

## СРАВНИТЕЛНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕТО НА ЛЕКАРСТВЕНИ ВЕЩЕСТВА С ЛИПОЗОМИ И С BSA-НАНОЧАСТИЦИ

Биляна Тачева, Бояна Първанова, Радостина Георгиева, Антоанета Желева,  
Мирослав Карабалиев

*Катедра “Медицинска физика, биофизика, рентгенология и радиология”, Медицински факултет, Тракийски университет, Стара Загора 6000, България*

### Резюме

Определени са коефициентите на разпределение между липозоми и водна среда на хлорпромазин, тиоридазин и спин-белязаната нитрозоурея SLCNUgly. Използван е методът на втората производна на абсорбционния спектър. Резултатите са сравнени с резултати за вграждането на същите вещества в протеинови наночастици от говежди серумен албумин (BSA). Въз основа на сравнението е направено предположението, че вграждането на веществата в BSA-наночастиците се дължи предимно на хидрофобни взаимодействия.

*Ключови думи:* коефициент на разпределение, лекарствени вещества, липозоми, протеинови наночастици

### Въведение

Мембраните на еукариотните клетки са изградени от три основни компонента: липиди, протеини и въглехидрати. Известно, че мембранните съставки не са хомогенно подредени в двуслойната мембрана на биологични клетки, а по-скоро са организирани в сложни латерални микрообласти. Този полиморфен характер на липидната подредба, в допълнение към значително различните липиди с отчетливо различни физични свойства (т.е. площ на напречното сечение, течливост, електрически заряд, молекулно тегло), е причината липидните мембрани да са изключително сложни структури.

Сложността на структурата на клетъчната мембрана, заедно с високо динамичния характер на липид-липидните и липид-протеиновите взаимодействия в клетъчната мембрана, са причина взаимодействията на мембраните с лекарства да бъдат трудни изследване. Поради тази причина се разработват и използват, опростени системи - изкуствени мембрани, наричани още моделни мембранни системи, които имитират естествената бислойна липидна мембрана.

Използването на моделни мембранни системи в биофизичните изследвания може да помогне за разбирането на критичната роля на мембранните липиди в клетъчното усвояване, за прогнозирането на токсичността на лекарствата, както и за оптимизиране на системите за доставка на лекарствените вещества. Липозомните мембранни моделни системи се използват широко за оценка на ефикасността на лекарствата. Обикновено ефективността на лекарственото вещество се измерва чрез определяне на неговия коефициент на разпределение, който е мярка за количеството на лекарството, което ще влезе във или ще премине през липидната мембрана на биологичната система.

В последните години се работи много по отношение на оптимизирането на системите за доставяне на лекарствата в организма. Една от най-изследваните и бързоразвиващи се такива системи са наночастиците. Те са обекти с размери в субмикрометричния обхват, които могат да бъдат модифицирани с лекарствени вещества и да служат като техни преносители. Възлагат се надежди, че пренасянето на лекарствата в организма посредством наночастици би могло да подобри биологичното им действие, да намали страничните ефекти и дори да даде възможности за избирателно отдаване в определени тъкани и клетки. Албуминовите наночастици (BSA) са едни от най – предпочитаните, поради тяхната отлична биосъвместимост, стабилност в кръвния поток и биоразградимост. Те се използват като преносители на различни молекулни сонди, лекарствен преносител за туморна диагностика и терапия (Desai 2015).

В настоящата работа сме си поставили за цел да направим сравнително изследване на взаимодействието на лекарствени вещества с BSA-наночастици и липозоми.

## Материали и методи

### *Лекарствени вещества:*

Лекарствените вещества използвани в настоящата работа са един аналог на клинично използваното лекарство ломустин, и две фенотиазинови производни.

*Нитрозоурей:* Спин-белязаната нитрозоурей N-[N'-2-chloroethyl]-glycine amide of 2,2,6,6-tetramethyl-4 aminopiperidine-1 oxyl (SLCNUgly) е синтезирана по метода на Желева 1991 (Желева 1991).

Приготвян е изходен разтвор с концентрации 10 mM. Поради много слабата им разтворимост във вода се приготвяха 2 вида разтвори – във водноалкохолна смес (50% етанол) или в Dimethyl sulfoxide (DMSO). Разтворите бяха приготвяни в началото на деня на експеримента и съхранявани постоянно в хладилник при 4 °C. Малки обеми от тези разтвори бяха добявяни към експерименталните системи за посигане на желаните концентрации.

*Фенотиазини:* Използвани са разтвори на хлорпромазин (2-хлоро-10- [3-(диметиламинопропил)] фенотиазин хидрохлорид (Chlorpromazine) и тиоридазин ((±) -2-метилтио-10- [2- (1-метил-2-пиперидил) етил] -фенотиазин хидрохлорид (Thioridazine hydrochloride)), търговски продукти на фирмата Sigma-Aldrich, USA.

Разтвори на фенотиазините (хлорпромазин или тиоридазин), с концентрации 100 mM и 10 mM в 0.1 M KCl или във физиологичен разтвор (150 mM) NaCl, бяха добавяни към работната среда в малки обеми към изследваните разтвори за достигане на желаните крайни концентрации.

### *Наночастици:*

Използваните в настоящата работа наночастици са получени от говежди серумен албумин (BSA) (Sigma-Aldrich, USA), чрез техника на десолватация по метода, описан по-рано в (Xie et al. 2012). За целта 200 mg BSA се разтварят в 2,0 ml Milli-Q (дейонизирана) вода. рН на разтвора 7.4 се достига с помоща на 10 mM NaOH. Към така получения разтвор при непрекъснато разбъркване се добавя на порции от 0,5 ml/min 8 ml етанол с перисталтична помпа. За фиксиране на образуваните BSA наночастици (BSA-НЧ) добавяхме постепенно 200 µl 8% разтвор на глутаралдеhid. BSA-НЧ се инкубираха 24 часа (20 °C) при постоянно разбъркване, след което бяха трикратно центрофугирани и измити с Milli-Q вода в съотношение 1:20. Съхраняват се в хладилник при 4 °C.

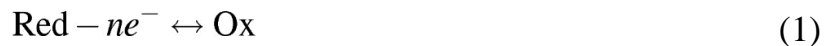
### *Липозоми:*

Липозомите бяха получени по метода на екструдирание.

В облодънна колба, при непрекъснато въртене с цел образуване на тънък липиден филм по стените, се поставят 200 µl разтвор на липиди (лецитин (L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine)) в хлороформ с концентрация 50 mg/ml. След пълното изпаряване на разтворителя при интензивно разклащане на колбата се добавят 5 ml физиологичен разтвор до крайна концентрация на липозомите 2 mg/ml. Получената суспензия най – напред се озвучава в ултразвукова вана до разрушаване на големите, многослойни липозоми и се прекарва с помощта на екструдер (Avanti Polar Lipids, Inc, USA) последователно през мембрана с размер на порите от 1µm и от 0,2 µm. Екструдирането се извършва по 11 пъти през първата и впоследствие 11 пъти през втората мембрана при температура от 52 °C. Така получената суспензия е със среден диаметър на липозомите от 0,2 µm.

### *Циклична волтамперометрия (CV)*

Електрохимичните методи на изследване се основават на анализа на волтамперните характеристики на окислително-възстановителни (редокс) реакции, протичащи върху работния електрод:



Тук *Red* и *Ox* са съответно редуцираната и окислената форма на изследваното вещество, *n* е броят на електроните  $e^-$ , участващи в окислително-възстановителната реакция. Същественото при електрохимичните методи е, че електроните се обменят между веществата и работния електрод. При окисление електродът приема електрони от *Red* (правата реакция в (1)), а при редуциране електроните преминават от електрода към *Ox*. Вещества, които обменят електрони с електрода се наричат електроактивни (Bard and L.R. Faulkner 1980).

Параметрите на реакцията (1) зависят от една страна от параметрите и състава на разтвора (концентрации, коефициенти на дифузия на *Ox* и *Red*), а от друга от състоянието на електродната повърхност. Съответно електрохимичните методи могат да се използват за изследване на състава на разтвори (концентрации и физикохимични характеристики на *Ox* и *Red*) или обратно - характеризиране на електродната повърхност при известни параметри на разтвора. За целите на настоящата работа сме използвали подхода за определяне концентрацията на електроактивните вещества за да характеризираме взаимодействието на лекарствени електроактивни вещества с липозомите в разтвора.

Уредът използван за електрохимичните измервания е потенциостат-гальваностат-честотен анализатор на импеданса (VersaStat 3F, Princeton Applied Research, USA).

Електрохимичните изследвания са провеждани в експериментална клетка съдържаща три електрода: стъкловъглероден (GC) електрод работен електрод (GCE) (CH Instruments, USA), сравнителен електрод Ag/AgCl, и платинов спомагателен електрод.

#### *Спектрофотометрични методи: втора производна на абсорбционния спектър*

При вграждането на лекарственото вещество в липидния бислой, поради промяната в обкръжението на лекарствената молекула от водно към хидрофобно, максимумите на поглъщане в спектъра се отместват с няколко нанометра. Това отместване може да се използва като мярка за вграждането на лекарственото вещество в липидния бислой, и оттам за изчисляване на коефициента на разпределение на лекарственото вещество. Измерванията се провеждат *in situ*, като при една и съща концентрация на лекарството се увеличава постепенно концентрацията на липозомите, с което се увеличава дела на адсорбираните върху липозомите лекарствени молекули.

Увеличаването на концентрацията на липозомите увеличава разсейването на светлината, което променя цялостния спектър на преминалата светлина – към абсорбционния спектър на лекарственото вещество се добавя background-спектъра на разсейването на липозомите. За да бъде оценено реалното отместване на максимумите на поглъщане е необходимо да се елиминира background-спектъра от разсейването на липозомите. Това става посредством получаването на втората производна на абсорбционния спектър  $A=f(\lambda)=\varepsilon_{\lambda}Cl$  на системата лекарство-вещество-липозомна суспензия (Keisuke Kitamura et al. 1995)(K Kitamura 1998)(Takegami et al. 2002)(Poła et al. 2004).

$$D = \frac{d^2A}{d\lambda^2} = \frac{d^2\varepsilon}{d\lambda^2}Cl \quad (2)$$

Методът се базира на факта, че интензитета на втората производна на спектъра *D* е пропорционален на концентрацията *C* на разтвореното поглъщащо светлината вещество - в нашия случай лекарственото вещество. ( $\varepsilon_{\lambda}$  – моларен екстинкционен коефициент,  $\lambda$  –

дължина на вълната,  $l$  – дължина на оптичния път на светлината през пробата).

Методът позволява определянето на така наречения моларен коефициент на разпределение на веществото между липозомите и водния разтвор. По определение той е равен на отношението на моларната концентрация на веществото в липозомите към моларната концентрация на веществото във водата. Същественото е че концентрациите са изразени като отношения mol/mol, т.е.

$$K_p = \frac{\text{mol of drug in lipid/mol of lipid}}{\text{mol of drug in water/mol of water}} \quad (3)$$

След математически преобразувания на уравнения (2) и (3) се получава така нареченото уравнение на Scott, което служи за определяне моларния коефициент на разпределение  $K_p$ :

$$\Delta D = \frac{K_p \Delta D_{max} [L]}{[W] + K_p [L]} \quad (4)$$

От всички криви на вторите производни се определя интензитета  $D$  за избрана дължина на вълната, и се за всяка крива (концентрация на липида) се изчислява  $\Delta D = D - D_0$ , като  $D_0$  е интензитета на втората производна на спектъра на лекарственото вещество без липозоми в разтвора.  $[L]$  и  $[W]$  са моларните концентрации на липидите и водата в разтвора -  $[W]$  се приема за 55 mol/L.  $K_p$  е моларният коефициент на разпределение на лекарственото вещество, а  $\Delta D_{max}$  е стойността на  $\Delta D$  при 100% разпределение на лекарството в липозомите. От експерименталните данни се построява зависимостта  $\Delta D = f([L])$ , а  $K_p$  и  $\Delta D_{max}$  се определят от апроксимацията на зависимостта с функцията (4). Апроксимацията е по метода на най-малките квадрати.

## Резултати и дискусия

### *Взаимодействие на лекарствените вещества с BSA-наночастици*

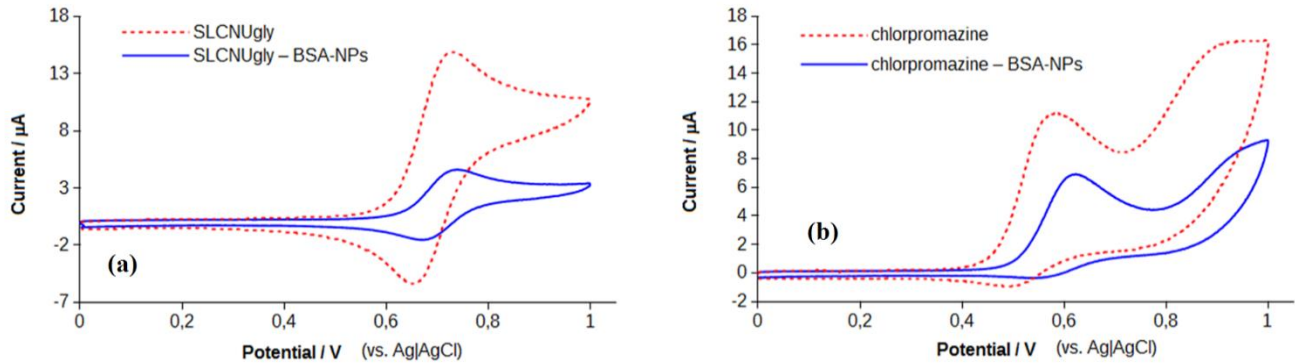
Взаимодействията на BSA-НЧ с лекарствените вещества бяха изследвани *in situ* в електрохимична клетка с немодифициран GCE. Процедурата е следната: Първо, лекарството се прибавя към електролитния разтвор в електрохимичната клетка и се прави циклична волтамперометрия (CV). След това в клетката се добавят BSA-наночастиците, разтворът се разбърква с магнитна бъркалка и отново се прави нова волтамперограма. Тъй като стойността на токовете в пиковете на волтамперограмите е пропорционална на концентрациите на електроактивното вещество в разтвора сравняването на волтамперограмите на лекарственото вещество в отсъствие и в наличие на наночастици може да даде информация за евентуално взаимодействие лекарство-наночастици.

На Фиг.1 са показани волтамперограми на SLCNUgly (a) и хлорпромазин (b) - измерени преди и след добавянето на BSA-НЧ в разтвора.

От Фиг.1 се вижда, че добавянето на BSA-НЧ води до значително намаляване на редокс пиковете на реакциите както на SLCNUgly, така и на CPZ.

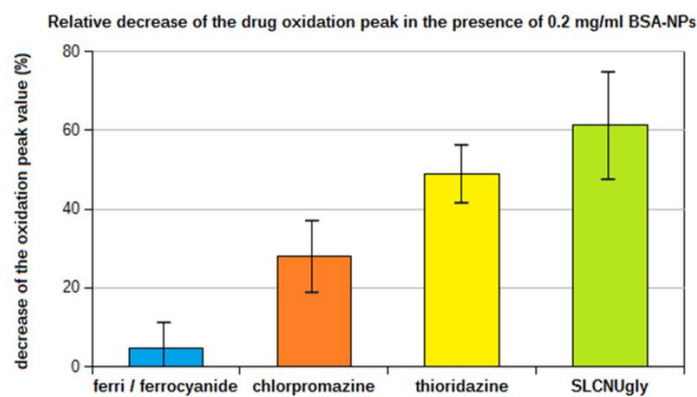
Възможните обяснения на това поведение са две. Първо, SLCNUgly и CPZ взаимодействат с наночастиците като проникват в тяхната сърцевина. Вследствие на проникването концентрацията на съответното лекарство вещество в разтвора намалява, което води до намаляване на височината на неговите редокс пикове. Друго възможно обяснение на получените резултати е блокиране част от електродната повърхност от самите наночастици, като по този начин се възпрепятства трансфера на заряди между лекарствените молекули в разтвора и електрода. Това на практика би означавало, че регистрираме взаимодействие наночастици-електрод, а не търсеното от нас взаимодействие наночастици-

лекарствени вещества. За да се проверим това предположение използвахме други електроактивни вещества - еквимоларна смес от калиев феррицианид ( $K_3Fe(CN)_6$ ) и калиев фероцианид ( $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ ), която се добавя към електролита вместо лекарствените вещества от предходните експерименти. Тази двойка е избрана, защото е силно хидрофилна и се предполага по-слабо хидрофобно взаимодействие с BSA-наночастиците. Процентното намаляване на пиковите на  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$  е показано на Фиг. 2 заедно с процентното намаляване на пиковите на SLCNUgly, CPZ и TDZ.



Фиг. 1. Циклични волтамперограми на 0.4 mM SLCNUgly (a) и 0.4 mM CPZ (b), получени без BSA-НЧ (червени пунктирани линии) и с 0,3 mg/mL BSA-НЧ (сини плътни линии); електролитна среда 0.1 M KCl, 4 mM фосфатен буфер ( $Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4$ ), pH 7.4; скорост на сканиране 0.1 V/s; (сравнителен електрод - Ag/AgCl).

На Фиг.2 са сравнени стойностите на "инкорпориращата способност" на BSA-наночастиците, според относителното намаляване на пика на окисление на всяко лекарство. Относителното намаляване се получава като  $(I_p^0 - I_p^{0.2}) / I_p^0 \cdot 100\%$ , където  $I_p^0$  е стойността на пика на окисление преди добавянето на BSA-наночастици в разтвора, и  $I_p^{0.2}$  е стойността на пика на окисление след добавянето на BSA-наночастици с крайна концентрация 0,2 mg/ml в разтвора.



Фиг. 2. "Инкорпориращата способност" на BSA-наночастици, според намаляването на пика на окисляване на всяко лекарство: 1 mM калиев ферри/фероцианид  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ ; 0.4 mM хлорпромазин; 0.4 mM тиоридазин; 0.4 mM SLCNUgly. Резултатите за тока са представени като относителна стойност на пиковия ток спрямо стойността при отсъствие на наночастици. Електрохимичната клетка: 0.1 M KCl, 4 mM фосфатен буфер ( $Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4$ ), pH 7.4; скорост на сканиране 0.1 V/s; (сравнителен електрод - Ag/AgCl).

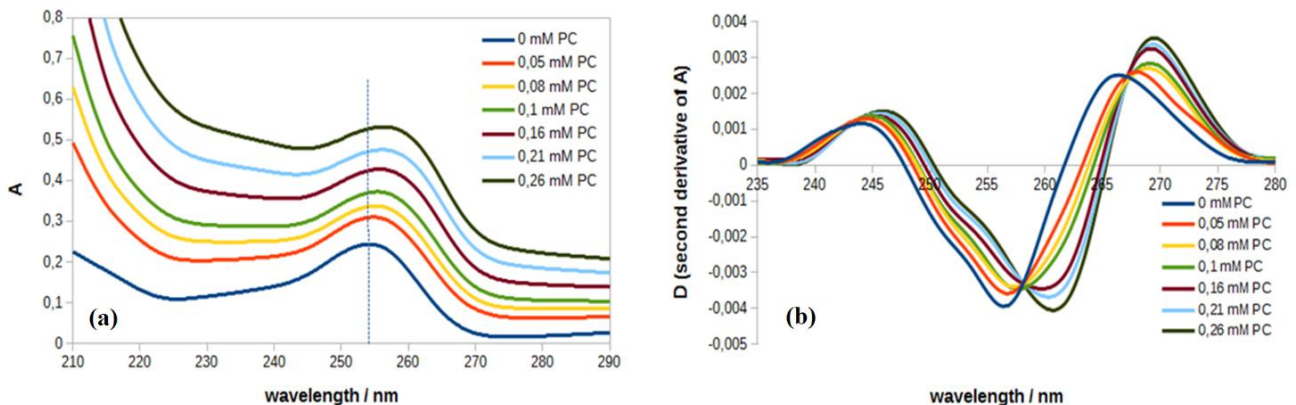
Резултатите на Фиг.2 подкрепят идеята на хидрофобно взаимодействие на лекарствата с BSA-наночастиците. Известно е, че TDZ е по-хидрофобен от CPZ (Binford and Palm 1994), а SLCNUgly е още по-хидрофобен, имайки предвид невъзможността му да се разтвори във воден разтвор. Според резултатите на Фиг.3 TDZ взаимодейства с BSA-наночастиците 1,75

пъти по-силно в сравнение с CPZ.

#### Взаимодействие на лекарствените вещества с липозоми.

Взаимодействието на лекарствените вещества с липозоми е характеризирано посредством UV-спектрофотометрия с цел определяне на коефициента на разпределение на изследваните от нас лекарствени вещества между липидната фаза на мембраните и водната фаза.

На Фиг. 3(a) са показани спектри на поглъщане на хлорпромазин при различни концентрации на липозомите. Концентрацията на липозомите е изразена като концентрация на липидните молекули (фосфатидилхолин) в общия обем на разтвора. Липозомите са получени по метода на екструдирането и са с размер 1000 nm.

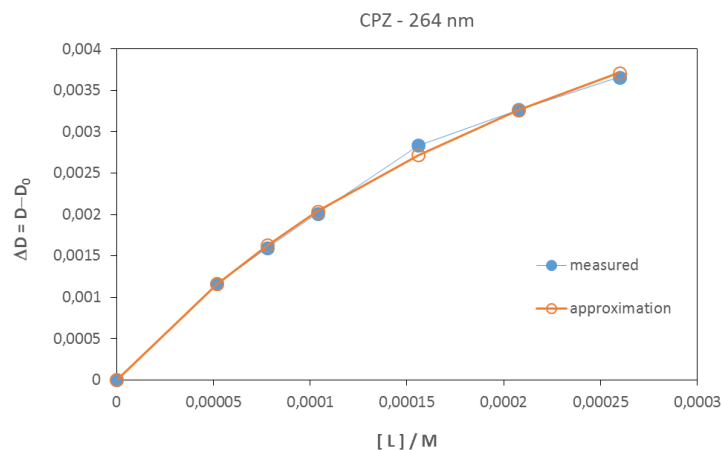


**Фиг. 3.** Абсорбционни спектри (а) и втора производна на абсорбционните спектри (б) на 10 µM CPZ в присъствието на липозоми от фосфатидилхолин (PC). Средата е 135 mM NaCl и 15 mM фосфатен буфер (pH 7.4). Концентрация на PC - 0 mM, 0.05 mM, 0.08 mM, 0.1 mM, 0.16 mM, 0.21 mM, 0.26 mM

При отсъствие на липозоми в средата се наблюдава пик на 254 nm, който постепенно се измества при повишаване на концентрацията на липидите. Освен това обаче, се наблюдава и значително фоново нарастване на интензитета на спектъра, което се дължи на разсейването на светлината от липозомите. За да се отчете ефекта на разсейването и да се отстрани фоновото „поглъщане“ от спектъра се прилага методът на втората производна. На Фиг. 3(b). са изобразени вторите производни на спектрите от Фиг. 3(a).

Виждат се типичните криви на вторите производни, при които има негативен пик на мястото на абсорционния пик в оригиналния спектр. Вижда се и също така, че фонът е изчистен най-сигурната индикация за това, е наличието на изосбестични точки (isosbestic points), в които се пресичат всички криви. На Фиг. 3(b) се различават ясно поне три такива – при дължини на вълната 243 nm, 258 nm и 267 nm. Това е доказателство, че фонът е изчистен, и че поглъщащото вещество се намира в две различни форми - в конкретния случай това е разтворен във водната фаза CPZ, и разтворен в липидната фаза CPZ.

За да се намери моларния коефициент на разпределение  $K_p$ , се използва така нареченото уравнение на Scott ( $K_p$  а  $\Delta D_{\max}$  се определят от апроксимацията на зависимостта с функцията (4)) От всички криви на вторите производни се определя интензитета  $D$  за избрана дължина на вълната, и за всяка крива (концентрация на липида) се изчислява  $\Delta D$ . Резултатите за спектрите са представени на Фиг.4. Стойността на втората производна  $D$  е измерена за 264 nm.



**Фиг. 4.** Зависимост на втората производна на спектъра на поглъщане, изразена като  $\Delta D = D - D_0$  от концентрацията на липидите в разтвора. Експериментални данни (плътни точки и апроксимационни данни (кръгове)). Данните от апроксимацията са  $K_p = 1,74 \times 10^5$  и  $\Delta D_{max} = 0,0082$ .

Същите серии експерименти бяха проведени и за другото фенотиазиново производно – тиоридазин (TDZ), както и за спин-белязаната нитрозоуреа SLCNUgly.

Стойностите за  $K_p$  за трите изследвани лекарствени вещества са приведени в таблица 1. Стойността на коефициента на разпределение за SLCNUgly е много близка до тази на CPZ, но отчитайки факта, че тя отразява разпределението между липозомите и 10% водно-алкохолна среда, както и по-голямата хидрофобност на SLCNUgly, можем да заявим, че реалният коефициент на разпределение на SLCNUgly между липозоми и водна фаза, ще бъде по-голям и ще бъде от порядъка на този на TDZ или по-голям.

**Таблица 1.** Моларни коефициенти на разпределение между липозоми и буферизиран физиологичен разтвор (pH 7.4). \*Стойността за SLCNUgly е за разпределението между липозоми и буферизиран физиологичен разтвор (pH7.4) с 10% на етанол

Лекарствено вещество	$K_p (\times 10^{-5})$
CPZ	$1.54 \pm 0.26$
TDZ	$3,73 \pm 0,89$
SLCNUgly	$1,79 \pm 0,59 *$

Интересно е да се направи сравнение на получените тук резултати за коефициентите на разпределение на CPZ и TDZ в BSA-наночастиците и липозомите с налични литературни данни за коефициентите на разпределение в липозоми и еритроцити (Таблица 2). Сравнението е направено между отношението на коефициентите на разпределение на TDZ и CPZ.

**Таблица 2.** Сравнение на отношението на коефициентите на разпределение  $K_p$  на CPZ и TDZ

Взаимодействие с :	Отношение на $K_{p(TDZ)}/K_{p(CPZ)}$	Позоваване
BSA - НЧ	1.75 ( $\pm$ 0.25)	докладваните тук резултати
Еритроцити	1.49	(Binford and Palm 1994)
Липозоми	2.22	(Binford and Palm 1994)
Липозоми	2.42 ( $\pm$ 0.45)	докладваните тук резултати

## Заклучение

Инкорпорирането на лекарствените вещества в BSA-НЧ, както и в липозомите е в нарастващ порядък хлорпромазин, тиоридазин, SLCNUgly. Този ред е в съответствие с хидрофилността на тези лекарствени вещества и говори, че инкорпорирането се дължи на хидрофобни взаимодействия с протеините в наночастиците, което се потвърждава и от сравнението със взаимодействието им с липозоми.

## Благодарности

Изследванията по настоящата работа са финансирани от Фонд „Научни изследвания“ – проект № ДНТС/Китай/01/11/ от 04.12.2014.

## Литература

- Желева, Антоанета. 1991. “Синтез И Свойства На Потенциални Противотуморни Агенти Производни На 2 – Хлоретилнитрозоуреята И Токсичния Пептид Бета Аманитин, Присъждане На Научната Степен ‘доктор’ По Химия.”
- Bard, A.J., and L.R. Faulkner. 1980. *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*. New York: Wiley.
- Binford, J S, and W H Palm. 1994. “Absorption of Surfactants by Membranes: Erythrocytes versus Synthetic Vesicles.” *Biophysical Journal* 66 (6): 2024–28. doi:10.1016/S0006-3495(94)80995-6.
- Desai, Neil. 2015. “Nanoparticle Albumin-Bound Anticancer Agents.” In *Non-Biological Complex Drugs*, edited by Daan J.A. Crommelin and Jon S. B. de Vlieger, 20:335–54. AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series. Cham: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-16241-6.
- Kitamura, K. 1998. “Second Derivative Spectrophotometric Determination of Partition Coefficients of Phenothiazine Derivatives between Human Erythrocyte Ghost Membranes and Water.” *Talanta* 46 (6): 1433–38. doi:10.1016/S0039-9140(98)00014-9.
- Kitamura, Keisuke, Noriyuki Imayoshi, Takashi Goto, Hiroto Shiro, Takako Mano, and Yuko Nakai. 1995. “Second Derivative Spectrophotometric Determination of Partition Coefficients of Chlorpromazine and Promazine between Lecithin Bilayer Vesicles and Water.” *Analytica Chimica Acta* 304 (1): 101–6. doi:10.1016/0003-2670(94)00566-5.
- Poła, Andrzej, Krystyna Michalak, Anna Burliga, Noboru Motohashi, and Masami Kawase. 2004. “Determination of Lipid Bilayer/water Partition Coefficient of New Phenothiazines Using the Second Derivative of Absorption Spectra Method.” *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 21 (4): 421–27. doi:10.1016/j.ejps.2003.10.007.
- Takegami, Shigehiko, Keisuke Kitamura, Keiko Takahashi, and Tatsuya Kitade. 2002. “Partition of N-Monodemethylated Phenothiazine Drugs to Phosphatidylcholine Bilayer Vesicles Studied by Second-Derivative Spectrophotometry.” *Journal of Pharmaceutical Sciences* 91 (6): 1568–72. doi:10.1002/jps.10121.
- Xie, Lili, Weijun Tong, Dahai Yu, Jianquan Xu, Jun Li, and Changyou Gao. 2012. “Bovine Serum Albumin Nanoparticles Modified with Multilayers and Aptamers for pH-Responsive and Targeted Anti-Cancer Drug Delivery.” *Journal of Materials Chemistry* 22 (13). The Royal Society of Chemistry: 6053. doi:10.1039/c2jm16831f.