji endogennych, jak i ksenobiotyków (w tym leków) między komórką a jej otoczeniem. Głównym białkiem



Składową proleku, którego schemat budowy został przedstawiony na rycinie 2, stanowi dipeptyd, Phe-Lys, który jest rozcinany przez katepsynę B w miejscu połączenia z łącznikiem PABC. Oba ramiona proleku są połączone przez grupę maleimidową. Prolek ten może być także przez tę samą grupę połączony dodatkowo z albuminą za pomocą cysteiny w pozycji 34. Badania *in vivo* w linii gruczolakoraka sutka myszy MT-3/ADR potwierdziły większą aktywność (24 mg/kg) i mniejszą toksyczność ogólnoustrojową koniugatu w porównaniu z wolną doksorubicyną (6–8 mg/kg) [47].

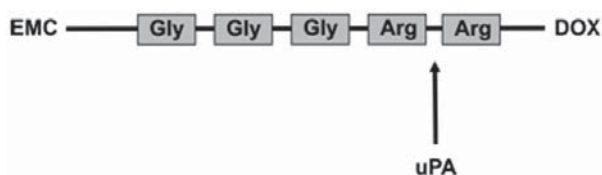
### 3. ENZYMY UCZESTNICZĄCE W UWALNIANIU LEKU Z KONIUGATU

Podczas syntezy peptydów będących składnikami koniugatu bierze się pod uwagę takie sekwencje aminokwasów, które są specyficznie rozpoznawane przez enzymy wykazujące nadekspresję w komórkach nowotworowych lub w ich otoczeniu. Do enzymów tych zalicza się między innymi: katepsyny (B, H, L, D), plazminę oraz aktywatory plazminogenu: uPA (ang. *urokinase type Plasminogen Activator*) i tPA (ang. *tissue Plasminogen Activator*) [9], metaloproteinazy, szczególnie MMP-2 (ang. *Matrix MetalloProteinase-2*) i MMP-9 (ang. *Matrix MetalloProteinase-9*) [58], glukuronidazę [10] czy PSA (ang. *Prostate Specific Antygen*) [14]. Poniżej przedstawiono przykłady proleków, w których wykorzystano peptydy będące substratami dla kilku wymienionych enzymów.

#### UROKINAZOWY AKTYWATOR PLAZMINOGENU (uPA)

Rozwojowi nowotworu towarzyszy wzrost aktywności zewnątrzkomórkowej proteazy serynowej – urokinazowego aktywatora plazminogenu (uPA), który jest jedną z dwóch, obok tkankowego aktywatora plazminogenu (tPA), proteinaz serynowych wchodzących w skład systemu aktywatora plazminogenu. Nadekspresja uPA ma miejsce w wielu nowotworach, zwłaszcza w raku piersi, jajnika i szyjki macicy [9]. W wyniku aktywacji plazminogenu powstaje plazmina, która jest zdolna degradować komponenty macierzy pozakomórkowej, takie jak: fibronektyna, laminina, proteoglikany, aktywować inne enzymy proteolityczne w tym macierzowe metaloproteinazy (MMPs) oraz indukować angiogenezę [1]. uPA odgrywa dużą rolę w przerzutowaniu komórek nowotworowych, co jest jedną z głównych przyczyn niepowodzeń chemioterapii.

Proteaza uPA uczestniczy między innymi w rozcinaniu wiązań, w których doksorubicyna jest przyłączona do peptydu o następującej sekwencji aminokwasów: Gly-Gly-Gly-Arg-Arg. Peptyd jest przyłączony do 3'-NH<sub>2</sub> reszty cukrowej DOX, a

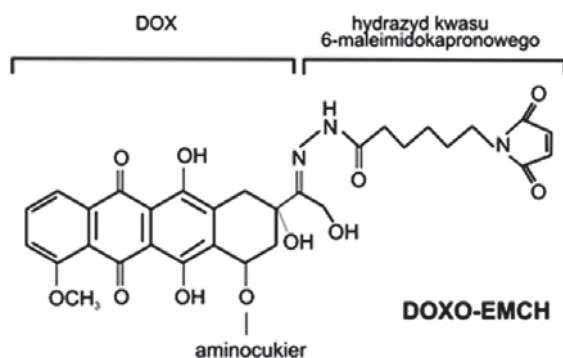


RYCINA 3. Miejsce działania proteazy uPA (na podstawie [9] zmodyfikowany)  
FIGURE 3. The site of action of protease uPA (based on [9] modified)

uPA uczestniczy w uwalnianiu leku poprzez odcinanie ostatniej reszty aminokwasowej (ryc. 3). Ważną okazała się tutaj sekwencja aminokwasów w dołączonym peptydzie. W przeprowadzonych badaniach tylko arginina była efektywnie odcinana od DOX w homogenatach guzów w pH = 7,4. Dodatkowo omawiany koniugat miał fragment EMC, do którego po wprowadzeniu koniugatu do organizmu przyłącza się endogenna albumina [9].

## KATEPSYNY

Aktywacja proleku może być wynikiem działania także innych proteaz, które wykazują nadekspresję w komórkach nowotworowych. Wewnątrzkomórkowymi proteazami odpowiedzialnymi za proteolizę białek w lizosomach są katepsyny, głównie katepsyna B (EC 3.4.22.1), która często wykazuje nadekspresję w nowotworach w postaci guzów litych. Enzym został wykorzystany w badaniach prowadzonych na linii komórkowej raka sutka – M-3366 (łac. *mamma carcinoma*) w obecności proleku o budowie: EMC-Arg-Arg-Ala-Leu-Ala-Leu-DOX. Aktywna postać leku była uwalniana przez katepsynę B [58]. Katepsyna uczestniczy także w uwalnianiu doksorubicyny z koniugatu zawierającego inną pochodną doksorubicyny DOXO-EMCH [(6-*maleimidocapronyl*)*hydrazono* of DOX] (ryc. 4), peptyd oraz samoodłączający się element PABC (1,6 para-aminobenzylksykarbonyl). Do węgla C13 doksorubicyny jest przyłączony hydryd kwasu 6-maleimidokapronowego. Sekwencją rozpoznawaną przez katepsynę jest tu dipeptyd, Phe-Lys, który jest rozcinany przez katepsynę B w miejscu połączenia z PABC. DOX jest uwalniana z koniugatu zewnątrzkomórkowo w kwasowym środowisku guza lub wewnątrz komórek guza, w endosomach lub lizosomach. Cytotoksyczność koniugatu oznaczono na dwóch liniach komórkowych: MDA-MB-231 (rak piersi) i AsPC1 LN (rak trzustki) transfekowanych genem lucyferazy, dla których wykazano, że DOX była 6-krotnie bardziej toksycznym lekiem niż koniugat. Natomiast w badaniach *in vivo*, prowadzonych na myszach z rakiem piersi (MDA-MB 435) zaobserwowano, że rozmiar guza w przypadku podawania DOX (2 × 8 mg) zwiększył się 11 razy, natomiast w obecności proleku opartego na DOXO-EMCH (3 × 24 mg) tylko 3-krotnie [1]. Z kolei badania *in vivo* na szczurach, którym podawano od 11 tygodnia życia DOX (0,8 mg/kg) lub DOXO-EMCH bez fragmentów peptydowych (1,1 lub 3,3 mg/kg) wykazały, że w przeciwieństwie do

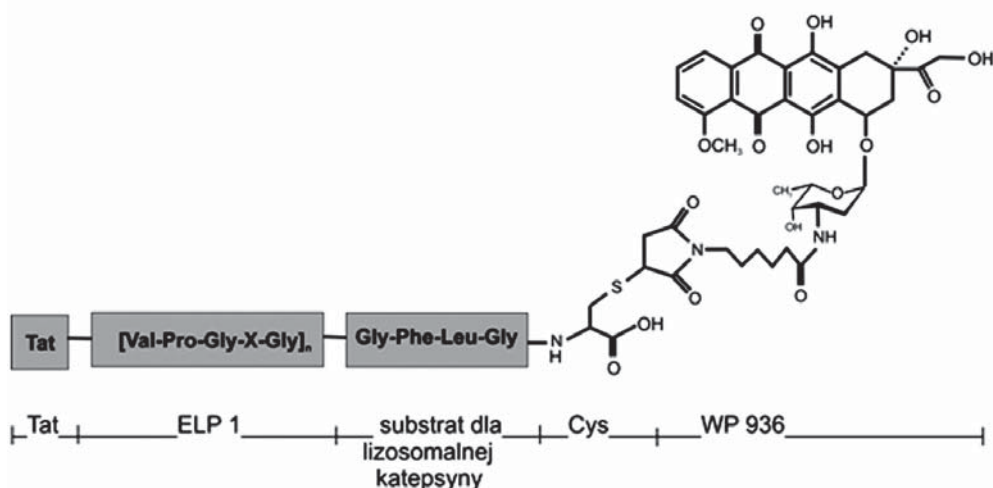


RYCINA 4. Struktura DOXO-EMCH (na podstawie [1] zmodyfikowany)  
FIGURE 4. The structure of a DOXO-EMCH (based on [1] modified)



DOX, DOXO-EMCH nie wywołuje kardiotoxyczności, nie generuje reaktywnych form tlenu oraz nie powoduje obniżenia aktywności oksydazy cytochromu c [33]. Lek ten został poddany badaniom klinicznym. W I fazie badań 41 pacjentom z drobnokomórkowym rakiem płuc podano dawkę 20 mg/m<sup>2</sup> DOXO-EMCH zwiększając ją w zakresie od 20 do 340 mg/m<sup>2</sup> proleku. Skutków ubocznych nie obserwowano aż do dawki 200 mg/m<sup>2</sup> powierzchni ciała. U 10% pacjentów obserwowano częściową odpowiedź na działanie DOXO-EMCH [62]. Obecnie trwa II faza badań klinicznych.

Przykładem bardziej złożonego nośnika jest elastyno-podobny polipeptyd – ELP (ang. *Elastin-Like Polipeptide*), składający się z wielu powtórzeń 5-aminokwasowego motywu: Val-Pro-Gly-X-Gly, gdzie X jest dowolnym aminokwasem z wyjątkiem proliny. W podwyższonej temperaturze ELP tworzy nierozpuszczalne agregaty [20]. Podanie takiej formy związku pozwala na wydłużenie czasu działania i umożliwia spowolnienie jego uwalniania, często przy jednoczesnej redukcji podawanej dawki. Koniugat ma ponadto dwa dodatkowe łączniki, tj. Tat i GFLG (Gly-Phe-Leu-Gly). Ostatecznie składa się on z czterech funkcjonalnych związków: Tat-ELP-GFLG-DOX. Pierwszy – Tat (ang. *Transactivator of HIV transcription protein*) to 11-aminokwasowy, kationowy polipeptyd. Tat ułatwia wiązanie ELP z błoną plazmatyczną. Połączenie peptydu Tat z ELP zwiększa 6-krotnie stężenie leku w komórce. Trzeci komponent to łącznik będący tetrapeptydem (Gly-Phe-Leu-Gly), który jest substratem dla lizosomalnej katepsyny. Ostatnią składową koniugatu stanowi tiolowa pochodna DOX-WP936 związana kowalencyjnie z GFLG poprzez cysteinę (ryc. 5) [5]. Koniugat ma masę cząsteczkową 59 kDA, co uniemożliwia mu bierny transport przez błonę komórkową. Wnika on do komórki drogą endocytozy [50]. W badaniach z ELP-DOX na linii komórkowej mięsaka macicy – MES-SA (ang. *uterine sarcoma*), linii gruczolakoraka piersi – MCF-7 (ang. *breast adeno-*

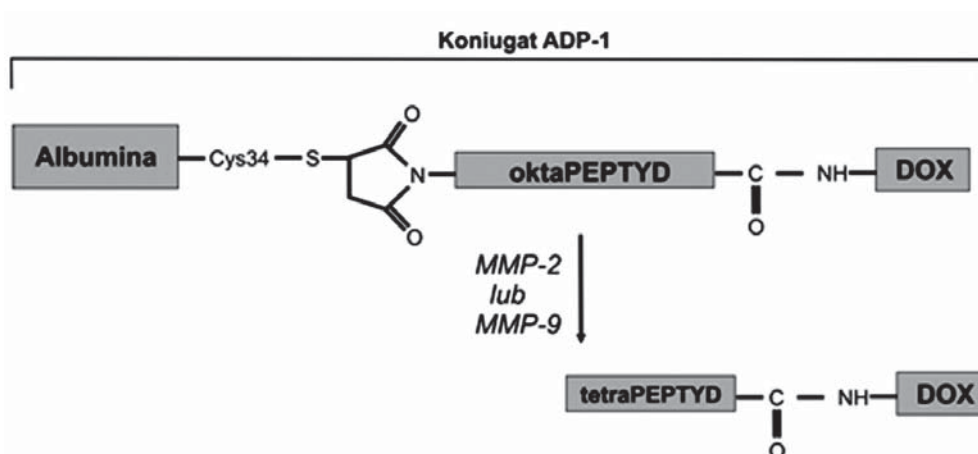


RYCINA 5. Struktura nośnika elastyno-podobnego (na podstawie [5] zmodyfikowany)  
 FIGURE 5. The structure elastin-like polypeptide-doxorubicin conjugate (based on [5] modified)

*carcinoma*), a także na opornych liniach, tj. MES-SA/Dx5 i NCI/ADR-RES wykazano, że linia MES-SA/Dx5 była 70 razy bardziej oporna na DOX niż linia wrażliwa, a NCI/ADR-RES – 30 razy. Koniugat okazał się być jednakowo toksyczny zarówno dla linii wrażliwych, jak i opornych na działanie DOX. Wewnątrzkomórkowy poziom koniugatu zwiększał się w sposób ciągły w linii MES-SA/Dx5 w przeciwieństwie do wolnej DOX, która szybko była usuwana z komórki przez glikoproteinę P. Za pomocą cytometrii przepływowej wykazano, że bezpośrednio po zakończeniu inkubacji (5 godzin, DOX lub koniugat) stężenie koniugatu było bardzo podobne we wszystkich liniach komórkowych. W linii MES-SA/Dx5 traktowanej tylko DOX wyróżniono 2 populacje komórek: w 39% komórek obserwowano wysoki wewnątrzkomórkowy poziom DOX (podobnie w linii wrażliwej), a w 61% komórek obserwowano szybki wypływ DOX. 24 godziny od odplukania leku stężenie DOX w komórkach linii MES-SA/Dx5 spadło 100-krotnie. Koniugat indukował ponadto zależną od temperatury aktywację kaspaz, która prowadzi do śmierci komórek na drodze apoptozy [4].

### METALOPROTEINAZY

Proteazami o lokalizacji zewnątrzkomórkowej, związanymi z procesem nowotworzenia są metaloproteiny. Są one głównymi enzymami zdolnymi do degradacji błony podstawnej i składników macierzy pozakomórkowej. Metaloproteiny są wytwarzane przez komórki nowotworowe oraz przez komórki podścieliska guza. Uczestniczą w procesie progresji nowotworu, angiogenezie i metastazie. Wydzielane przez komórki jako proenzymy, pro-MMPs (ang. *pro-Matrix MetalloProteinases*), ulegają aktywacji pozakomórkowo w wyniku działania innych proteaz. Metaloproteinaza 2 (MMP-2) i metaloproteinaza 9 (MMP-9) zdolne są do rozkładu żelatyny i kolagenu



RYCINA 6. Proteoliza koniugatu ADP-1 przy udziale metaloproteinaz (na podstawie [28] zmodyfikowany)

FIGURE 6. Proteolysis of an ADP-1 conjugate with the participation of metalloproteinases (based on [28] modified)

[34]. Proteiny te są bardzo często wykorzystane jako związki uwalniające czynnik aktywny z proleku. Ulegają one nadekspresji m.in. w raku piersi i w czerniaku.

W koniugacie ADP1 jako nośnik została wykorzystana albumina, która poprzez pochodną maleimidową połączona jest z oktapeptydem, Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln, a ten z kolei z DOX. MMP-2 i MMP-9 tną prolek do tetrapeptydu związanego z DOX (ryc. 6). Oktapeptyd o innej sekwencji, różniący się tylko dwoma aminokwasami Gly-Pro-Gln-Arg-Ile-Ala-Gly-Gln był słabym substratem dla tych enzymów. Prolek charakteryzował się mniejszą cytotoksycznością niż wolna DOX dla mysiej linii raka nerek – RENCA (ang. *murine RENca cell CARcinoma cell line*), z powodu przyłączenia tetrapeptydu do cząsteczki antracykliny [28].

#### SPECYFICZNY ANTYGEN GRUCZOŁU KROKOWEGO (PSA)

Często występującym nowotworem u mężczyzn jest rak prostaty. W walce z lekoopornością, w przypadku tego nowotworu, zastosowano proteazę serynową PSA (ang. *Prostate Specific Antigen*). PSA jest specyficznym antygenem gruczołu krokowego, którego stężenie wzrasta wraz ze stopniem zaawansowania nowotworu. U zdrowych mężczyzn stężenie PSA w osoczu jest śladowe. Dlatego też systematyczne oznaczenie poziomu PSA u pacjentów z nowotworem prostaty służy do monitorowania skuteczności terapii. W koniugacie L-377,202 (N-glutaryl-(4-hydroksyproyl)Ala-Ser-cykloheksylo-glycylo-Gln-Ser-Leu-CO<sub>2</sub>H-DOX), PSA rozcina sekwencję peptydową w miejscu Gln-Ser-Leu do aktywnej postaci leku – Leu-DOX lub DOX. Badania *in vivo* wykazały, że tolerowana dawka koniugatu wynosi 225 mg/m<sup>2</sup> powierzchni ciała [14]. Koniugat ten był 15 razy bardziej niż DOX skuteczny w hamowaniu raka prostaty myszy, a także nie wywoływał kardiotoxyczności, co potwierdzono w analogicznych badaniach na psach [12, 43].

### 4. KONIUGATY ROZPOZNAWANE PRZEZ RECEPTORY TYPOWE DLA KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Niezwykle ważne dla skuteczności koniugatu jest wybiórcze jego wychwytywanie tylko przez komórki nowotworowe. W tym celu dołącza się do koniugatu określone sekwencje aminokwasowe, które rozpoznawane są przez receptory występujące w zwiększonych ilościach na komórkach nowotworowych. Do receptorów tych zalicza się m.in. integryny oraz receptory hormonów peptydowych.

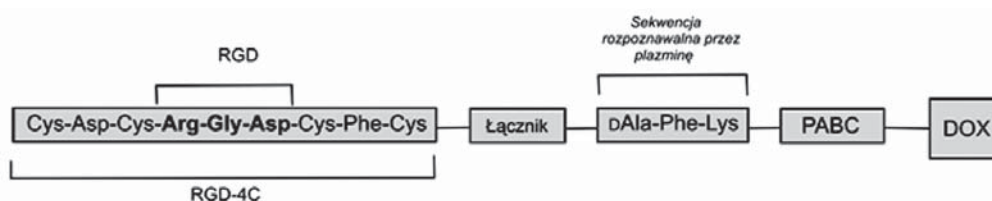
#### INTEGRYNY

Integryny są to heterodimeryczne białka, które pośredniczą w wiązaniu i migracji komórek nowotworowych, uczestniczą w procesie angiogenezy oraz w przekazywaniu sygnałów do wnętrza komórek. Integryny są ważnymi czynnikami towarzyszącymi progresji nowotworów [22]. Nadekspresja integryn  $\alpha\beta_3$ ,  $\alpha\beta_5$  czy  $\alpha\beta_1$  wskazuje, że są one głównymi białkami uczestniczącymi w selektywnej adhezji. Tak np. integryna  $\alpha\beta_3$  pełni istotną rolę w adhezji komórek czerniaka podczas kolonizacji

węzłów chłonnych, a integryna  $\alpha\beta_1$  – w tworzeniu przerzutów raka żołądka do węzłów chłonnych [63]. Integryny rozpoznają w ligandach specyficzne ugrupowania aminokwasów, mianowicie trójpeptyd arginina-glicyna-kwas asparaginowy, nazywany także sekwencją RGD [8, 53]. Dołączanie takiego peptydu ułatwia wychwytywanie proleku przez komórki nowotworowe. Na rycinie 7 przedstawiono prolek z sekwencją aminokwasową CDC-RGD-CFC (RGD-4C) rozpoznawany przez receptor integrynowy [11]. Druga specyficzna sekwencja w tym proleku to Ala-Phe-Lys rozpoznawana przez plazminę. Pomiedzy sekwencjami peptydowymi RGD-4C oraz Ala-Phe-Lys funkcję łącznika pełni aminokapronyl. Drugim łącznikiem w tym proleku jest wspomniany już PABC, który występuje pomiędzy sekwencją rozpoznawalną przez plazminę a DOX. Badania z użyciem tego proleku prowadzono na linii komórkowej włókniakomięsaka – HT1080 i komórkach śródbłonna pozyskanych z żyły pępowinowej – HUVEC (ang. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*). W przypadku obu linii nie wykazano zwiększonej cytotoksyczności koniugatu w porównaniu z DOX [11].

Badania z wykorzystaniem peptydów RGD doprowadziły do skonstruowania stabilnego peptydu – E-[c(RGDfK)<sub>2</sub>] oddzielonego łącznikiem od rozpoznawanego przez metaloproteinazę 2 i 9, tj. oktapeptydu: Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln. Oktapeptyd poprzez łącznik PBAC, jest z kolei połączony z DOX. Prolek ten hamował 6–10-krotnie proliferację komórek śródbłonna – HUVEC. Do leczenia mysich guzów jajnika – OVCAR (ang. *OVarian epithelial CAncer cells*) zastosowano dawkę proleku  $3 \times 24$  mg/kg, podczas gdy maksymalna dawka wolnej DOX wynosi  $2 \times 8$  mg/kg [54].

Połączenie doksorubicyny z pochodną białka ICAM-1 (związanego z adhezją międzykomórkową) doprowadziło do powstania koniugatu cIBR, cyklo (1, 12) Pen PRGGSVLVTGC [38]. Prolek DOX-cIBR wiąże się z  $\alpha_1\beta$  integrynami (LFA-1). Ekspresja LFA-1 ma miejsce głównie na powierzchni limfocytów, dlatego terapia z wykorzystaniem DOX-cIBR jest stosowana w leczeniu białaczek i chorób autoimmunologicznych. Mechanizmy transportu i wewnątrzkomórkowej lokalizacji leku były badane w komórkach linii ostrej białaczki promielocytarnej – HL-60 (ang. *acute promyelocytic leukemia*) o wysokiej ekspresji LFA-1, a także w komórkach HUVEC wykazujących niską ekspresję integryn. Autorzy sugerują, że niewielka ilość leku była transportowana do komórek HL-60 i HUVEC za pomocą receptorów integryn obecnych na ich powierzchni. Koniugat wnikał głównie w wyniku dyfuzji. Przyczyną tak słabego



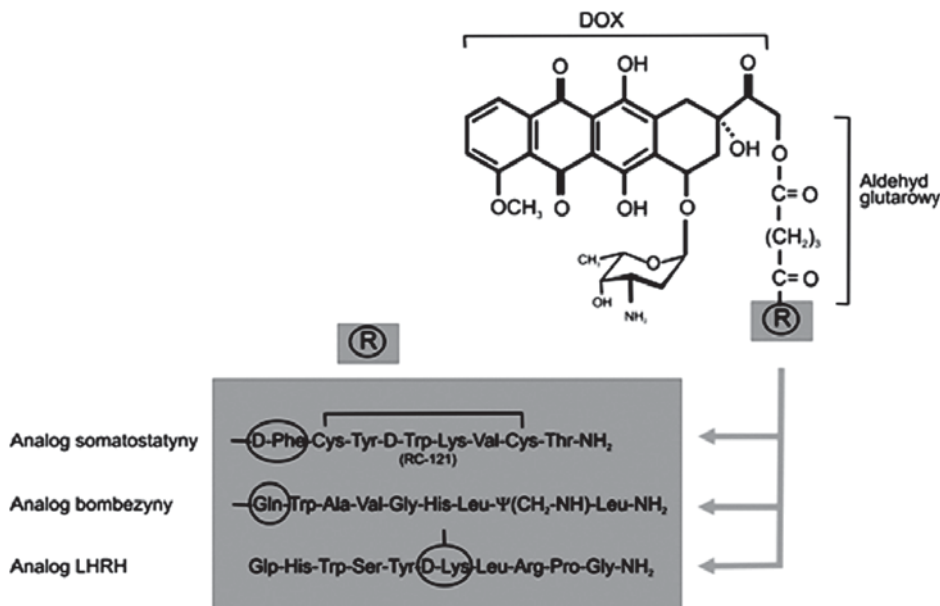
RYCINA 7. Schemat proleku z sekwencją RGD (na podstawie [11] zmodyfikowany)

FIGURE 7. Schematic structure of prodrug containing RGD peptide (based on [11] modified)

powinowactwa koniugatu do receptora mogą być zmiany w strukturze przestrzennej sekwencji Pro-Arg-Gly-Gly (PRGG) po połączeniu cIBR z DOX [38].

## RECEPTORY HORMONÓW PEPTYDOWYCH

Inną budzącą w ostatnich latach zainteresowanie grupą koniugatów są analogi hormonów peptydowych tzw. peptydów penetrujących komórkę – CPP (ang. *Cell Penetrating Peptides*). Nazwa ta obejmuje krótkie sekwencje peptydowe, zdolne do przemieszczenia się przez błonę samodzielnie lub z przyłączonym chemioterapeutykiem. Rycina 8 przedstawia strukturę kilku koniugatów analogów hormonów peptydowych. Wśród tych koniugatów jest analog hormonu uwalniającego gonadotropiny – LHRH (ang. *Luteinizing-Hormone Releasing Hormone*), zawierający przyłączoną DOX lub 500–1000 razy bardziej cytotoksyczną 2-pirolino-DOX (AN-201). Analogi LHRH mają podwyższoną aktywność i wydłużony czas półtrwania w porównaniu z naturalnym hormonem. Analogi somatostatyny – SST (ang. *SomatoStatin*) związane z DOX lub 2-pirolino-DOX, także są rozpoznawane przez receptory dla hormonów peptydowych komórek raka prostaty, sutka, jajnika, nerki, płuc czy mózgu. Z kolei analogi bombezyny – GRP (ang. *Gastrin Releasing Peptide*) – peptydu uwalniającego gastrynę z przyłączoną DOX lub 2-pirolino-DOX są stosowane w leczeniu raka prostaty, drobnokomórowego raka płuc i raka mózgu.



RYCINA 8. Struktura koniugatów zawierających analogi somatostatyny, bombezyny i LHRH (na podstawie [57] zmodyfikowany)

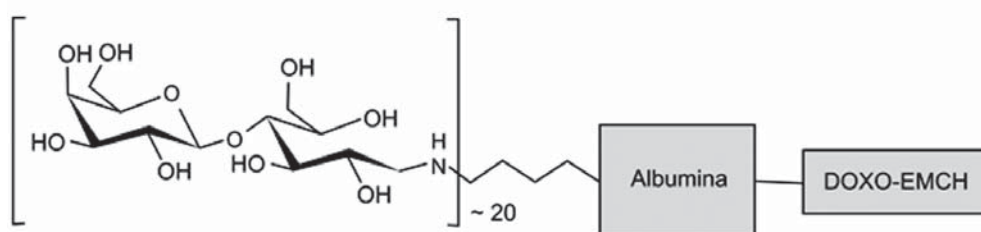
FIGURE 8. The structure of conjugates containing analogues of somatostatin, bombesin and LH-RH (based on [57] modified)

DOX lub 2-pirolino-DOX jest połączona z peptydem poprzez aldehyd glutarowy. Koniugat AN-152 z [D-Lys<sup>6</sup>] LHRH w połączeniu z 14-O-hemiglutaranem DOX lub 2-pirolino-DOX (AN-207) jest w fazie badań klinicznych [57]. Podobnie cytotoksyczny analog somatostatyny – AN-238 znalazł zastosowanie w leczeniu trzech typów nowotworów endometriu (HEC-1A, RL-95-2, AN3CA) nie wywołując zwiększonej ekspresji glikoproteiny P [16]. Wysoka skuteczność i niska toksyczność hormonalnego leczenia nowotworów skłoniły do stosowania analogów bombezyny (AN-215) w przypadku nowotworu nerek – RCC (ang. *Renal Cell Carcinoma*) charakteryzujących się pierwotną opornością na leki [26]. Badania na liniach A-498, ACHN, 786-0 wyprowadzonych z raka nerki szczura dowodzą, że AN-215 hamuje wzrost guzów i w nieznacznym stopniu indukuje ekspresję białka związanego z opornością wielolekową – MRP-1 (ang. *Multidrug Resistance Protein 1*) i P-gp.

Kolejną grupę peptydowych nośników stanowią pochodne kalcytoniny. Jest to polipeptydowy hormon złożony z 32 aminokwasów o masie cząsteczkowej 3420 Da. U człowieka występuje w postaci monomeru lub dimeru. Obecność komórek neuroendokrynnych produkujących kalcytoninę wykrywa się w wielu narządach [52]. Odgrywa on istotną rolę w regulacji gospodarki wapniowo-fosforanowej ustroju. Receptory dla kalcytoniny należą do grupy receptorów związanych z białkami G. Badania prowadzone nad koniugatem DOX z nośnikiem hCT (9-32) (ang. *human CalciTonin*) na liniach komórkowych nerwiaka niedojrzałego (SK-N-MC, SMS-KAN, HEK 293 T) wykazały, że lek wnikał do komórki za pomocą endocytozy [32].

## RECEPTOR ASJALOGLIKOPROTEIN

Rak wątroby jest piątym najczęściej występującym nowotworem złośliwym na świecie. Zaobserwowano, że tylko na powierzchni hepatocytów występują receptory asjaloglikoproteinowe – ASGP-R (ang. *ASjaloGlycoProtein Receptor*). Na 60 wykonanych biopsji raka wątroby – HCC (ang. *HepatoCellular Carcinoma*), w 80% przypadków wykryto wysoki poziom ASGP-R [61]. Koniugatem rozpoznawanym przez receptory asjaloglikoprotein jest DOXO-EMCH, transportowana za pomocą pochodnej



RYCINA 9. Struktura L-HSA-DOXO (na podstawie [61] zmodyfikowany)  
 FIGURE 9. The structure of L-HSA-DOXO (based on [61] modified)

formy albuminy (L-HSA), w której na 20 cząsteczek galaktozy przypadało 5 DOXO-EMCH (ryc. 9), a na 1 mg koniugatu od 36 do 50  $\mu\text{g}$  DOX. Koniugat DOXO-EMCH jest stabilny w pH neutralnym. Wnika on do komórki w drodze endocytarnej. W endosomach pH ulega obniżeniu do poziomu 6,5–5,0. W wyniku fuzji z lizosomami, bogatymi w szereg enzymów (esterazy, proteazy czy lipazy uwalniających substancje czynne z koniugatu), pH ulega dalszemu obniżeniu do około 4,0 [18, 41].

Prolek ten był stosowany w przypadku nowotworu wątroby u myszy w dawce  $4 \times 1 \text{ mg/kg}$ . Nie prowadził do obniżenia ciężaru myszy w przeciwieństwie do wolnej DOX [15, 19]. Ponadto w badaniach prowadzonych na szczurach wykazano, że wewnątrzkomórkowy poziom L-HSA-DOXO wzrasta niezależnie od stopnia różnicowania komórek nowotworowych. Może być zatem stosowany w różnych stadiach zaawansowania choroby [18].

## 5. PODSUMOWANIE

Chemioterapia jest nieskuteczna dla wielu typów nowotworów, ale bardzo toksyczna dla komórek zdrowych. Problem ten wymaga dwóch radykalnych rozwiązań: wynalezienia nośników leków zdolnych do ich selektywnego dostarczania nowotworów oraz wyprodukowania nowych czynników terapeutycznych, które będą toksyczne tylko dla komórek nowotworowych. Spośród wielu potencjalnych nośników leków, testowanych *in vitro* i *in vivo*, na uwagę zasługują peptydy CPP, które spontanicznie są transportowane przez błonę plazmatyczną, oraz peptydy specyficzne dla komórek – CTP (ang. *Cytoplasmic Transduction Peptide*). Ta druga grupa peptydów, do których należy peptyd RGD, charakteryzuje się wysoką specyficznością oraz silnym powinowactwem do komórek, które na swojej powierzchni zawierają bardzo dużą liczbę receptorów. Peptydy CTP rozpoznają te specyficzne typy komórek i do nich transportują leki przeciwnowotworowe. Jakkolwiek nie wyjaśniono jeszcze do końca mechanizmów wnikania koniugatów leków z peptydami do komórek, sposobów uwalniania leków i ich efektywnego wykorzystywania przez nowotwory, nośnikom peptydowym przypisuje się wiele zalet. Należą do nich m.in.: selektywne dostarczanie leków do komórek nowotworowych, ograniczenie efektów ubocznych i oporności wielolekowej. Ponadto peptydy można modyfikować w celu zwiększenia ich stabilności metabolicznej i powinowactwa do leków. Za pomocą technik chromatograficznych i spektroskopii masowej w bardzo krótkim czasie można dokonać pełnej ich charakterystyki. Nośniki peptydowe mają również i tę przewagę nad innymi transporterami leków, że są łatwe do otrzymania, przechowywania i dystrybucji.

## LITERATURA

- [1] AJAJ KA, GRAESER R, FICHTNER I, KRATZ F. *In vitro* and *in vivo* study of an albumin-binding prodrug of doxorubicin that is cleaved by cathepsin B. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; **64**: 413–418.

- [2] AJAJ KA, KRATZ F. Development of dual-acting prodrugs for circumventing multidrug resistance. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; **19**: 995–1000.
- [3] ALVAREZ-LORENZO C, CONCHEIRO A. Intelligent drug delivery systems: polymeric micelles and hydrogels. *Mini Rev Med Chem* 2008; **8**: 1065–1074.
- [4] BIDWELL GL, DAVIS AN, FOKT I, PRIEBE W, RAUCHER D. A thermally targeted elastin-like polypeptide-doxorubicin conjugate overcomes drug resistance. *Invest New Drugs* 2007; **25**: 313–326.
- [5] BIDWELL GL, FOKT I, PRIEBE W, RAUCHER D. Development of elastin-like polypeptide for thermally targeted delivery of doxorubicin. *Biochem Pharmacol* 2007; **73**: 620–631.
- [6] BRODER H, GOTTLIEB RA, LEPOR NE. Chemotherapy and cardiotoxicity. *Rev Cardiovasc Med* 2008; **9**: 75–83.
- [7] CHABRE YM, ROY R. Recent trends in glycodendrimer syntheses and applications. *Curr Top Med Chem* 2008; **8**: 1237–1285.
- [8] CHIONI AM, GROSE R. Organotypic modelling as a means of investigating epithelial-stromal interactions during tumourigenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2008; **1**: 1–8.
- [9] CHUNG D-E, KRATZ F. Development of a novel albumin-binding prodrug that is cleaved by urokinase-type-plasminogen activator (uPA). *Bioorg Med Chem Lett* 2006; **16**: 5157–5163.
- [10] DE GRAAF M, BOVEN E, OOSTERHOFF D, VAN DER MEULEN-MUILEMAN IH, HULS GA, GERRITSEN WR, HAISMA HJ, PINEDO HM. A fully human anti-Ep-CAM scFv-beta-glucuronidase fusion protein for selective chemotherapy with a glucuronide prodrug. *Br J Cancer* 2002; **86**: 811–818.
- [11] DE GROOT FMH, BROXTERMAN HJ, ADAMS HPHM, VAN VLIET A, TESSER GI, ELDERKAMP YW, SCHRAA AJ, KOK RJ, MOLEMA GL. Design, synthesis, and biological evaluation of a dual tumorspecific motive containing integrin-targeted plasmincleavable doxorubicin prodrug. *Mol Cancer Therap* 2002; **1**: 901–911.
- [12] DEFEO-JONES D, GARSKY VM, WONG BK, FENG DM, BOLYAR T, HASKELL K, KIEFER DM, LEANDER K, MCAVOY E, LUMMA P, WAI J, SENDERAK ET, MOTZEL SL, KEENAN K, VAN ZWIETEN M, LIN JH, FREIDINGER R, HUFF J, OLIFF A, JONES RE. A peptide-doxorubicin 'prodrug' activated by prostate-specific antigen selectively kills prostate tumor cells positive for prostate-specific antigen *in vivo*. *Nat Med* 2000; **6**: 1248–1252.
- [13] DESAI N, TRIEU V, DAMASCELLI B, SOON-SHIONG P. SPARC expression correlates with tumor response to albumin-bound paclitaxel in head and neck cancer patients. *Transl Oncol* 2009; **2**: 59–64.
- [14] DI PAOLARS, RINEHART J, NEMUNAITIS J, EBBINGHAUS S, RUBIN E, CAPANNAT, CIARDELLAM, DOYLE-LINDRUD S, GOODWIN S, FONTAINE M, ADAMS N, WILLIAMS A, SCHWARTZ M, WINCHELL G, WICKERSHAM K, DEUTSCH P, YAO SL. Characterization of a novel prostate-specific antigen-activated peptide-doxorubicin conjugate in patients with prostate cancer. *J Clin Oncol* 2002; **20**: 1874–1879.
- [15] DI STEFANO G, FIUME L, DOMENICALI M, BUSI C, CHIECO P, KRATZ F, LANZA M, MATTIOLI A, PARIALI M, BERNARDI M. Doxorubicin coupled to lactosaminated albumin: effects on rats with liver fibrosis and cirrhosis. *Dig Liver Dis* 2006; **38**: 404–408.
- [16] ENGEL JB, SCHALLY AV, HALMOS G, BAKER B, NAGY A, KELLER G. Targeted therapy with a cytotoxic somatostatin analog, AN-238, inhibits growth of human experimental endometrial carcinomas expressing multidrug resistance protein MDR-1. *Cancer* 2005; **104**: 1312–1321.
- [17] FERREIRAAL, MATSUBARA LS, MATSUBARA BB. Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008; **6**: 278–281.
- [18] FIUME L, BAGLIONI M, BOLONDI L, FARINA C, DI STEFANO G. Doxorubicin coupled to lactosaminated human albumin: a hepatocellular carcinoma targeted drug. *Drug Discov Today* 2008; **13**: 1002–1009.
- [19] FIUME L, BOLONDI L, BUSI C, CHIECO P, KRATZ F, LANZA M, MATTIOLI A, DI STEFANO G. Doxorubicin coupled to lactosaminated albumin inhibits the growth of hepatocellular carcinomas induced in rats by diethylnitrosamine. *J Hepatol* 2005; **43**: 645–652.
- [20] FURGESON DY, DREHER MR, CHILKOTI A. Structural optimization of a „smart” doxorubicin-polypeptide conjugate for thermally targeted delivery to solid tumors. *J Controll Rel* 2006; **110**: 362–369.
- [21] GANESH T. Improved biochemical strategies for targeted delivery of taxoids. *Bioorg Med Chem* 2007; **15**: 3597–3623.
- [22] GARMY-SUSINI B, VARNER JA. Roles of integrins in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Lymphat Res Biol* 2008; **6**: 155–163.
- [23] GERWECK LE, VIJAYAPPA S, KOZIN S. Tumor pH controls the *in vivo* efficacy of weak acid and base chemotherapeutics. *Mol Cancer Ther* 2006; **5**: 1275–1279.



- [24] HUDECZ F, KÓCZÁN G, REMÉNYI J. Peptide or protein based delivery and targeting, in molecular pathomechanisms and new trends in drug research (Keri G. and Toth, I., eds.), Taylor and Francis group, London, 2003: 553–578.
- [25] HUDECZ F, PIMM MV, RAJNAVÖLGYI E, MEZŐ G, FABRA A, GAAL D, KOVACS AL, HORVATH A, SZEKERKE M. Carrier design: new generation of polycationic branched polypeptides containing OH groups with prolonged blood survival and diminished *in vitro* cytotoxicity. *Bioconj Chem* 1999; **10**: 781–790.
- [26] KELLER G, SCHALLY AV, NAGY A, HALMOS G, BAKER B, ENGEL JB. Targeted chemotherapy with cytotoxic bombesin analogue AN-215 can overcome chemoresistance in experimental renal cell carcinomas. *Cancer* 2005; **104**: 2266–2274.
- [27] KOUTRAS AK, FOUNTZILAS G, DAFNI U, DIMOPOULOS MA, PECTASIDES D, KLOUVAS G, PAPAKOSTAS P, KOSMIDIS P, SAMANTAS E, GOGAS H, BRIASOULIS E, VOURLI G, PETSAST T, XIROS N, KALOFONOS HP. Myelotoxicity as a prognostic factor in patients with advanced breast cancer treated with chemotherapy: a pooled analysis of two randomised trials conducted by the Hellenic Cooperative Oncology Group. *Anticancer Res* 2008; **28**: 2913–2920.
- [28] KRATZ F, DREVS J, BING G, STOCKMAR C, SCHEUERMANN K, LAZAR P, UNGER C. Development and *in vitro* efficacy of novel MMP2 and MMP9 specific doxorubicin albumin conjugates. *Bioorg Med Chem Lett* 2001; **11**: 2001–2006.
- [29] KRATZ F, MÜLLER IA, RYPPA C, WARNECKE A. Prodrug strategies in anticancer chemotherapy. *Chem Med Chem* 2008; **3**: 20–53.
- [30] KRATZ F, WARNECKE A, SCHEUERMANN K, STOCKMAR C, SCHWAB J, LAZAR P, DRÜCKES P, ESSER N, DREVS J, ROGNAN D, BISSANTZ C, HINDERLING C, FOLKERS G, FICHTNER I, UNGER C. Probing the cysteine-34 position of endogenous serum albumin with thiol-binding doxorubicin derivatives. Improved efficacy of an acid-sensitive doxorubicin derivative with specific albumin-binding properties compared to that of the parent compound. *J Med Chem* 2002; **45**: 5523–5533.
- [31] KRATZ F. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J Control Release* 2008; **132**: 171–183.
- [32] KRAUSS U, KRATZ F, BECK-SICKINGER AG. Novel daunorubicin-carrier peptide conjugates derived from human calcitonin segments. *J Mol Recognit* 2003; **16**: 280–278.
- [33] LEBRECHT D, GEIST A, KETELSEN U-P, HABERSTROH J, SETZER B, KRATZ F, WALKER UA. The 6-maleimidocaproyl hydrazone derivative of doxorubicin (DOXO-EMCH) is superior to free doxorubicin with respect to cardiotoxicity and mitochondrial damage. *Int J Cancer* 2006; **120**: 927–934.
- [34] LIBRA M, SCALISIA, VELLA N, CLEMENTI S, SORIO R, STIVALA F, SPANDIDOS DA, MAZZARINO C. Uterine cervical carcinoma: role of matrix metalloproteinases. *Int J Oncol* 2009; **34**: 897–903.
- [35] LOADMAN PM, BIBBY MC, DOUBLE JA, AL-SHAKHAA WM, DUNCAN R. Pharmacokinetics of PK1 and doxorubicin in experimental colon tumor models with differing responses to PK1. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 3682–3688.
- [36] LORUSSO V, MANZIONE L, SILVESTRIS N. Role of liposomal anthracyclines in breast cancer. *Ann Oncol* 2007; **18**: 70–73.
- [37] ŁUBGAN D, JÓZWIĄK Z, GRABENBAUER GG, DISTEL LV. Doxorubicin-transferrin conjugate selectively overcomes multidrug resistance in leukaemia cells. *Cell Mol Biol Lett* 2009; **14**: 113–127.
- [38] MAJUMDAR S, KOBAYASHI N, KRISSE JP, SIAHAAN TJ. Mechanism of internalization of an ICAM-1-derived peptide by human leukemic cell line HL-60: influence of physicochemical properties on targeted drug delivery. *Mol Pharmaceutics* 2007; **4**: 749–758.
- [39] MANSOUR M, DREVS J, ESSER N, HAMADA FM, BADARY OA, UNGER C, FICHTNER I, KRATZ F. A new approach for the treatment of malignant melanoma: enhanced antitumor efficacy of an albumin-binding doxorubicin prodrug that is cleaved by matrix metalloproteinase 2. *Cancer Res* 2003; **63**: 4062–4066.
- [40] MARCUCCI F, LEFOULON F. Active targeting with particulate drug carriers in tumor therapy: fundamentals and recent progress. *Drug Discov Today* 2004; **9**: 219–228.
- [41] MEDINA-KAUWE LK. „Alternative” endocytic mechanisms exploited by pathogens: new avenues for therapeutic delivery? *Adv Drug Deliv Rev* 2007; **59**: 798–809.
- [42] MODOK S, MELLOR HR, CALLAGHAN R. Modulation of multidrug resistance efflux pump activity to overcome chemoresistance in cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2006; **6**: 350–354.
- [43] MONNERET C. Recent developments in the field of antitumor anthracyclines. *Eur J Med Chem* 2001; **36**: 483–493.
- [44] NAGY IB, HUDECZ F, ALSINA MA, REIG F. Physicochemical characterization of branched chain polymeric polypeptide carriers based on a polylysine backbone. *Biopolymers* 2003; **70**: 323–335.

- [45] NAUGHTON CA. Drug induced nephrotoxicity. *Am Fam Physician* 2008; **78**: 743–750.
- [46] NEVOZHAY D, KAŃSKA U, BUDZYŃSKA R, BORATYŃSKI J. Współczesny stan badań nad koniugatami i innymi systemami dostarczania leków w leczeniu schorzeń nowotworowych i innych jednostek chorobowych. *Post Hig Med Dośw* 2007; **61**: 350–360.
- [47] NEWMAN MJ, RODARTE JC, BENBATOUL KD, ROMANO SJ, ZHANG C, KRANE S, MORAN EJ, UYEDART, DIXON R, GUNS ES, MAYER LD. Discovery and characterization of OC144-093, a novel inhibitor of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res* 2000; **60**: 2964–2972.
- [48] PANNU N, NADIM MK. An overview of drug-induced acute kidney injury. *Crit Care Med* 2008; **36**: 216–223.
- [49] PATIL SB, SAWANT KK. Mucoadhesive microspheres: a promising tool in drug delivery. *Curr Drug Deliv* 2008; **5**: 312–318.
- [50] PENG XH, QIAN X, MAO H, WANG AY, CHEN ZG, NIE S, SHIN DM. Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy. *Int J Nanomedicine* 2008; **3**: 311–321.
- [51] REMÉNYI J, CSÍK G, KOVÁCS P, REIG F, HUDECZ F. The effect of the structure of branched polypeptide carrier on intracellular delivery of daunomycin. *Biochim Biophys Acta* 2006; **1758**: 280–289.
- [52] RENNERT R, NEUNDORF I, BECK-SICKINGER AG. Calcitonin-derived peptide carriers: Mechanisms and application. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; **60**: 485–498.
- [53] ROLSKI J, NIEMIEC M. Inhibitory integryn w leczeniu nowotworów. *Wsp Onkol* 2008; **12**: 374–379.
- [54] RYPPA C, MANN-STEINBERG H, FICHTNER I, WEBER H, SATCHI-FAINARO R, BINIOSSEK ML, KRATZ F. *In vitro* and *in vivo* evaluation of doxorubicin conjugates with the divalent peptide E-[c(RGDfK)] that targets integrin. *Bioconjugate Chem* 2008; **19**: 1414–1422.
- [55] RYSER HJ, SHEN WC. Conjugation of methotrexate to poly (L-lysine) increases drug transport and overcomes drug resistance in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; **75**: 3867–3870.
- [56] SARIN H, KANEVSKY AS, WU H, BRIMACOMBE KR, FUNG SH, SOUSA AA, AUH S, WILSON CM, SHARMA K, ARONOVA MA, LEAPMAN RD, GRIFFITHS GL, HALL MD. Effective transvascular delivery of nanoparticles across the blood-brain tumor barrier into malignant glioma cells. *J Transl Med* 2008; **18**: 1–15.
- [57] SCHALLY AV, NAGY A. New approaches to treatment of various cancers based on cytotoxic analogs of LHRH, somatostatin and bombesin. *Life Sci* 2003; **72**: 2305–2320.
- [58] SCHMID B, CHUNG D-E, WARNECKE A, FICHTNER I, KRATZ F. Albumin-binding prodrugs of camptothecin and doxorubicin with an Ala-Leu-Ala-Leu-linker that are cleaved by cathepsin B: synthesis and antitumor efficacy. *Bioconjug Chem* 2007; **18**: 702–716.
- [59] STEIN R, MATTES MJ, CARDILLO TM, HANSEN HJ, CHANG CH, BURTON J, GOVINDAN S, GOLDENBERG DM. CD74: a new candidate target for the immunotherapy of B-cell neoplasms. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 5556–5563.
- [60] SZAKÁCS G, PATERSON JK, LUDWIG J, BOOTH-GENTHE C, GOTTESMAN MM. Targeting multi-drug resistance in cancer. *Nature* 2006; **5**: 219–234.
- [61] TRERÉ D, FIUME L, DE GIORGI LB, DI STEFANO G, MIGALDI M, DERENZINI M. The asialoglycoprotein receptor in human hepatocellular carcinomas: its expression on proliferating cells. *Br J Cancer* 1999; **81**: 404–408.
- [62] UNGER C, HÄRING B, MEDINGER M, DREVS J, STEINBILD S, KRATZ F, MROSS K. Phase I and pharmacokinetic study of the (6-maleimidocaproyl) hydrazone derivative of doxorubicin. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 4858–4566.
- [63] YIN H, LEE ES, KIM D, LEE KH, OH KT, BAE YH. Physicochemical characteristics of pH-sensitive poly(L-histidine)-b-poly(ethylene glycol)/poly(L-lactide)-b-poly(ethylene glycol) mixed micelles. *J Control Release* 2008; **126**: 130–138.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 11.05.2009

Przyjęto: 25.06.2009

Aneta Rogalska

Katedra Termobiologii, Instytut Biofizyki, Uniwersytet Łódzki

ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

e-mail: zychan@biol.uni.lodz.pl