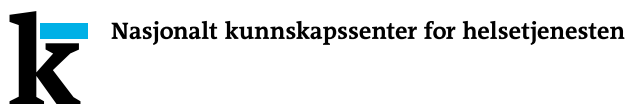


Bruk av nanoteknologi for diagnostikk og behandling av kreft

Notat fra Kunnskapssenteret

Hasteoppdrag

Desember 2006



Om notatet: Notatet gir en kort oversikt over bruk av nanoteknologi for diagnostikk og behandling av kreft. Det er utarbeidet etter forespørsel fra Helse Vest RHF som i økende grad opplever at pasienter etterspør denne typen teknologi. Notatet er i hovedsak basert på en rapport utarbeidet av “Committee of the Health Council” i Nederland fra 2006. **Om nanoteknologi:** Materialer med dimensjoner mellom 0,1 og 100 nm kan ha svært forskjellige mekaniske, optiske, elektriske og magnetiske egenskaper sammenlignet med det samme materialet av større dimensjoner. Dette har ført til at nanoteknologi, som innebærer manipulering av materialer på nanometernivå, er blitt en egen vitenskap. **Om diagnostikk:** Økt kunnskap om det humane genomet har økt mulighetene for å starte behandling av enkelte sykdommer før symptomer oppstår. Forebyggende behandling og tidlig diagnostikk får stadig større oppmerksomhet innen medisinsk forskning, og kanskje spesielt innen kreftforskningen. Nanoteknologi kan her spille en stor rolle, spesielt innen utvikling av biomarkører for å oppdage avvik på DNA- og proteinnivå. **Om behandling:** her er det først og fremst snakk om *(fortsetter på baksiden)*

Nasjonalt kunnskapssenter for helsetjenesten
Postboks 7004, St. Olavs plass
N-0130 Oslo
(+47) 23 25 50 00
www.kunnskapssenteret.no
ISBN: 82-8121-142-3

desember 2006

Nasjonalt kunnskapssenter for helsetjenesten



(fortsettelsen fra forsiden) nanopartikler brukt for transport av medikamenter, nanopartikler som medisin eller til bruk i medisinske instrumenter eller implantater. Per dags dato er kun et fåtalls medisinske produkter basert på nanoteknologi tilgjengelig.

Tittel	Bruk av nanoteknologi for diagnostikk og behandling av kreft
Institusjon	Nasjonalt kunnskapssenter for helsetjenesten
Ansvarlig	John-Arne Røttingen, direktør
Forfattere	Bjørn Anton Graff
ISBN	ISBN 82-8121-142-3
Notat	2006
Produkt	Hasteoppdrag
Antall sider	9
Oppdragsgiver	Helse Vest RHF
	Nasjonalt kunnskapssenter for helsetjenesten fremskaffer og formidler kunnskap om effekt, nytte og kvalitet av metoder, virkemidler og tiltak innen alle deler av helsetjenesten.
	Kunnskapssenteret er formelt et forvaltningsorgan under Sosial- og helsedirektoratet. Det har ingen myndighetsfunksjoner og kan ikke instrueres i faglige spørsmål.

Nasjonalt kunnskapssenter for helsetjenesten

Oslo, desember 2006

Bakgrunn

I det følgende gis et meget kort sammendrag om anvendelse av nanoteknologi med fokus på diagnostikk og terapi av kreft. Notatet er utarbeidet etter en forespørsel fra Helse Vest RHF som i økende grad opplever at pasienter etterspør denne typen teknologi. Sammendraget er hovedsakelig basert på en rapport utarbeidet av "Committee of the Health Council" i Nederland, publisert i 2006 (1).

Introduksjon

Materialer med dimensjoner mellom 0,1 og 100 nm kan ha svært forskjellige mekaniske, optiske, elektriske og magnetiske egenskaper sammenlignet med det samme materialet av større dimensjoner. Dette har ført til at nanoteknologi, som innebærer manipulering av materialer på nanometernivå, er blitt en egen vitenskap. Per dags dato er kun et fåtalls medisinske produkter basert på nanoteknologi tilgjengelig. Under følger en oversikt over medisinske områder hvor produkter basert på nanoteknologi kan bli implementert i helsevesenet.

Diagnostikk

Økt kunnskap om det humane genomet har gitt muligheter til å spore sykdommer tilbake til abnormaliteter på DNA- og proteinnivå. Dette gir en mulighet til å kunne starte behandling av enkelte sykdommer før symptomer oppstår (2,3). Forebyggende behandling og tidlig diagnostikk har fått stadig større oppmerksomhet innen medisinsk forskning, og kanskje spesielt innen kreftforskningen (3). Nanoteknologi kan her spille en stor rolle, og det er spesielt innen utvikling av biomarkører for å oppdage avvik på DNA- og proteinnivå man tror at nanoteknologien vil komme til størst nytte de nærmeste årene (4-6). Biomarkørene kan benyttes på prøver fra pasienter *in vitro* (på prøver fra pasienter), eller de kan administreres til pasientene og gi en diagnose *in vivo*.

In vitro diagnostikk

Mikromatriser benyttes for å undersøke genekspressjonen i et vevsmateriale (f.eks. i en biopsi av en tumor). Undersøkelsen kan gjøre det lettere å stille en diagnose, og har potensial til å kunne forutsi hvordan en pasient vil respondere på en behandling. Den kan dermed indikere hva slags behandling pasienten bør gis. Slike mikromatriser er i utstrakt bruk innen forskningen, men brukes sjeldent i klinisk praksis. Nanoteknologi spiller i dag en viktig rolle i produksjonen av slike matriser, og kan bidra til at metodene blir mer nøyaktige i fremtiden (7).

Et alternativ til bruken av mikromatriser er en relativt ny metode basert på nanoteknologi - "quantum dots". "Quantum dots" er fluorescerende nanokrystaller som kan syntetiseres til å fluorescere ulike bølgelengder, og som kan eksiteres til en høyere energitilstand med lys av én og samme bølgelengde (8).

Sammensetningen av ulike nanokrystaller kan derfor studeres med én laserkilde. DNA i en prøve kan identifiseres ved at det binder seg spesifikt til DNA-molekyler med kjent kode markert med en unik sammensetning/fargekode av "quantum dots" og gir en rask og presis identifisering av DNA-sekvenser. Metoden er i bruk i forskningsmiljøer (9), men klinisk bruk er foreløpig svært begrenset.

Det arbeides også med å utvikle en annen metode for å identifisere sammensetningen av DNA fra en prøve ved at DNA molekylene trekkes gjennom en membran med nanoporer ved hjelp av et elektrisk potensial. Basesekvensen kan identifiseres ved å studere den elektriske strømmen gjennom membranen som funksjon av tiden (10). Dersom man lykkes med å etablere denne metoden, kan basesekvensen til DNA i en prøve bestemmes mye raskere enn i dag.

Metodene nevnt over for å identifisere sammensetningen av DNA kan også benyttes for proteiner og karbohydrater, men ustabilitet og kompleksitet gjør arbeidet vanskeligere (7). Amerikanske forskere har utviklet en detektor for prostatakreft som fungerer slik at detektoren forandrer sine optiske egenskaper når den kommer i kontakt med prostata spesifikt antigen (PSA) (11,12).

"Labs-on-a-chip" er laboratorier i lommeformat basert på nanoteknologi. Tankegangen er at man skal kunne måle konsentrasjoner av molekyler på prøver av f.eks. blod, og at testene raskt kan utføres på det enkelte legekantor eller som hjemmetest. Det er f.eks. utviklet en chip for hjemmebruk som måler litiumkonsentrasjonen til pasienter som er avhengig av å ha en stabil konsentrasjon av litium i blodet (13).

"Photonic explorers for bioanalysis with biologically localised embedding" (PEBBLEs) er sensorer som er noen få hundre nanometer tykke. Disse består av en kapsel som inneholder en indikator som sender ut lys når en valgt substans kommer inn i kapselen (14). PEBBLEs kan brukes til å måle konsentrasjoner av små ioner og molekyler intracellulært. Når kapslene befinner seg i cellenes cytoplasma kan lysemisjonen monitoreres gjennom et mikroskop. Unormale konsentrasjoner av ioner og molekyler kan på denne måten monitoreres. Foreløpig benyttes denne metoden til å studere Alzheimer og Parkinson som kan karakteriseres ved unormale sinkkonsentrasjoner (15). Tumorvev kan også karakteriseres ved at intracellulære konsentrasjoner av enkelte ioner og mindre molekyler er unormal (16), og det kan derfor tenkes at denne metoden kan komme til nytte i diagnostisering av kreft i fremtiden.

In vivo diagnostikk

Bruk av nanoteknologi er i denne sammenhengen først og fremst knyttet til billeddiagnostikk. Nanoteknologi gir muligheter for å forbedre dagens teknikker og å etablere nye teknikker. Nanopartikler kan designes hvor en partikkel omgitt av et lipidlag kombineres med gadolinium eller en radioaktiv isotop. På denne måten kan utbredelsen av partikkelen avbildes ved hjelp av MRI eller ulike scintografiske teknikker (7,17). Dersom partikkelen i tillegg er konjugert til et antistoff, kan man avbilde utbredelsen av et antigen. Antigenet kan være membranproteiner på overflaten av kreftceller eller proteiner som uttrykkes i spesielle prosesser f.eks. tumor angiogenese.

Superparamagnetiske partikler av jernoksid er i dag i klinisk bruk som kontrastmiddel for MRI (3). Disse kan bidra til å oppdage metastaser i lymfekjertler (18). Man har også forsøkt å benytte denne typen partikler som molekulære markører. Dvs. for å måle konsentrasjoner eller avbilde områder hvor konsentrasjonen av et valgt molekyl er høy.

Utviklingen av "quantum dots" som beskrevet tidligere kan også bidra til at avbildning av metastaser i større grad kan gjøres optisk. Optisk avbildning med fluorescerende stoffer som akkumuleres i tumorvev gjøres i dag også, men applikasjonen er knyttet til tumorer i hud eller områder rett under huden. "Quantum dots" har bl.a. den fordelen at de blekes langsommere enn tradisjonelle fluorescerende stoffer og at de er inerte (19-22).

Terapi

Nanopartikler for transport av medikamenter

Distribusjon og spesifisitet er et problem knyttet til administrering av medikamenter. Dette problemet er kanskje aller størst innen kreftbehandling, da transport av terapeutiske agens til kreftsvulstene, og distribusjonen i kreftvevet begrenses av tumorvevets fysiologiske egenskaper. Problemene med transport kan være knyttet til at medikamentet ikke er vannløslig slik at de ikke kan transporteres i blodet, de kan degraderes raskt av enzymer i blodet, eller de kan bindes uspesifikt. Ved bruk av nanoteknologi finnes det en mulighet for å lage såkalte "magic bullets" som kan bedre transporten av medikamenter til tumorvevet (7,23). Avhengig av medikamentets egenskaper kan man designe nanopartikler som innkapsler medikamentet eller som er festet til medikamentet. Dette kan øke løseligheten, og hindre degradering og uspesifikk binding. "Coating" av nanopartikkelen kan hindre at den blir identifisert og fjernet av immunsystemet (24,25).

Selektiv akkumulering i tumorvevet er mulig på flere måter. Nanopartiklene kan ha en størrelse som passivt vil øke opptaket, siden blodårene i kreftvev ofte har større porer enn årene i normalvev (26). Alternativt kan nanopartiklene konjugeres til "targeting molecules" slik at medikamentet aktivt akkumuleres i det aktuelle organet/vevet. Utstyrt med de rette "targeting molecules" kan medikamenter transporteres over blod-/hjernebarrieren for å behandle tumorer i hjernen (27,28). Dersom nanopartiklene i tillegg fungerer som kontrastmidler er det mulig å monitorere hvor suksessfull behandlingen er (29,30).

Nanopartikler som medisin

Akkumulering av medikamenter i den ønskede lokalisasjonen kan også skje ved at vevet påvirkes eksternt etter at nanopartikler er injisert i vevet eller administrert til pasienten på annen måte. Dette kan gjøres ved hjelp av magnetiske felt (31-33), nær infrarød stråling (34), ultrasoniske vibrasjoner (35) eller varme (36-38), avhengig av egenskapene til den valgte nanopartikkelen.

I tillegg til å bedre transporten av medikamenter, kan nanopartiklene også selv fungere som aktive substanser. Dersom nanopartiklene er magnetiske kan de etter å ha blitt tatt opp, eller sprøytet inn i tumorvevet, drepe kreftcellene ved at tumorvevet utsettes for et oscillerende magnetfelt (39). Dersom nanopartiklene inneholder metaller, kan de varmes opp med infrarød stråling og drepe de nærliggende kreftcellene (40,41). Nanorør av karbon kan også drepe kreftcellene når vevet utsettes for nær infrarød stråling (42).

Passive implantater og vevssyntese

Kunstige ledd (f.eks. hofteproteser) har en relativt kort levetid på 10-15 år (7,43). Nanoteknologi kan bidra til å øke denne levetiden ved at implantatene "coates" med nanokrystaller (44). Dette kan bidra til at implantatet blir mer slitesterkt, og kan øke kroppens toleranse for implantatet (øke biokompatibiliteten).

Aktive implantater

Aktive implantater er implantater som har en energikilde (45). Dette kan være implantater for administrering av medisiner som f.eks. insulin- eller morfinpumper. Fordelen med disse implantatene er at de kan administrere medisinen i, eller i nærheten av målorganet. Administreringen kan foregå kontinuerlig i ulike rater, men implantatene kan også utstyres med biosensorer som responderer på ulike fysiologiske parametere. Slike system er straks

klare for kliniske forsøk (7). Nanoteknologi kan her bidra til at størrelsen til implantatet og evt. sensor blir liten. En annen gruppe av aktive implantater tar over neurale funksjoner. Disse kan erstatte ødelagte nervebaner, gi impulser til muskulatur, eller erstatte sanser. Denne gruppen inkluderer for eksempel koklea-implantater, pacemakere og defibrillatorer. Denne typen implantater er i bruk i dag, mens retinale implantater (implantater som skal erstatte funksjonen til netthinnen i øyet) ennå ikke er utviklet.

Desinfisering

Utviklingen av resistens mot antibiotika hos bakterier har ført til en økt interesse for bruk av sølv for å bekjempe mikroorganismer (7,46). Den antiseptiske effekten skyldes sølvionene som hindrer metabolismen, destabiliserer celledelingsmembranen og hindrer celledeling. Det antas at bakterier ikke vil utvikle resistens mot sølv. Nanopartikler av sølv kan integreres i andre materialer og fungere som depot som kontinuerlig gir fra seg sølvioner. Bruksområder kan være medisinske instrumenter eller implantater. Forskningen fokuseres i dag på å integrere nanopartikler av sølv i katetre (47,48), koklea-implantater (7,45) og i ben-sement (49,50). Bandasjer/plaster med nanopartikler av sølv er tilgjengelige på markedet (51,52).

Risiko - Sikkerhet

Partikkelstørrelse kan gi noen spesielle effekter som må tas i betraktning når det gjelder risiko og sikkerhet ved bruk av medikamenter og implantater basert på nanoteknologi. Partikkeltoksikologi har utviklet seg til å bli et eget fagfelt (53), og har spesiell fokus på respirasjonen, da det lenge har vært klart at små partikler kan gi skade på luftveiene.

Spørsmålet er om kunnskapen om tradisjonelle partikler er gyldig når det gjelder syntetiske nanopartikler (54-59). Det finnes noe kunnskap om effekter på mennesker og denne er i hovedsak knyttet til respirasjon av nanopartikler (60,61) og bruk av nanopartikler for transport av medikamenter eller som kontrastmidler (62).

Referanser:

1. Health council of the Netherlands. Health significance of nanotechnologies.2006.
2. Lamerichs r, Schäffer T, Hämisch Y et al. Molecular imaging: the road to better healthcare. *Medicamundi* 2003; 47: 2-9.
3. European Science Foundation. Nanomedicine - an ESF - European Medical Research Councils (EMRC) forward look report. Strasbourg: European Science Foundation 2005.
4. Baumgartner, W., Jäckli, B., Schmithüsen, B., and Weber, F. Nanotechnologie in der Medizin. Bern: TA-Swiss 2003.
5. Emerich DF, Thanos CG. Nanotechnology and medicine. *Expert Opin Biol Ther* 2003; 3: 655-63.
6. Hauptman, A. and Sharan, Y. Envisioned developments in nanobiotechnology - Nano2Life expert survey report. Tel-Aviv: Interdisciplinary Center for Technology Analysis and Forecasting, Tel-Aviv University 2005.
7. Wagner, V. and Wechsler, D. Nanotechnologie II: Anwendungen in der Medizin und Pharmazie. Düsseldorf: Zukünftige Technologien XConsulting, VDI Technologiezentrum GmbH 2004.
8. Han M, Gao X, Su JZ et al. Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 631-5.
9. Xu H, Sha MY, Wong EY et al. Multiplexed SNP genotyping using the Qbead system: a quantum dot-encoded microsphere-based assay. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: e43.
10. LaVan DA, Lynn DM, Langer R. Moving smaller in drug discovery and delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 77-84.
11. Wu G, Datar RH, Hansen KM et al. Bioassay of prostate-specific antigen (PSA) using microcantilevers. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 856-60.
12. Majumdar A. Bioassays based on molecular nanomechanics. *Dis Markers* 2002; 18: 167-74.
13. Vrouwe EX, Luttge R, van den BA. Direct measurement of lithium in whole blood using microchip capillary electrophoresis with integrated conductivity detection. *Electrophoresis* 2004; 25: 1660-7.
14. Buck SM, Koo YE, Park E et al. Optochemical nanosensor PEBBLES: photonic explorers for bioanalysis with biologically localized embedding. *Curr Opin Chem Biol* 2004; 8: 540-6.
15. Sumner JP, Aylott JW, Monson E et al. A fluorescent PEBBLE nanosensor for intracellular free zinc. *Analyst* 2002; 127: 11-6.
16. Chinje EC, Stratford IJ. Role of nitric oxide in growth of solid tumours: a balancing act. *Essays Biochem* 1997; 32:61-72.
17. Morawski AM, Winter PM, Crowder KC et al. Targeted nanoparticles for quantitative imaging of sparse molecular epitopes with MRI. *Magn Reson Med* 2004; 51: 480-6.
18. Torabi M, Aquino SL, Harisinghani MG. Current concepts in lymph node imaging. *J Nucl Med* 2004; 45: 1509-18.
19. Parak WJ, Pellegrino T, Plank C. Labelling of cells with quantum dots. *Nanotechnology* 2005; 16: R9-R25.
20. Jovin TM. Quantum dots finally come of age. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 32-3.

21. Lidke DS, Arndt-Jovin DJ. Imaging takes a quantum leap. *Physiology (Bethesda)* 2004; 19: 322-5.
22. Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA et al. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* 2005; 307: 538-44.
23. Sahoo SK, Labhasetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov Today* 2003; 8: 1112-20.
24. Gabizon AA. Stealth liposomes and tumor targeting: one step further in the quest for the magic bullet. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 223-5.
25. Owens DE, III, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm* 2006; 307: 93-102.
26. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 1986; 46: 6387-92.
27. Kreuter J, Shamenkov D, Petrov V et al. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *J Drug Target* 2002; 10: 317-25.
28. Muller RH, Keck CM. Drug delivery to the brain--realization by novel drug carriers. *J Nanosci Nanotechnol* 2004; 4: 471-83.
29. Harrington KJ, Mohammadtaghi S, Uster PS et al. Effective targeting of solid tumors in patients with locally advanced cancers by radiolabeled pegylated liposomes. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 243-54.
30. Quintana A, Raczka E, Piehler L et al. Design and function of a dendrimer-based therapeutic nanodevice targeted to tumor cells through the folate receptor. *Pharm Res* 2002; 19: 1310-6.
31. Lubbe AS, Bergemann C, Riess H et al. Clinical experiences with magnetic drug targeting: a phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors. *Cancer Res* 1996; 56: 4686-93.
32. Alexiou C, Jurgons R, Schmid RJ et al. Magnetic drug targeting--biodistribution of the magnetic carrier and the chemotherapeutic agent mitoxantrone after locoregional cancer treatment. *J Drug Target* 2003; 11: 139-49.
33. Saiyed Z, Telang S, Ramchand C. Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine. *Biomagn Res Technol* 2003; 1: 2.
34. Radt B, Smith TA, Caruso F. Optically addressable nanostructured capsules. *Advanced Materials* 2004; 16: 2184-9.
35. Nelson JL, Roeder BL, Carmen JC et al. Ultrasonically activated chemotherapeutic drug delivery in a rat model. *Cancer Res* 2002; 62: 7280-3.
36. Kong G, Braun RD, Dewhirst MW. Characterization of the effect of hyperthermia on nanoparticle extravasation from tumor vasculature. *Cancer Res* 2001; 61: 3027-32.
37. Meyer DE, Shin BC, Kong GA et al. Drug targeting using thermally responsive polymers and local hyperthermia. *J Control Release* 2001; 74: 213-24.
38. Meyer DE, Kong GA, Dewhirst MW et al. Targeting a genetically engineered elastin-like polypeptide to solid tumors by local hyperthermia. *Cancer Res* 2001; 61: 1548-54.
39. Johannsen M, Thiesen B, Jordan A et al. Magnetic fluid hyperthermia (MFH) reduces prostate cancer growth in the orthotopic Dunning R3327 rat model. *Prostate* 2005; 64: 283-92.
40. Hirsch LR, Stafford RJ, Bankson JA et al. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 13549-54.

41. O'Neal DP, Hirsch LR, Halas NJ et al. Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. *Cancer Lett* 2004; 209: 171-6.
42. Kam NW, O'Connell M, Wisdom JA et al. Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 11600-5.
43. Park GE, Webster TJ. A review of nanotechnology for the development of better orthopedic implants. *J Biomed Nanotechnol* 2005; 1: 18-29.
44. Catledge SA, Fries MD, Vohra YK et al. Nanostructured ceramics for biomedical implants. *J Nanosci Nanotechnol* 2002; 2: 293-312.
45. Morrison M. Nanotechnology and the implications for the health of the EU citizen. *Nanoforum* 2003.
46. Lansdown AB. Silver. I: Its antibacterial properties and mechanism of action. *J Wound Care* 2002; 11: 125-30.
47. Furno F, Morley KS, Wong B et al. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection? *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 1019-24.
48. Samuel U, Guggenbichler JP. Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23 Suppl 1:S75-8.
49. Alt V, Bechert T, Steinrucke P et al. [Nanoparticulate silver. A new antimicrobial substance for bone cement]. *Orthopade* 2004; 33: 885-92.
50. Alt V, Bechert T, Steinrucke P et al. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials* 2004; 25: 4383-91.
51. Dowsett C. An overview of Acticoat dressing in wound management. *Br J Nurs* 2003; 12: S44-S49.
52. Lansdown AB. A guide to the properties and uses of silver dressings in wound care. *Prof Nurse* 2005; 20: 41-3.
53. Borm PJ. Particle toxicology: from coal mining to nanotechnology. *Inhal Toxicol* 2002; 14: 311-24.
54. deJong, W. H., Roszek, B., and Geertsma, R. E. Nanotechnology in medical applications: possible risks for human health. Bilthoven: RIVM 2005.
55. Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 823-39.
56. Borm PJ, Kreyling W. Toxicological hazards of inhaled nanoparticles--potential implications for drug delivery. *J Nanosci Nanotechnol* 2004; 4: 521-31.
57. Hoet PH, Bruske-Hohlfeld I, Salata OV. Nanoparticles - known and unknown health risks. *J Nanobiotechnology* 2004; 2: 12.
58. Reijnders L. Cleaner nanotechnology and hazard reduction of manufactured nanoparticles. *J Cleaner Production* 2006; 14: 124-33.
59. Nel A, Xia T, Madler L et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006; 311: 622-7.
60. Dockery DW, Pope CA, Xu X et al. An association between air pollution and mortality in six US cities. *N Engl J Med* 1993; 329: 1753-9.
61. Hoek G, Brunekreef B, Goldbohm S et al. Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in the Netherlands: a cohort study. *Lancet* 2002; 360: 1203-9.

62. Allen TM, Cullis PR. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* 2004; 303: 1818-22.