

УДК 541(183+64)

ПОЛИМЕРЫ НА ПОВЕРХНОСТИ НАНОЧАСТИЦ: РЕГУЛИРОВАНИЕ СВОЙСТВ НОСИТЕЛЕЙ И ИХ БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ

© 1994 г. В. П. Торчилин, В. С. Трубецкой

Центр визуализации и фармацевтических исследований,
Массачусеттская центральная больница и Гарвардская медицинская школа
Чарльстон, Массачусетс 02129, США

Поступила в редакцию 11.05.94 г.

Физико-химические и биологические свойства, а также биораспределение носителей лекарств, имеющих размеры микрочастиц (полимерных наночастиц, латексов, мицелл и т.п.) можно модифицировать прививкой различных полимеров к их поверхности. Наиболее ярким примером этого является покрытие липосом ПЭГ, приводящее к увеличению времени их циркулирования в организме. Методом тушения флуоресценции и модельными расчетами было показано, что гибкость полимерной цепи является главной причиной стерического защитного эффекта, проявляемого не только ПЭГ, но и другими синтетическими гибкоцепными полимерами: полиакриламидом и поливинил-пирролидоном. Оптимизацией методов модификации и соотношения полимер : носитель были определены условия совместной прививки защитного полимера и активного начала. Используя этот подход, удалось создать иммунонаправленные липосомы, обладающие комбинированным действием (направленностью и длительностью циркулирования) в условиях *in vivo*. Модификация наночастиц полимерами может привести к изменению их спектральных характеристик и представляет собой удобный инструмент для создания носителей с заданными свойствами, в частности контрастирующих агентов для ЯМР-визуализации.

Поверхностная модификация носителей, имеющих размеры наночастиц, таких как наносферы, нанокапсулы, липосомы и мицеллы, позволяет целенаправленно изменять их свойства и использовать для транспорта диагностических агентов и лекарств [1 - 3]. Основные цели такой модификации заключаются в повышении стабильности и времени циркуляции наноносителей, регулировании их распределения в живом организме (биораспределения), придании им направленного действия и некоторых специфических свойств, таких как pH- или термочувствительность. Для решения этих задач используют различные модифицирующие агенты, наиболее важными из которых являются антитела, их фрагменты, белки, моно-, олиго- и полисахариды, хелатирующие агенты, такие как этилендиаминетрауксусная кислота (ЭДТК), диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТПК) или дефероксамин, а также синтетические водорастворимые полимеры.

Модификация наноносителей антителами или другими специфическими лигандами (например, сахарами) сопровождается резким изменением их биораспределения: специфическое узнавание иммобилизованного на носителе соединения и предполагаемой мишени в живом организме приводит к появлению у таких систем направленности действия, причем подобные изменения характерны

для любых носителей, модифицированных идентичными лигандами. Свойства направленных носителей лекарств, модифицированных специфическими лигандами, детально обсуждены в работе [4].

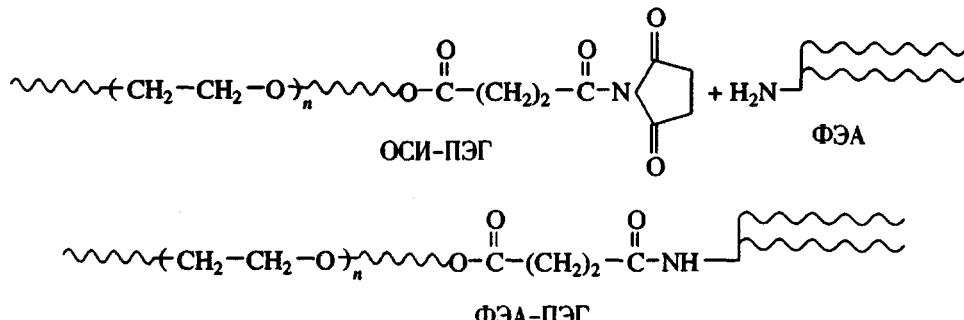
Цель настоящей работы – анализ явлений, возникающих в результате поверхностной модификации носителей некоторыми полимерами. Независимо от конкретного назначения, модификация носителей синтетическими полимерами сопровождается появлением интересных теоретических, экспериментальных и практических проблем, связанных с доступностью поверхности носителя для взаимодействующих с ним веществ. Более того, присутствие некоторых полимеров на поверхности носителей может изменить их физико-химические (например, спектральные) характеристики, равно как и свойства иммобилизованных на них веществ.

СВОЙСТВА ЛИПОСОМ С ПРИВИТЫМИ ПОЛИМЕРАМИ. ДОСТУПНОСТЬ ПОВЕРХНОСТИ ЛИПОСОМ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ГИБКОЦЕПНЫМИ ПОЛИМЕРАМИ

Липосомы (двухслойные фосфолипидные везикулы) являются хорошей моделью для понимания влияния прививаемого полимера на свойства

носителя, а их поведение может описывать и поведение микрочастиц. Началом широкого изучения биологических свойств этих систем явилось создание долго циркулирующих в организме липосом [5, 6]. Один из наиболее популярных и удачных методов их получения включает обработку липосом ПЭГ [7, 8]. Этот полимер часто ис-

пользуют в качестве матрицы для модификации и иммобилизации лекарств и ферментов из-за его биосовместимости и химической инертности [9]. Чтобы включить ПЭГ в липосомальную мембрану, его концевые группы модифицируют оксиэтилсукцинимидом (ОСИ), а затем фосфатидилэтаноламином (ФЭА) по схеме



Такой амфи菲尔ный ПЭГ (ФЭА-ПЭГ) может быть включен в липосомальную мембрану в процессе ее приготовления.

Механизм защитного действия ПЭГ на липосомы включает участие молекул ПЭГ в отталкивании модифицированными мембранными различными частицами [10], изменение заряда и гидрофильности модифицированных липосом [11] и снижение скорости адсорбции плазменных белков на гидрофилизованной ПЭГ поверхности липосом [12].

Для дальнейшего понимания того, какие особенности поведения привитого ПЭГ придают ему способность изменять поверхностные свойства липосом (например, препятствовать сорбции на них форменных элементов крови), мы постарались рассмотреть эти явления с физико-химической точки зрения и предположили, что макромолекулярный механизм защитного действия ПЭГ определяется гибкостью его макромолекул и включает образование плотного полимерного "облака" над поверхностью липосомы даже при относительно низкой концентрации полимера в растворе [13].

Считая диффузионное движение макромолекул ПЭГ к поверхности липосом первой стадией их взаимодействия, можно выразить степень защищенности липосомы вероятностью столкновения макромолекул полимера между собой P . Для предсказания возможных величин P можно описать поведение привитого на липосому полимера в терминах статистической физики, используя упрощенную модель раствора полимера [14], представив его трехмерной кубической решеткой, каждая ячейка которой может быть занята или звеном молекулы полимера, или молекулой растворителя (воды). В таком случае чем более гибок полимер, т.е. чем более независимо движение одного его звена относительно соседнего, тем больше число возможных конформаций и

тем выше скорость перехода одной конформации в другую. Это означает, что водорастворимый гибкоцепной полимер статистически существует как распределение ("облако") вероятных конформаций. Рис. 1 в первом приближении иллюстрирует, как образуется такое "облако", и как его плотность и однородность возрастают с увеличением числа возможных конформаций. Гибкость полимера коррелирует с его способностью занимать с высокой частотой большое число ячеек, постепенно вытесняя из них молекулы воды и делая их непроницаемыми для других растворенных веществ. Чтобы достичь поверхности липосомы, макромолекулы из раствора должны проникнуть через все "облако", образованное привитыми цепями полимера. Таким образом, относительно малое число водорастворимых и очень гибких полимерных молекул может составить значительное количество высокоплотных конформационных "облаков" над липосомальной поверхностью, защищающей последнюю от взаимодействия с "чужими" макромолекулами. Молекулы привитого на поверхность липосомы полимера, образующие защитный "зонтик", и связь соответствующей вероятности (протективного эффекта) с объемом "зонтика" схематически представлены на рис. 2.

У жесткоцепного полимера с ограниченной подвижностью звеньев число возможных конформаций меньше, а конформационные переходы происходят с более низкой скоростью. Это означает, что плотность конформационного "облака" неравномерна в процессе одиночного акта столкновения, а число вытесненных молекул воды много меньше. В рамках "решеточной" модели становится ясным, что существует некоторый объем растворителя (воды), через который нормальная диффузия молекул из окружающей среды (например, плазменных белков) к поверхности липосомы все еще возможна. В этом случае для защиты липосомы необходимо привить на ее

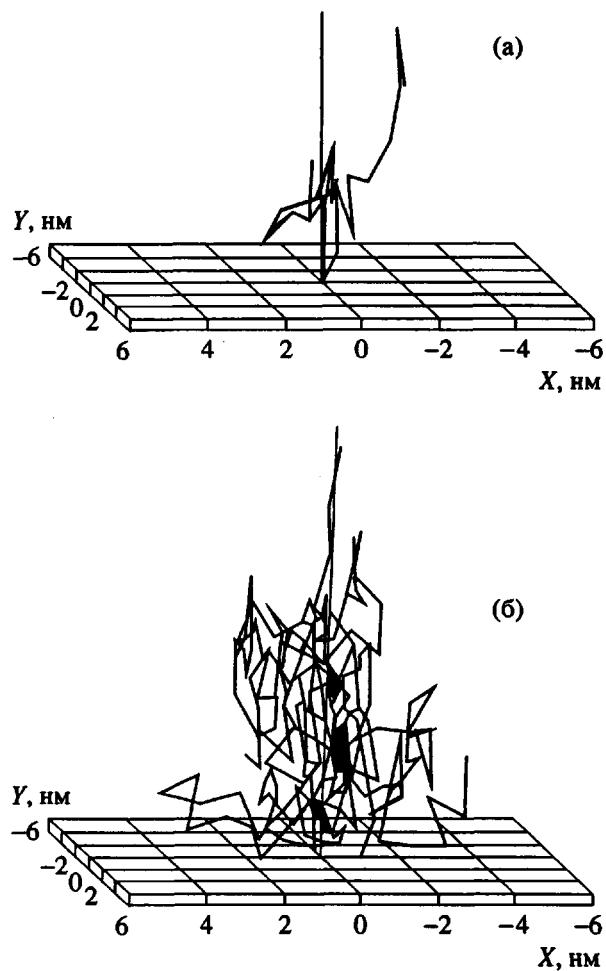


Рис. 1. Компьютерное изображение конформационного облака поверхности-связанного полимера, состоящего из 20 сегментов, длиной 1 нм каждый, для одной конформации (а) и для суперпозиции одиннадцати конформаций (б). Пояснения в тексте.

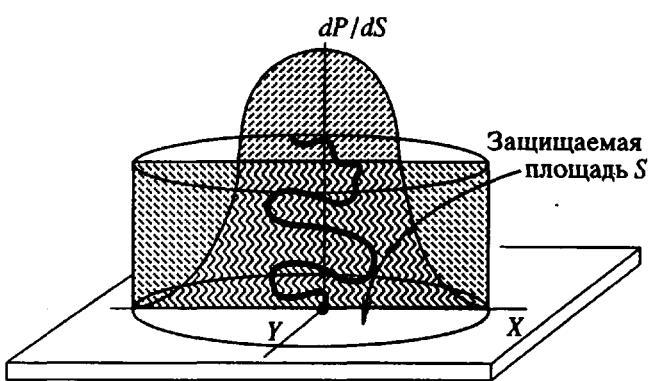


Рис. 2. Распределение плотности вероятности столкновения инородной и привитой к поверхности липосомы макромолекул P над протектируемой поверхностью площаи S (колоколообразная кривая) и среднее значение P внутри объема "зонтика". Пояснения в тексте.

поверхность значительно большее количество макромолекул. Следовательно, хорошая водорстворимость и гидрофильность сами по себе не дают заметного защитного эффекта. Только когда один и тот же полимер сочетает в себе гидрофильность и гибкость цепей, он может действовать как эффективный протектор липосомы даже при относительно низкой концентрации привитых цепей. Наиболее ярким примером такого полимера является ПЭГ, другими – поликарбамид, поливинилпирролидон и поливиниловый спирт.

Размер области на поверхности липосомы, защищаемой индивидуальной макромолекулой данной ММ, и число макромолекул, требующихся для эффективной защиты липосомы данного размера, можно определить, используя такой параметр как среднее расстояние между концами цепей полимерного клубка в растворе R_0 . Полимерные молекулы локализованы главным образом в полимерных клубках в растворах и в полусферах привитого на поверхность полимера. Можно считать, что величина R_0 близка к радиусу "плотного облака" R на поверхности липосомы. Поскольку среднее расстояние между концами привитых на поверхность цепей должны быть в 2 раза меньше, чем R_0 , можно полагать, что размеры радиуса защитной сферы лежат между R_0 и $2R_0$. Используя это простое приближение и известные значения величины R_0 для ПЭГ различной ММ [15], можно оценить размеры области липосомы, защищаемой одной молекулой ПЭГ. Считая, что число молекул липида во внешнем монослое простой двухслойной липосомы диаметром 100 нм составляет $\sim 4.25 \times 10^4$ [16, 17], мы рассчитали зависимость молярного соотношения ПЭГ : липид, необходимого для 100%-ного покрытия поверхности липосомы площадью $S = 3.14 \times 10^4$ нм², от ММ полимера (рис. 3). Отметим, что полученные результаты хорошо совпадают с ранее опубликованными данными [18, 19], а это означает, что параметр R_0 может быть использован для оценки радиуса протектируемой окружности.

Дальнейшее развитие наших представлений включает математическое моделирование, описанное ниже.

Пространственное распределение коротких полимерных цепей, привитых на поверхность липосомы, рассчитывается на основе трехмерной случайной модели, считая, что полимер состоит из абсолютно жестких сегментов, свободно вращающихся в трехмерном пространстве вокруг межсегментальных связей, и прикреплен к поверхности в точке с координатами $X = Y = Z = 0$. На первом шаге случайное направление первого сегмента задается двумя случайными углами – углом между осью сегмента и координатой Z и углом между проекцией оси сегмента на плоскость XY и осью X . На втором шаге рассчитывают координаты удаленного конца первого сегмента, счи-

тая длину сегмента $l = 1$ нм для гибкой цепи и 5 нм для жесткой. Если координаты положения конца сегмента оказываются нереальными (например, при $Z < 0$, где конец сегмента локализован ниже поверхности липосомы), результат отбрасывают, а конечные координаты используют как начальную точку для расчета следующего положения конца сегмента по той же самой схеме.

Выше было отмечено, что водорастворимый полимер статистически может быть представлен распределением вероятных конформаций ("облаком"). Из компьютерного анализа следует, что гибкоцепная макромолекула образует конформационное "облако" с высокой плотностью центральной части, тогда как жесткоцепная макромолекула той же самой длины (длина сегмента которой в 5 раз больше длины сегмента гибкоцепной) образует широкое, но неплотное проницаемое "облако" (рис. 4). Кроме того, это облако менее однородно из-за пониженной подвижности индивидуальных сегментов.

Если существует какой-либо активный центр на поверхности липосомы (например, связывающий центр для некоторых макромолекул или других лигандов), то присутствие ПЭГ в концентрациях, недостаточных для полного покрытия поверхности, должно привести к появлению двух семейств центров. Первое будет состоять из половины активных групп, локализованных в незанятом ПЭГ объеме (B -центры) и проявлять все свойства центров исходной липосомы, а второе, оказавшееся внутри полимерного облака (A -центры), существенно снизит способность участвовать в "нормальных" взаимодействиях. Это явление, проиллюстрированное рис. 5, позволяет предположить, что кинетические параметры активных центров должны зависеть от их расположения на поверхности липосомы, частично покрытой ПЭГ. Такая модель позволяет предвидеть возможность одновременной иммобилизации на поверхности липосомы нескольких веществ с различными свойствами [19].

Для экспериментального подтверждения правомерности описанной модели было изучено тушение люминесценции включенных в липосомы флуоресцентно-меченых веществ: флуоресцеин-меченого фосфолипида N-[7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол-4-ил]диолеилфосфатилэтаноламина (НФЭА) и липидного производного флуоресцеина – N-[глутариламидо-(5-амидоацетамидофлуоресцеин)]-глицеро-3-fosфоэтаноламин-1,2-диолеила (ГФЭА) с растворимым родамин-меченным овальбумином (РОВА) и соответствующими антифлуоресценовыми антителами [20] в зависимости от типа и количества связанного с липосомами полимера. Для изучения взаимодействия модифицированных полимером флуоресцентно-меченых липосом (ФЛ) с РОВА, просто ФЛ и ФЛ,

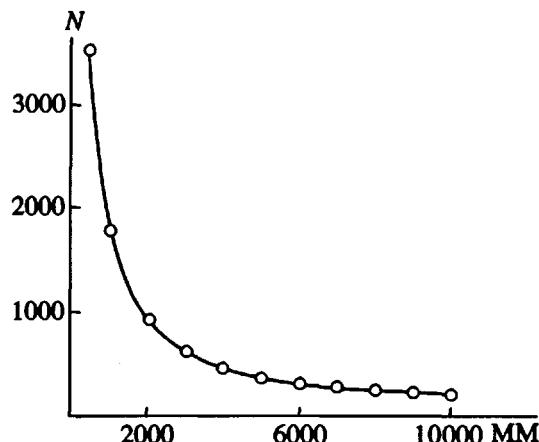


Рис. 3. Зависимость числа молекул ПЭГ N , требующихся для полного покрытия липосомы диаметром 100 нм, от его молекулярной массы.

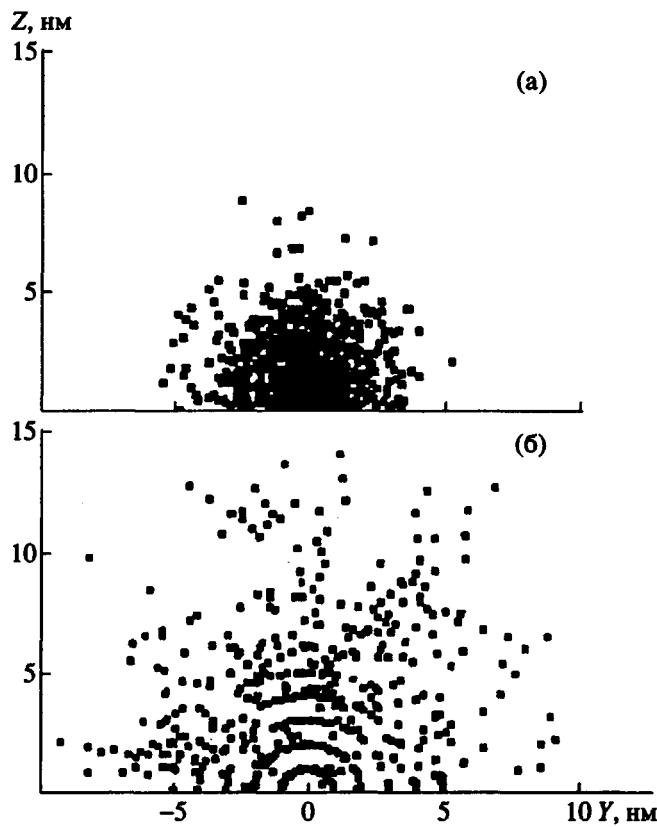


Рис. 4. Проекция рассчитанного пространственного распределения 440 конформаций полимерной молекулы длиной 20 нм для гибкого полимера с длиной сегмента 1 нм (а) и жесткого полимера с длиной сегмента 5 нм (б) ($X = 0 \pm 0.25$ нм). Пояснения в тексте.

содержащие определенные количества липидо-конъюгированного гибкоцепного (ПЭГ) или жесткоцепного (декстран) полимера обрабатывали увеличивающимся количеством РОВА. Липидо-

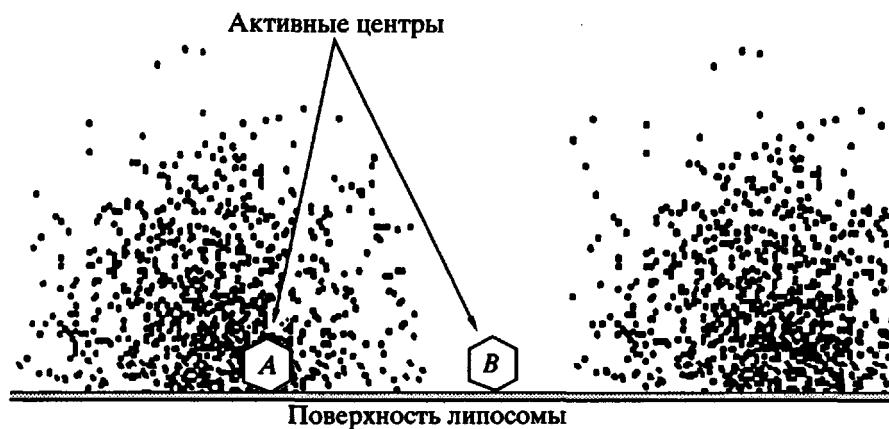
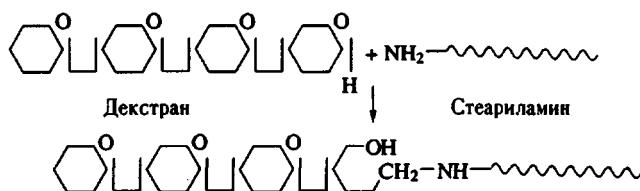


Рис. 5. Схематическое изображение стерически заторможенных *A* и свободных *B* активных центров на поверхности липосомы, модифицированной малыми количествами ПЭГ.

содержащие производные декстрана при этом получали по следующей схеме:



Интенсивность флуоресценции при добавлении РОВА уменьшается как у контрольных ФЛ, так у ФЛ, модифицированных 0.8 мол. % декстрагена (рис. 6). Двукратное падение исходной флуоресценции ФЛ связано с распределением липосомальной метки между внешним и внутренним мономаслояями мембранны, поскольку только метка внешнего слоя способна участвовать в процессах передачи энергии. Для ФЛ, модифицированных 1 мол. % ПЭГ и даже 0.2 мол. % ПЭГ 5000 (теоретическое количество полимера, необходимое для полного протектирования липосомы, определено из рис. 3) тушение флуоресценции снижается незначительно: даже при максимальной концентрации РОВА около 80% исходной флуоресценции сохраняется. Поскольку процессы тушения лимитируются в основном диффузией РОВА из раствора к поверхности липосомы, эти данные доказывают, что диффузионные ограничения вызваны присутствием ПЭГ на поверхности липосомы и согласуются с нашей гипотезой о различной плотности "защитных облаков" гибкоцепного (ПЭГ) и жесткоцепного (декстран) полимеров.

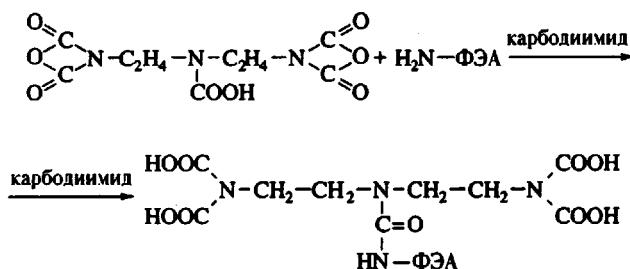
Другое экспериментальное подтверждение нашей гипотезы получено изучением системы, включающей липосомы с введенными на их поверхность производными флуоресцена (ГЛ) и антифлуоресциновые антитела. И в этом случае тушение флуоресценции антителами было одинаковым как для контрольных ГЛ, так и для ГЛ, модифицированных 1 мол. % декстрана (рис. 7). Это показывает, что наличие использованных коли-

чество декстрана не вызывает каких-либо диффузионных ограничений для реакций антиген-антитело. Присутствие же в липосомах 1 мол. % ПЭГ существенно снижает как скорость тушения флуоресценции, так и число флуоресцентных групп, способных взаимодействовать с антителами, что может быть объяснено сильными диффузионными ограничениями для проникновения антител к липосомальной поверхности, покрытой ПЭГ.

Включение в липосомы меньшего количества ПЭГ (0.2 мол. %) приводит к появлению двух флуоресцентных пулов на их поверхности: тушение флуоресценции одного из них происходит с той же скоростью, что и у немодифицированных полимером ГЛ, а другого – со скоростью, близкой к скорости тушения флуоресценции ГЛ, модифицированных большими количествами ПЭГ (рис. 8). Это может отражать различное положение молекул флуоресцеина на поверхности липосом: между “облаками” ПЭГ и внутри их, что и было предсказано данными расчетов (рис. 4). Таким образом, если количество привитого ПЭГ недостаточно для образования сплошного защитного облака, кинетические параметры активных центров действительно зависят от их положения на поверхности липосомы, а поведение покрытых ПЭГ липосом определяется статистическими свойствами макромолекул в растворах.

Предложенная нами и описанная выше модель поведения гибкоцепного полимера на поверхности липосомы позволяет сформулировать некоторые общие требования к полимерам, которые могут быть использованы для защиты липосом: полимер должен быть растворимым и гидрофильным и иметь высокую гибкость основной цепи. Выше было отмечено, что полиакриламид (ПАА), поливинилпирролидон и ПВС могут рассматриваться как наиболее подходящие кандидаты среди возможных протекторов липосом. Для экспериментальной проверки такой возможнос-

ти радикальной полимеризацией акриламида в диоксане в присутствии 2,2-азо-бис-изобутиронитрила был синтезирован ПАА с $M = 10000$ и модифицирован по концевой группе гидрофобными ацильными остатками различной длины для придания ему амфи菲尔ности и мембранотропности. Было синтезировано два полимера: ПАА с концевыми додецильными (ПАА-1) и пальмитильными (ПАА-2) группами. Для доказательства того, что модификация поверхности липосом этим полимером приводит к такому же результату, как и модификация ПЭГ, были проведены исследования по биораспределению модифицированных липосом в мышах. Для этого мышам линии BALB/c внутривенно вводили 150 нмоль липосом, имевших молярное соотношение лецитин : холестерин = 7 : 3 и содержащих 3 мол. % включенного ПАА-1 или ПАА-2 и следовые количества меченного изотопом ^{111}In мембранотропного хелатора (ДТПК), модифицированного фосфатдилэтаноламином или стеариламином по схеме



Из приведенных на рис. 9а данных ясно видно, что амфи菲尔ные производные ПАА могут эффективно защищать липосомы *in vivo*. Так, ПАА-2 заметно увеличивает время циркулирования липосом: полупериод циркулирования для липосом, модифицированных ПАА-2, составляет около 50 мин, а для контрольных липосом – только 10 мин. Протективная же активность ПАА-1 очень низка, что определяется меньшей длиной алифатического ацильного остатка, фиксирующего ПАА на поверхности липосомы. С термодинамической точки зрения относительно короткий додецильный радикал не способен удержать на поверхности липосомы полимерную молекулу с $M = 10000$, и в результате ПАА-1 легко может отщепляться от липосомы и проявлять лишь слабое протективное действие. Более длинный пальмитильный радикал в ПАА-2 может удержать большее количество связанного с липосомой полимера и произвести больший протектирующий эффект. Подобные закономерности были обнаружены и при накоплении липосом в печени (рис. 9б). Контрольные липосомы оказываются в печени довольно быстро (более 50% через 45 мин и около 75% через 300 мин), модифицированные ПАА-2 медленнее (около 25% через 45 мин и около 40% через 300 мин). Накопление модифицированных ПАА-2 липосом в печени происходит

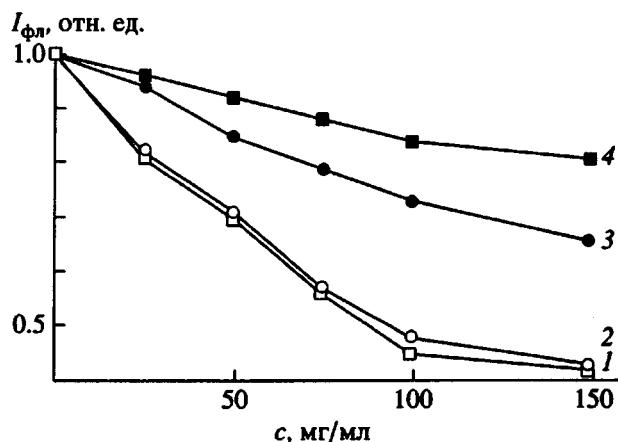


Рис. 6. Зависимость интенсивности флуоресценции I_{ϕ} флуоресцинмеченых контрольных липосом (1), липосом, модифицированных 0.8 мол. % стеариламинсодержащего декстрана (2), 0.2 (3) и 1.0 мол. % (4) ПЭГ от концентрации родаминмеченого белка в растворе.

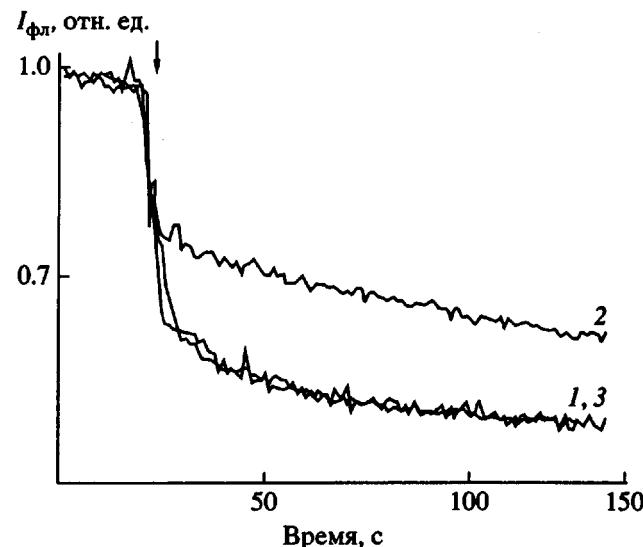


Рис. 7. Тушение флуоресценции контрольных (1) и модифицированных 1 мол. % ПЭГ (2) или декстрана (3) липосом антифлуоресцентными антителами. Момент введения антител показан стрелкой.

быстрее, чем модифицированных ПАА-1, но медленнее, чем немодифицированных.

Таким образом, различные инертные полимеры, свойства растворов которых близки к свойствам растворов ПЭГ (растворимость, гидрофильность, гибкость цепей) при включении в липосомальную мембрану способны одинаковым образом изменять поведение липосом и свойства их поверхностей, что подтверждает правомерность предложенной модели.

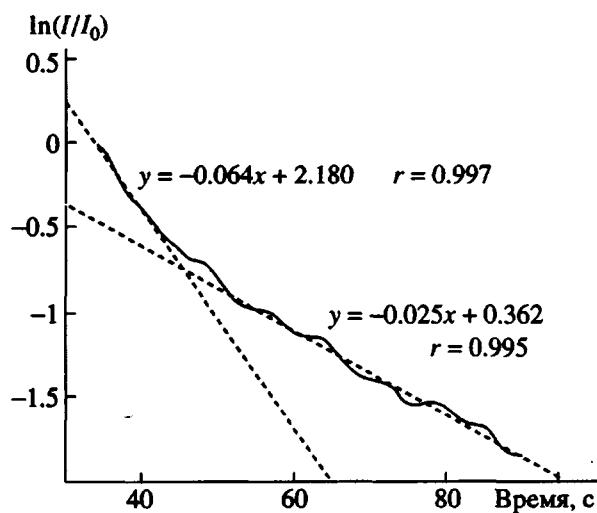


Рис. 8. Зависимость интенсивности флуоресценции липосом, модифицированных 0.2 мол. % ФЭА-ПЭГ антифлуоресцентными антителами от времени (сплошная кривая) и ее линеаризация (штриховые кривые). I_0 и I – исходная и текущая интенсивности флуоресценции соответственно.

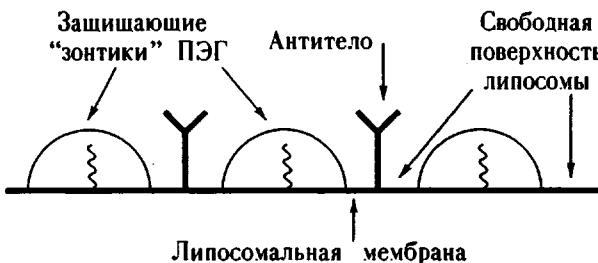
СОИММОБИЛИЗАЦИЯ АНТИТЕЛ И ПОЛИМЕРОВ НА ПОВЕРХНОСТИ ЛИПОСОМ. ДОЛГОЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ИММУНОЛИПОСОМЫ

Объединение уникальных свойств долгоживущих модифицированных ПЭГ липосом и модифицированных антителами носителей в рамках одной системы открыло бы возможность создания визуализаторов и фармакологически активных систем направленного транспорта. С этой точки зрения сочетание повышенного времени цирку-

лирования носителя и его специфичности должно привести к усилению взаимодействия между направленными наночастицами и мишенью во времени и накоплению лекарства в мишени. Рассмотрим такую возможность на примере липосом.

При использовании ПЭГ в качестве протектора иммунолипосом можно предположить, что он будет создавать стерические препятствия для нормального взаимодействия антигена с антителом. Для подтверждения того, что в определенных условиях возможно "мирное сосуществование" антител и ПЭГ, необходимо рассмотреть различные случаи соиммобилизации антитела и водорастворимого гибкоцепочечного полимера на одной и той же липосоме. Ниже приведена общая схема такого процесса, который в равной мере может быть применен к любым микроносителям.

Если полимер не покроет липосому полностью, то молекулы антител будут находиться вне объема, занятого им, и на поверхности появятся две отдельные зоны – "зонтики" из ПЭГ и антитела между ними



Данная структура не помешает осуществлению взаимодействия антиген-антитело, и связывающая способность липосомы сохранится. В то же время скорость исчезновения липосом (точнее скорость их связывания) будет зависеть от площади поверхности, доступной для мембрально-рецепторных взаимодействий и не будет сильно от-

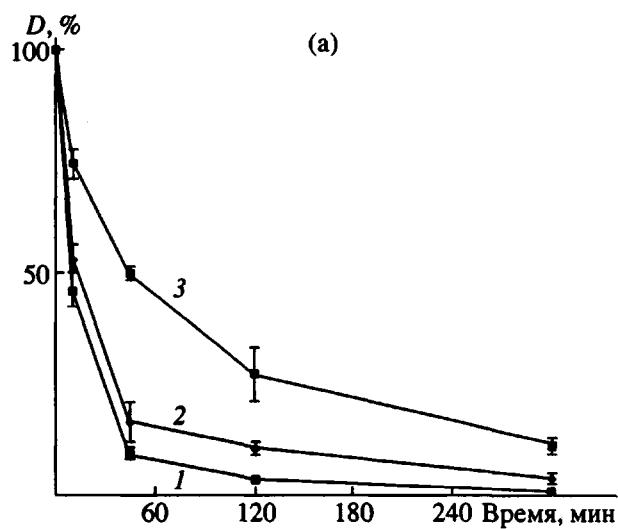
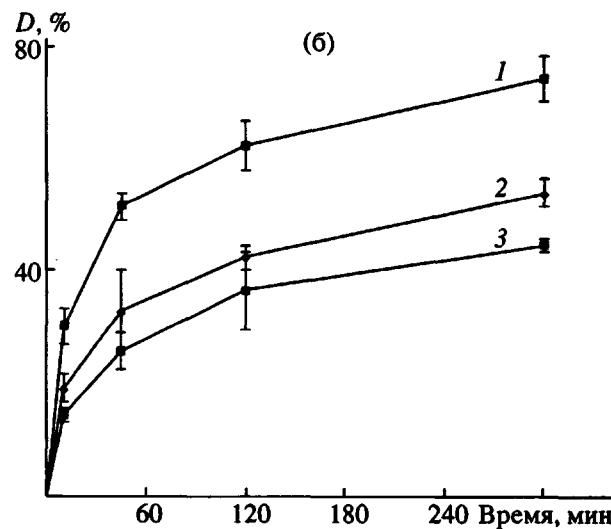


Рис. 9. Уменьшение доли D контрольных (1) и модифицированных ПАА-1 (2) или ПАА-2 (3) липосом в крови (а) и накопление их в печени (б) экспериментальных мышей.



личаться от скорости исчезновения контрольных (немодифицированных) липосом.

Во втором (оптимальном) случае поверхность липосомы полностью покрыта перекрывающимися "зонтиками" ПЭГ, но какая-то область более рыхлой конформационной плотности, в которую могут устремляться антитела из областей с высокой конформационной плотностью за счет латеральной диффузии, все еще существует:



Такая система плохо взаимодействует с рецепторами, но антитела все еще способны узнавать и связывать соответствующую мишень.

В третьем случае при высокой степени модификации поверхности молекулы ПЭГ образуют конформационно жесткие "щетки" [21]



Видно, что иммобилизованные на поверхности антитела не могут преодолеть стерические препятствия и взаимодействовать с соответствующей мишенью. С другой стороны, рецепторы также не могут взаимодействовать с поверхностью такой липосомы, в результате чего время ее циркулирования становится существенно выше: например, время полурасщепления иммунолипосом, модифицированных 10 мол. % ПЭГ, составляет около 10 ч в организме кролика [19]. По-видимому, "щетки" указанного типа, придающие повышенное время циркулирования обычным липосомам, могут придать его и иммунолипосомам, если иммобилизацию антител на них осуществить с использованием достаточно длинного спейсера или макромолекул ПЭГ [22].

Для подтверждения возможности создания долгоциркулирующих липосом, обладающих направленным действием, нами получены модифицированные ПЭГ липосомы, содержащие иммобилизованные антимиозиновые антитела и изучены их свойства *in vivo* [19]. Эти антитела эффективно связывают миозин в ишемических и (или) некротических кардиомицетах с поврежденными или разрушенными клеточными мембранами, но не взаимодействуют с нормальными клетками, поскольку не способны проникать сквозь интактные плазматические мембранны [23, 24]. Такие системы являются основой долгоциркулирующих радиоактивномеченых липосом, модифицированных ПЭГ, способных направленно попадать в область подверженного ишемии миокарда. Препараты липосом, меченные различными радиоизотопами, вводили внутривенно кроликам с искусственно вызванным по ранее описан-

ной методике [25] инфарктом миокарда через 30 - 60 мин после начала перфузии, а через определенные промежутки времени отбирали пробы крови и измеряли их липосомальную активность. Через 5 - 6 ч после введения липосом животных усыпляли летальными дозами фенобарбитала,эктомировали сердце, разрезали его на полоски толщиной 5 мм, прокрашивали 2%-ным раствором трифенилтетразолийхлорида для определения некротических участков и каждую полоску в свою очередь разрезали на более мелкие кусочки. Образцы нормального и пораженного миокарда взвешивали и определяли их радиоактивность с помощью гамма-счетчика. Биораспределение липосом в организме забитых через 5 ч после введения препарата животных изучали по накоплению радиоактивности в различных органах. Липосомы диаметром 150 нм, очищенные методом диализа, были получены из смеси фосфатидилхолина и холестерина, взятых в молярном соотношении 3 : 2 и дополнительно содержали 1 мол. % меченого ^{111}In ДТПК-производного стеариламина и при необходимости 4 - 10 мол. % ФЭА-ПЭГ [19]. Предварительно модифицированные гидрофобным "якорем" (*N*-глутарилфосфатидилэтаноламином) антимиозиновые антитела вводили в липосомальную мембрану согласно ранее описанной нами методике [26].

Полупериод циркуляции контрольных иммунолипосом в организме кроликов составил 40 мин, в то время как для модифицированных 4 и 10 мол. % ПЭГ липосом данная величина возросла до 200 и 1000 мин соответственно. Этот же параметр для модифицированных 10 мол. % ПЭГ липосом с антителами и без них практически не изменялся. Из приведенных данных следует, что рост количества ПЭГ увеличивает стабильность липосом и что при соиммобилизации антител и ПЭГ полупериод циркуляции липосом с меньшим содержанием полимера ниже. При этом повышенное содержание ПЭГ в липосомах блокирует узнавание антител клетками печени, что еще раз подтверждает нашу гипотезу. Данные по биораспределению липосом и результаты изучения экспериментального инфаркта миокарда показывают, что модифицированные ПЭГ антимиозиновые липосомы эффективно накапливаются в зоне инфаркта: количество этих липосом составляет 0.25%/г, что почти в 2 раза выше, чем для модифицированных только ПЭГ липосом (0.13%/г) или немодифицированных иммунолипосом (0.14%/г) и почти в 12 раз выше, чем для немодифицированных ни ПЭГ, ни антителами контрольных липосом (0.018%/г).

Интересно отметить, что липосомы, модифицированные только ПЭГ или только антителами, примерно одинаково аккумулируются в зоне инфаркта, однако их соотношение в инфарктной и нормальной зонах составляет 25 : 5, что обуславливается низким неспецифическим связыванием

иммунолипосом нормальным миокардом. Эти данные подтверждают тот факт (по крайней мере в нашем случае), что целевое накопление липосом может происходить как путем специфического взаимодействия, так и неспецифически за счет пониженной скорости фильтрации: липосома либо может попасть в некротизированную область через проницаемые для нее капилляры, либо не достичь ее из-за пониженной проницаемости последних. Во втором случае времена накопления должны быть существенно выше, что может быть реализовано только долгоживущими липосомами. Накопление в зоне инфаркта модифицированных 10 мол. % ПЭГ липосом одинаково как для модифицированных только ПЭГ или смесью ПЭГ-антитела липосом, так и для модифицированных только антителами носителей, что можно легко объяснить невозможностью участия антител в связывании из-за стерических препятствий в случае бинарных систем.

Таким образом, приведенные данные подтверждают, что липосомам, как и другим наночастицам, можно придать направленность действия и одновременно увеличить время их циркулирования при определенном соотношении полимер: моноклональное антитело, используемом для модификации поверхности этих носителей.

ПОЛИМЕРЫ НА ПОВЕРХНОСТИ НАНОЧАСТИЦ И ЛАТЕКСОВ

Как уже отмечалось выше, природные и синтетические полимеры могут быть использованы для протектирования твердых частиц от взаимодействий с растворенными веществами. Это явление тесно связано с проблемой стабильности различных водных дисперсий и имеет огромное практическое значение, особенно в области фармации, где полимеры могут защитить частицы твердых носителей лекарств от нежелательного взаимодействия с компонентами плазмы крови [27].

Дифильные полимеры, молекулы которых состоят по меньшей мере из двух различных фрагментов с ярко выраженными гидрофильными и гидрофобными свойствами, давно привлекают повышенное внимание. С одной стороны, такие полимеры легко адсорбируются на поверхности твердых частиц благодаря гидрофобным взаимодействиям, с другой – их гидрофильные части, ориентирующиеся в раствор, оказывают протектирующее действие на частицу, снижая, например, взаимодействие ее с плазменными белками при внутривенном введении в кровь [28]. Другим способом защиты поверхности наночастиц или частиц латексов является ковалентное связывание полимера с поверхностью частицы и образование так называемого якорного полимера. Для описания подобных явлений был введен термин стерическая стабилизация [29]. Существует не-

сколько типов дифильных полимеров, которые могут быть использованы для покрытия наночастиц, предназначенных для инъекций. Наиболее известными из них являются линейные или разветвленные сополимеры окиси этилена и окиси пропилена (Плюроники). Покрытию поверхностей различных частиц этими полимерами, включая их использование для защиты латексных частиц от сорбции ретикуло-эндотелиальной системы при внутривенном вливании, посвящено большое число работ [30]. Нами описано использование другого типа амфи菲尔ных полимеров, которые были специально синтезированы для введения в липосомальные мембранны, но могут быть использованы и для стерического протектирования других наночастиц – гидрофильных линейных полимеров, содержащих в качестве концевой группы липидные или жирнокислотные остатки. Одним из таких полимеров является ФЭА-ПЭГ [7]. Третий важный тип дифильных полимеров – амфи菲尔ные сополимеры, образующие в водной среде гидрофобные блоки, способные выделяться в отдельную твердую фазу (частицу), имеющую на поверхности защитный слой из гидрофильной части. Примером таких сополимеров является блок-сополимер полиэтиленгликоля и сополимера полилактида с полигликолидом (ПЭГ-ПЛГ) [31].

Для изучения поведения защитного полимера на поверхности наночастиц мы использовали частицы полистирольного латекса "Polybeads™" диаметром 100 нм, поверхность которых была покрыта двумя амфи菲尔ными полимерами ПАА-2 и ПЭГ-ПЛГ. Инкубирование латексных частиц в водных растворах полимеров приводит к сорбции полимера на поверхности, что подтверждается изменением размеров частиц до и после контактирования с растворами этих полимеров: диаметр частиц возрастает на 20 и 5 нм соответственно. Результаты изучения биораспределения данных частиц в организме мышей приведены на рис. 10. Как и следовало ожидать, модифицированные ФЭА-ПЭГ частицы циркулировали в течение длительного времени: полупериод их циркулирования составил 4 ч. Однако в отличие от модифицированных ПАА-2 липосом покрытые этим полимером наночастицы удалялись из крови так же быстро, как и немодифицированные латексные частицы и имели одинаковую степень накопления в печени. В то же время, накопление модифицированных ПАА-2 частиц в селезенке было значительно ниже, чем необработанных. Такое двоякое действие одного и того же амфи菲尔ного защитного полимера на поведение частиц в экспериментах *in vivo* описано в работе [32], в которой показано, что плюроник "Полоксамер 407" может защищать латексные наносферы от сорбции ретикуло-эндотелиальной системы, но не способен оказывать протектирующее действие на липосомы с тем же размером частиц. Такое различие объясняется разной ориентацией

цепей ПАА на поверхности наночастиц и липосом, которая проявляется в неодинаковой степени защиты носителя от сорбции плазменных белков.

Подобное защитное действие гидрофильных полимеров было обнаружено и у систем с химически присоединенными к поверхности полимерных наносфер защитными цепями ПЭГ или блок-сополимера ПЭГ-ПЛГ. Методом испарения растворителя было показано, что ПЛГ образует медленно деградирующие сферические частицы субмикронных размеров [33]. Используя этот метод для сополимеров ПЭГ-ПЛГ, удалось приготовить частицы с нерастворимым (твёрдым) ядром из ПЛГ и ковалентно связанный с ним водорастворимой оболочкой. Был синтезирован ряд сополимеров, содержащих блоки ПЭГ и блоки ПЛГ в массовом соотношении 1 : 9, 1 : 5 и 1 : 4, в которых ММ блока ПЭГ составлял 20000. Методом испарения растворителя наносферы на основе указанных сополимеров были помечены введением гидрофобного ^{111}In -содержащего хелатора (ДТПК-содержащего стеариламина) в нерастворимые ядра ПЛГ. Удаление из крови и биораспределение в экспериментах на мышах линии BALB/c показали, что защитное действие ПЭГ в таких системах зависит от содержания его блоков (рис. 11). Удаление наночастиц из крови и накопление их в печени связаны с условиями получения и строением частиц: чем выше содержание блоков ПЭГ, тем медленнее происходит их удаление из крови и накопление в печени. Как было показано для липосом, частицы диаметром больше 250 нм могут неспецифически попадать в селезенку [34]. Наночастицы блок-сополимеров состава ПЭГ : ПЛГ = 1 : 5 и 1 : 4 имеют диаметр 265 и 315 нм соответственно, чем и объясняется их высокое количество в селезенке за счет пассивного связывания.

Таким образом, полимеры на поверхности наночастиц могут влиять на биораспределение и время циркулирования и открывают широкие возможности для контроля за поведением различных носителей лекарств *in vivo*.

МОДИФИРОВАННЫЕ ПОЛИМЕРАМИ ЛИПОСОМЫ ДЛЯ МАГНИТО-РЕЗОНАНСНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ

Хорошим примером практического использования поверхностно-модифицированных синтетическими полимерами частиц является разработка основанных на липосомах контрастирующих агентов для магнито-резонансной визуализации (МРВ) лимфатических узлов. Визуализация лимфоузлов играет главную роль в ранней диагностике новообразований у больных со злокачественными опухолями [35], поскольку лимфатическая система является основным

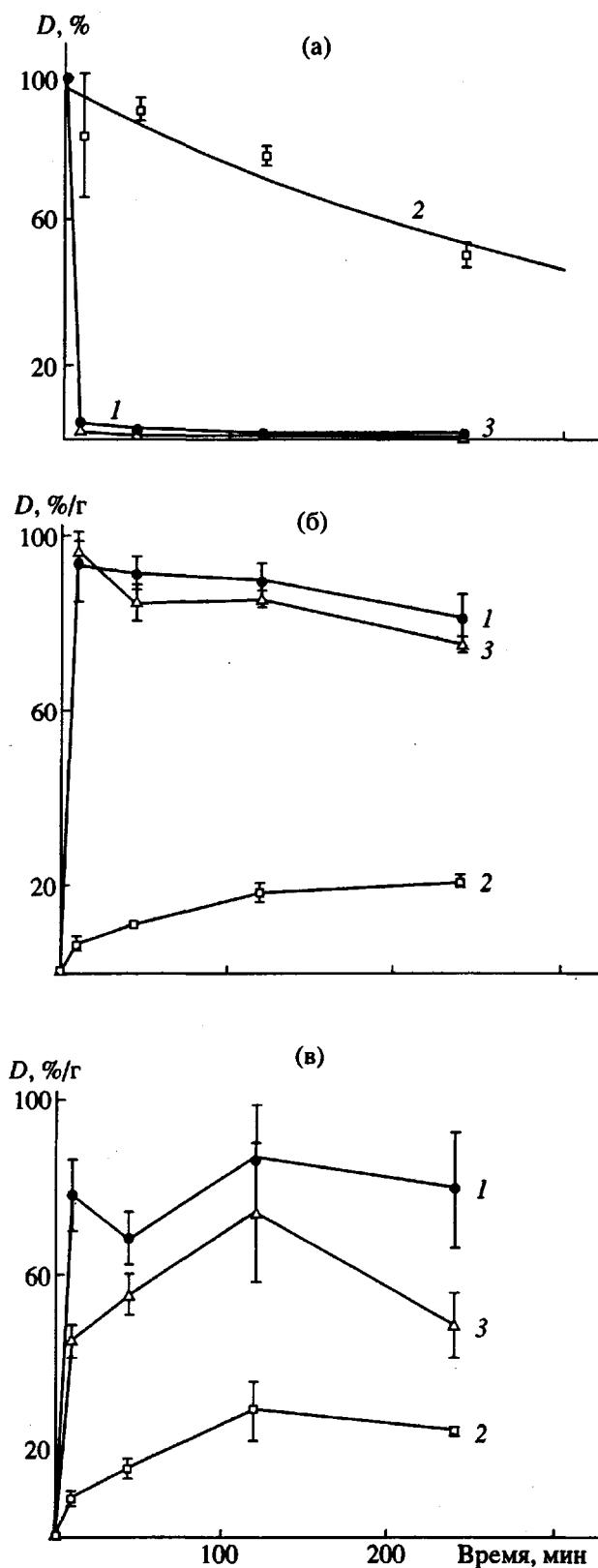


Рис. 10. Уменьшение в крови (а) и накопление в печени (б) и селезенке (в) мышей меченных изотопом ^{111}In свободных (1) и модифицированных ПЭГ (2) или ПАА-2 (3) полистирольных латексных наносфер диаметром 100 нм.

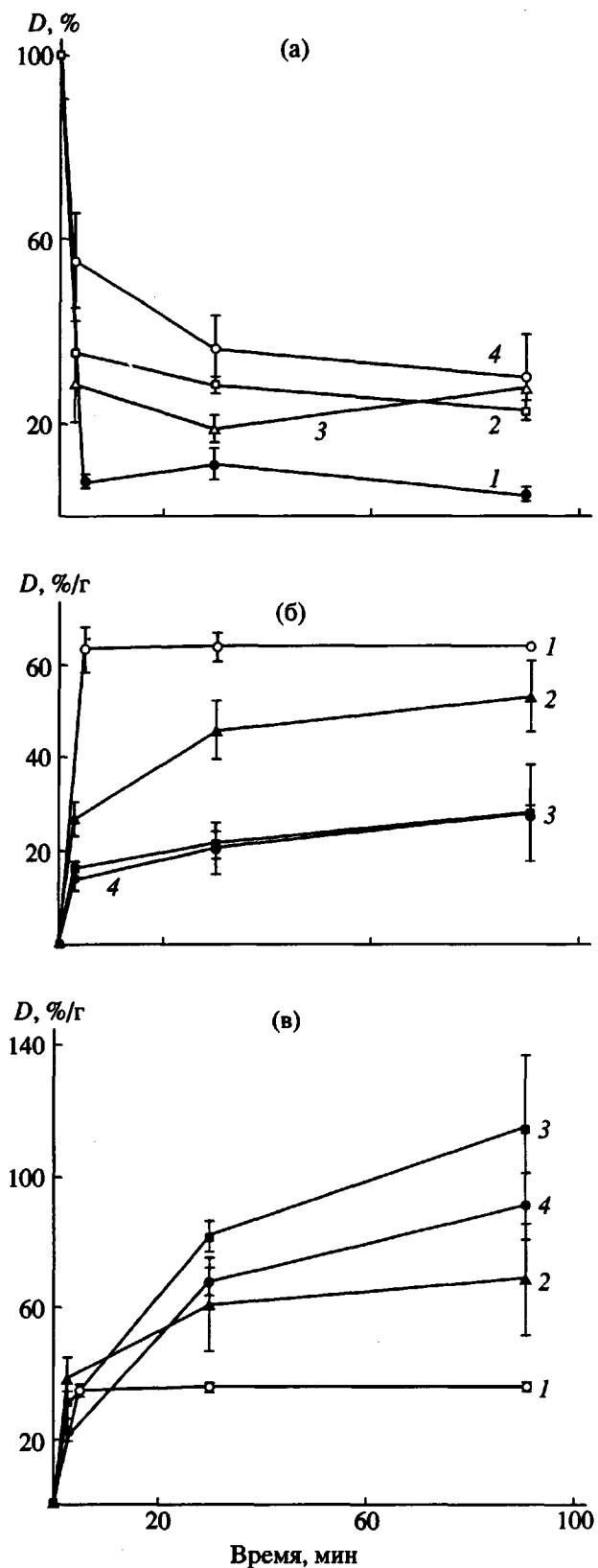


Рис. 11. Уменьшение в крови (а) и накопление в печени (б) и селезенке (в) мышей меченных изотопом ^{111}In наносфер на основе ПЛГ (1) и блок-сополимеров ПЭГ–ПЛГ состава 1 : 9 (2), 1 : 5 (3) и 1 : 4 (4).

путем распространения метастазов в организме. Положение лимфатических узлов с опухолевыми массами можно установить введением контрастных сред, выявляющих эти патологии простой визуализацией.

Известно, что наночастицы различной природы накапливаются в лимфатических узлах после внутривенного введения. Такие частицы как липосомы полностью сохраняют свойства наноносителей и накапливаются в лимфоузлах после внутривенного, внутримышечного или подкожного введения. Gd-содержащие липосомы уже используются как контрастирующие агенты для МРВ печени и селезенки после внутривенного введения [36]. С этой целью в липосомы вводят соответствующие визуализирующие агенты, например комплексы Gd с сильным хелатирующими агентом, таким как ДТПК [37]. Покрытие может быть осуществлено введением соответствующего агента (обычно иона тяжелого металла) в водные полости липосом или присоединением его к поверхности липосомы за счет комплексообразования с хелатирующей группой. Для более прочного введения в липосомальную мембрану келатор может быть предварительно модифицирован жирными кислотами или остатками фосфолипидов. Нами предпринята попытка увеличить эффективность действия Gd-содержащих липосом модификацией их поверхности полимерами для получения контрастирующего агента с повышенной интенсивностью сигнала для МРВ лимфоузлов.

В опытах по визуализации увеличенных лимфатических узлов с помощью Gd-содержащих липосом был использован метод ЯМР-спектроскопии. Покрытие ЯМР-активных Gd-содержащих липосом ПЭГ может изменить водное окружение иона металла вследствие существования прочно ассоциированных с полимером молекул воды и увеличить интенсивность сигнала. Для проверки этого предположения было изучено МРВ лимфоузлов кроликов с помощью немодифицированных и модифицированных ПЭГ с $M = 5000$ Gd-содержащих липосом. Липосомы диаметром 200 нм были получены из яичного фосфатидилхолина, холестерина, Gd-ДТПК-ФЭА (липофильный параметрмагнитный зонд) и ФЭА-ПЭГ, взятых в молярном соотношении 60 : 25 : 10 : 5. Времена релаксации измеряли с помощью протонного спинового анализатора Praxis II с рабочей частотой 10.7 МГц. Отображение аксилярных и надкапиллярных лимфатических узлов кролика *in vivo* осуществляли поперечным сканированием радиометром "1.5 Tesla GE" ("Sigma") (сильная пульсация T_1 , жироподавляющие условия) в течение 2 ч после внутривенного введения липосомального препарата в лапы анестезированных кроликов (по 3 в каждой группе). Обработку результатов проводили в соответствии с работой [38], определяя отношение интенсивности сигналов лимфоузлов и мышц.

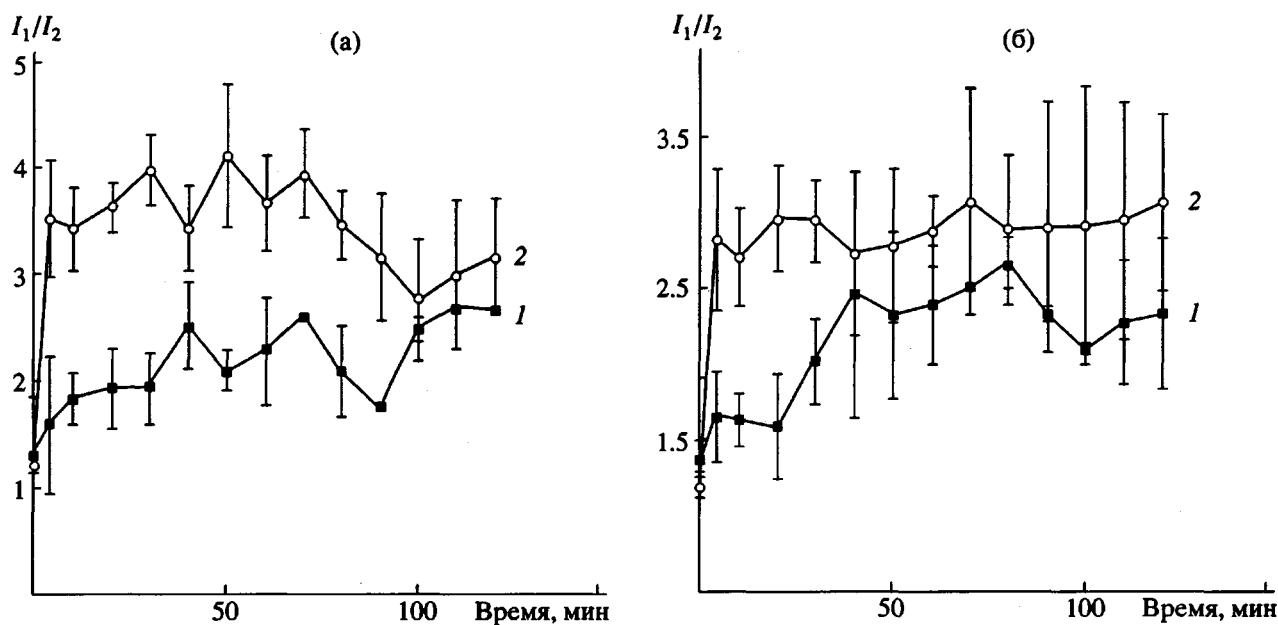


Рис. 12. Изменение отношения интенсивностей сигналов правого I_1 и левого I_2 аксиальных (а) и надкапиллярных (б) лимфоузлов, визуализированных с помощью немодифицированных (1) и модифицированных ПЭГ Gd-содержащих липосом (2).

ПЭГ-Gd-липосомы (20 мг общего липида в 0.5 мл физиологического раствора) позволяют увидеть аксилярные и надкапиллярные лимфоузлы уже через несколько минут, как это видно из представленных на рис. 12 данных. При этом относительная интенсивность сигнала лимфоузлов существенно выше для модифицированных ПЭГ Gd-содержащих липосом: сигнал от немодифицированных липосом лишь слегка заметен в обоих лимфоузлах, отношение интенсивностей сигналов узел : мышца составляет около 1.5 даже после 80-минутной экспозиции. ПЭГ-Gd-липосомы быстро и значительно усиливают сигналы лимфоузлов: отношение интенсивностей сигналов узел : мышца составляет ~3.0 в течение 5 - 10 мин. Для иллюстрации хорошей способности ПЭГ-Gd-липосом визуализовать лимфоузлы на рис. 13 приведены фотографии поперечных срезов аксилярных и надкапиллярных лимфатических узлов кролика через 30 мин после введения липосом. Удивляет тот факт, что измерение количества транспортируемых частиц с помощью поверхностью-меченых изотопом ^{111}In ПЭГ-липосом (5 мол. % ПЭГ) показало снижение их накопления в исследуемых лимфоузлах в аналогичных условиях (рис. 14). Этот факт означает, что в действительности меньшее количество контрастирующего материала вызывает существенное усиление сигнала и может быть связано с недоступностью модифицированных ПЭГ липосом для макрофагов.

Механизм лучшей визуализации лимфоузлов ПЭГ-Gd-липосомами может стать более понятным из данных по измерению времен релаксации

ионов металла в препаратах липосом (T_1) и собственно релаксации R_1 . Из рис. 15 видно, этот параметр для ПЭГ-Gd-липосом в ~2 раза больше, чем для Gd-липосом. Релаксация парамагнитных ионов существенно зависит от скорости обмена координированных Gd-молекул воды с молекула-

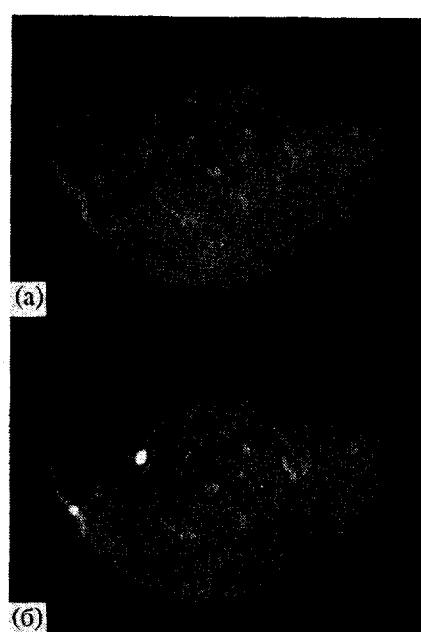


Рис. 13. Поперечные срезы аксилярных и надкапиллярных лимфатических узлов кролика до (а) и через 30 мин после (б) введения ПЭГ-Gd-липосом.

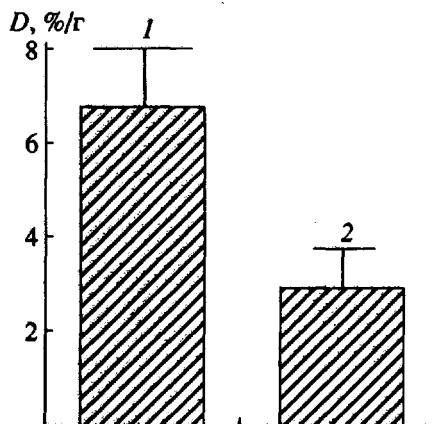


Рис. 14. Количество D связанных за 30 мин лимфоузлами немодифицированных (1) и модифицированных ПЭГ Gd-содержащих липосом (2).

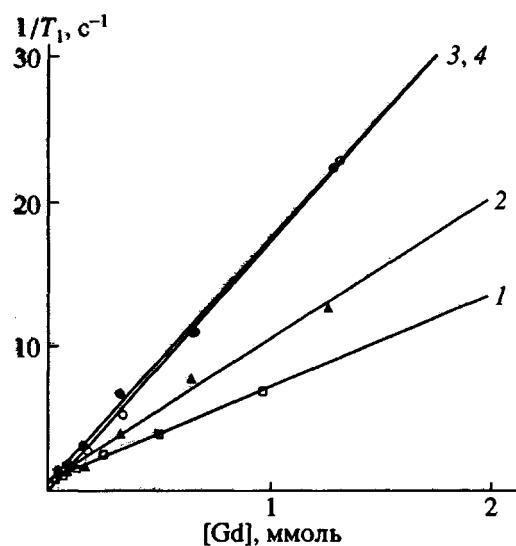


Рис. 15. Зависимость времени релаксации T_1 немодифицированных (1) и модифицированных 2 (2), 5 (3) и 10 мол. % ПЭГ Gd-содержащих липосом (4) от концентрации Gd.

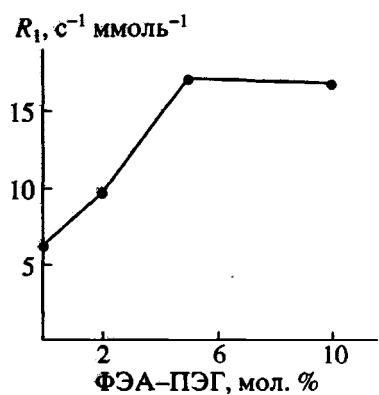


Рис. 16. Зависимость релаксации R_1 от содержания ФЭА-ПЭГ в модифицированных Gd-содержащих липосомах.

ми обычной воды. Поскольку известно, что ПЭГ связывает большое количество молекул воды за счет образования водородных связей с атомами кислорода основной цепи, можно полагать, что число молекул воды, способных взаимодействовать с парамагнитным центром, возрастает в ближайшем окружении иона Gd. Связанные лимфатическими узлами Gd-липосомы отделены от лизосом фагоцитов, и, как было показано ранее [39], это явление теоретически может привести к уменьшению времени релаксации внутри узла вследствие того, что не вся существующая в нем вода способна взаимодействовать с парамагнитными ионами. Этот эффект должен быть менее значительным для ПЭГ-Gd-липосом, поскольку эти везикулы добавляют свою внутреннюю воду лимфоузлам, снижая таким образом убыль релаксации, что и наблюдается в действительности (рис. 16).

Отметим также, что визуализация лимфатических узлов с помощью ПЭГ-Gd-липосом осуществляется достаточно быстро, в течение нескольких минут после их введения. Это не совпадает с данными для других визуализирующих систем, которые требуют более длительного времени (24 - 48 ч) для получения хорошего изображения лимфоузлов, что доказывает отрицательное действие модификации липосом (как, по-видимому, и других наночастиц) полимерами с целью использования их в качестве диагностических агентов направленного действия, в том числе для МВР. Кроме того, лимфатические узлы являются естественными мишениями для липосом, вводимых подкожно, точно так же, как ретикуло-эндотелиальная система для вводимых внутривенно.

Таким образом, предложенный подход, основанный на использовании модифицированных ПЭГ липосом направленного действия, получаемых соиммобилизацией полимера и моноклональных антител, может оказаться полезным и для других областей применения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Torchilin V.P. // *Immobilized Enzymes in Medicine*. Berlin: Springer-Verlag, 1991.
2. Liposomes as Drug Carriers / Ed. by Gregoriadis G. Avon: Wiley, 1988.
3. Pharmaceutical Particulate Carriers / Ed. by Rolland A. New York: Marcell Decker Inc., 1993.
4. Gregoriadis G. // *Nature (London)*. 1977. V. 265. P. 407.
5. Allen T.M. // *Liposomes in the Therapy of Infectious Diseases and Cancer* / Ed. by Lopez-Berestein G., Fidler I.J. New York: Alan R. Liss, 1989. P. 405.
6. Allen T.M., Cohn A. // *FEBS Lett.* 1987. V. 223. P. 42.
7. Klibanov A.L., Maruyama K., Torchilin V.P., Huang L. // *FEBS Lett.* 1990. V. 268. P. 235.
8. Klibanov A.L., Maruyama K., Beckerleg A.M., Torchilin V.P., Huang L. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1991. V. 1062. P. 142.
9. Katre N.V. // *Adv. Drug Delivery Rev.* 1993. V. 10. P. 91.

10. Needham D., McIntosh T.J., Lasic D.D. // Biochim. Biophys. Acta. 1992. V. 1108. P. 40.
11. Gabizon A., Papahadjopoulos D. // Biochim. Biophys. Acta. 1992. V. 1070. P. 187.
12. Lasic D.D., Martin F.G., Gabizon A., Huang S.K., Papahadjopoulos D. // Biochim. Biophys. Acta. 1991. V. 1070. P. 187.
13. Torchilin V.P., Papisov M.I. // J. Liposome Res. 1994. V. 4. P. 725.
14. De Cloizeaux J., Jannink G. // Polymers in Solution. Their Modelling and Structure. Oxford: Clarendon Press, 1990.
15. Brandrup I., Immergut E.H. // Polymer Handbook. New York: Wiley, 1989. P. VII/I.
16. Huang C., Nason J.T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. P. 308.
17. Enoch H.G., Strittmater P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 145.
18. Allen T.M., Hansen C. // Biochim. Biophys. Acta. 1991. V. 1068. P. 133.
19. Torchilin V.P., Klibanov A.L., Huang L., O'Donnell S., Nossiff N.D., Khaw B.A. // FASEB J. 1992. V. 6. P. 2716.
20. Herron J.N. // Fluorescein Hapten: An Immunological Probe / Ed. by Voss E.W., Jr. Boca Raton: CRC Press, 1984. P. 49.
21. Milner S.T. // Science. 1991. V. 251. P. 905.
22. Blume G., Cevc G., Crommelin M.D.J.A., Bakker-Woudenberg I.A.J.M., Kluft C., Storm G. // Biochim. Biophys. Acta. 1993. V. 1149. P. 180.
23. Khaw B.A., Mattis J.A., Melnicoff G., Strauss H.W., Gold H.K., Haber E.J. // Hybridoma. 1984. V. 3. P. 1671.
24. Khaw B.A., Yasuda T., Gold H.K., Strauss H.W., Haber E. // J. Nucl. Med. 1987. V. 28. P. 1671.
25. Khaw B.A., Klianov A.L., O'Donnell S.M., Saito T., Nosiff N., Slinlin M.A., Newell J.B., Strauss H.W., Torchilin V.P. // J. Nucl. Med. 1991. V. 32. P. 1742.
26. Weissig V., Lasch J., Klibanov A.L., Torchilin V.P. // FEBS Lett. 1986. V. 202. P. 86.
27. Molyneux P. // Water-Soluble Synthetic Polymers: Properties and Behavior. Boca Raton: CRC Press, 1977. V. 2.
28. Blunk T., Hochstrasser D.E., Müller B.M., Müller R.H. // Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater. Washington: Controlled Release Society, Inc., 1993. P. 256.
29. Napper D.H. // J. Colloid. Interface Sci. 1977. V. 33. P. 390.
30. Illum L., Davis S.S., Muller R.H., Mak E., West P. // Life Sci. 1987. V. 40. P. 367.
31. Gref R., Minamitake Y., Peracchia M.T., Trubetskoy V.S., Torchilin V.P., Langer R. // Science. 1994. V. 263. P. 1600.
32. Moghimi S.M., Porter C.J.H., Illum L., Dais S.S. // Int. J. Pharm. 1991. V. 68. P. 121.
33. Krause H.J., Schwarz A., Rohdewald P. // Int. J. Pharm. 1985. V. 27. P. 145.
34. Klibanov A.L., Maruyama K., Beckerleg A.M., Torchilin V.P., Huang L. // Biochim. Biophys. Acta. 1991. V. 1062. P. 142.
35. Croll M.N., Brady L.W., Dadparar S. // Sem. Nucl. Med. 1983. V. 13. P. 4.
36. Kabalka G.W., Buonocore E., Hubner K., Moss T., Norley N., Huang L. // Radiology. 1987. V. 163. P. 255.
37. Grant C.W.M., Karlik S., Florio E. // Magn. Res. Med. 1989. V. 11. P. 236.
38. Торчилин В.П. // Высокомолек. соед. А. 1994. Т. 36. № 2. С. 279.
39. Lauffer R.B. // Magn. Res. Quart. 1990. V. 6. P. 65.

Polymers on the Surface of Nanocarriers: Modulation of Carrier Properties and Biodistribution

V. P. Torchilin and V. S. Trubetskoy

Center for Imaging and Pharmaceutical Research, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School,
Charlestown, MA 02129, USA

Abstract – Physico-chemical and biological properties (including biodistribution) of nanoparticulate drug carriers (polymeric nanoparticles, liposomes, latex particles, micelles, etc.) can be modified in a desirable fashion by grafting various polymers to the carrier surface. The most vivid example of such modification is the preparation of longcirculating liposomes by coating them with polyethylene glycol (PEG). The mechanism of PEG protective action is described in terms of polymer properties in solution. It includes the formation of impermeable “conformational cloud” of PEG over the liposome surface, which prevents liposome interaction with other substances from the surrounding medium. Fluorescence quenching experiments as well as computer simulation confirm the importance of polymer chain flexibility for steric protection effect. Flexible synthetic polymers other than PEG (such as polyacrylamide or polyvinylpyrrolidone) can also serve as steric protectors for nanocarriers. The optimization of carrier (liposome) modification in respect of polymer-to-carrier ratio permits to find conditions where some other functional moieties might be grafted onto carrier surface together with protecting polymer. Using this approach sterically protected long-circulating immunotargeted carriers (liposomes) have been prepared, which demonstrated good combination of longevity and targetability *in vivo*. Surface coating with PEG was also proved to be effective in steric stabilization of polymeric biodegradable nanocarriers for drugs and diagnostic agents, as well as for nondegradable latex particles. Surface grafting of nanocarriers with certain polymers can influence their spectral properties. Thus, the contrast properties of Gd-containing liposomes used for experimental MR imaging (for example, lymph nodes imaging) might be improved by simultaneous incorporation of Gd-containing chelate and PEG into the liposomal membrane. Generally speaking, surface modification with different polymers is a powerful tool for designing nanocarriers with desired properties.