

Langtidsvirkende lægemidler via polymer-albumin-konjugation

Polymer-albumin konjugater øger cirkulationstiden for små lægemidler, hvilket giver en optimeret effekt. En snedig linker gør, at lægemidlet sidder fast på konjugatet i blodcirkulationen, men frigives lynhurtigt inden i cellerne. Konjugaterne syntetiseres gennem lettilgængelig kemi, hvilket gør platformen bredt anvendelig.

Af Camilla Kaas Frich, Anna H.F. Andersen og Alexander N. Zelikin, Institut for Kemi, Aarhus Universitet

Et typisk lægemiddel har en lav molekylvægt, hvorfor det let kan metaboliseres og hurtigt udskilles fra kroppen. Derfor skal mange lægemidler indtages dagligt, eller flere gange dagligt, hvilket både er dyrt og til gene for patienterne. En måde at omgå dette er ved at sætte lægemidlet fast på et større transportmolekyle, f.eks. en polymer. Polymeren virker både ved at forlænge cirkulationstiden i kroppen, mindske den metaboliske nedbrydning af lægemidlet før det når sit mål, gøre lægemidlet mere vandopløseligt og ved at muliggøre levering af mange lægemiddelpåsat den samme polymer [1]. Et historisk problem ved polymerstrategien har dog været, at de store unedbrydelige polymerer kan ophobes i kroppen, hvilket kan forårsage en giftig tilstand. Ved at anvende kortere polymerer undgås denne ophobning, samtidig med at mange af fordelene ved polymeren, såsom mange kopier af lægemidlet, optimeret vandopløselighed, nedsat metabolisme og muligheder for kemisk modifikation bibeholdes. Den korte polymer vil dog have en kortere levetid i kroppen, hvilket ligesom for det lille lægemiddel, ønskes forbedret. Dette problem løses ved at sætte polymeren fast på et naturligt forekommende protein, albumin. Albumin er det mest forekommende protein i blodplasma og har desuden den egenskab, at et sæt unikke receptorer (FcRn) forlænger dets levetid i kroppen, ved at albumin genanvendes fremfor nedbrydes [2].

Lægemidler påsat albumin-polymer-konjugater opnår således en længere cirkulationstid i kroppen, og det betyder, at man kan nøjes med at administrere lægemidlet sjældnere. Det er både billigere, mere behageligt for patienten og kan være med til at nedbringe bivirkninger ved behandlingen.

Hurtigere og mere effektiv frigivelse af lægemidlet

Et lille lægemiddel påsat et stort polymer-albumin-konjugat skal frigives for at kunne udøve sin effekt. Kovalente bindinger er som udgangspunkt meget stabile. Traditionelt har lægemidler været påsat via esterbindinger, der langsomt kan hydrolyseres, særligt i surt miljø, hvorved lægemidlet frigives. En metode til en hurtigere og mere effektiv frigivelse af lægemidler er blevet udviklet af vores forskningsgruppe [3,4]. Metoden muliggør et konjugat, hvor lægemidlet sidder stabilt fast på polymeren, når denne er i blodet, men så snart konjugatet optages i celler, frigives det aktive lægemiddel. Denne metode er baseret på en linker indeholdende en disulfidbinding. Disulfidbindingen er stabil i det oxidative miljø i blodkredsløbet, men ustabil i det reductive intracellulære miljø.

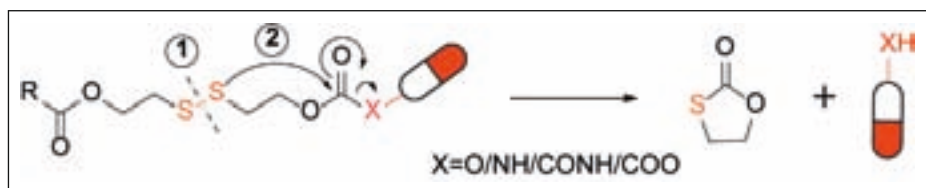
Nedbrydning af disulfidbindingen starter en kaskadereaktion, som nedbryder linkeren og afgiver det frie uforandrede lægemiddel, figur 1. Denne strategi kan anvendes for mange lægemidler, da kemien er fleksibel og understøtter lægemidler indeholdende alkohol-, carboxylsyre-, amid- og amingrupper.

Trinvis konjugatsyntese

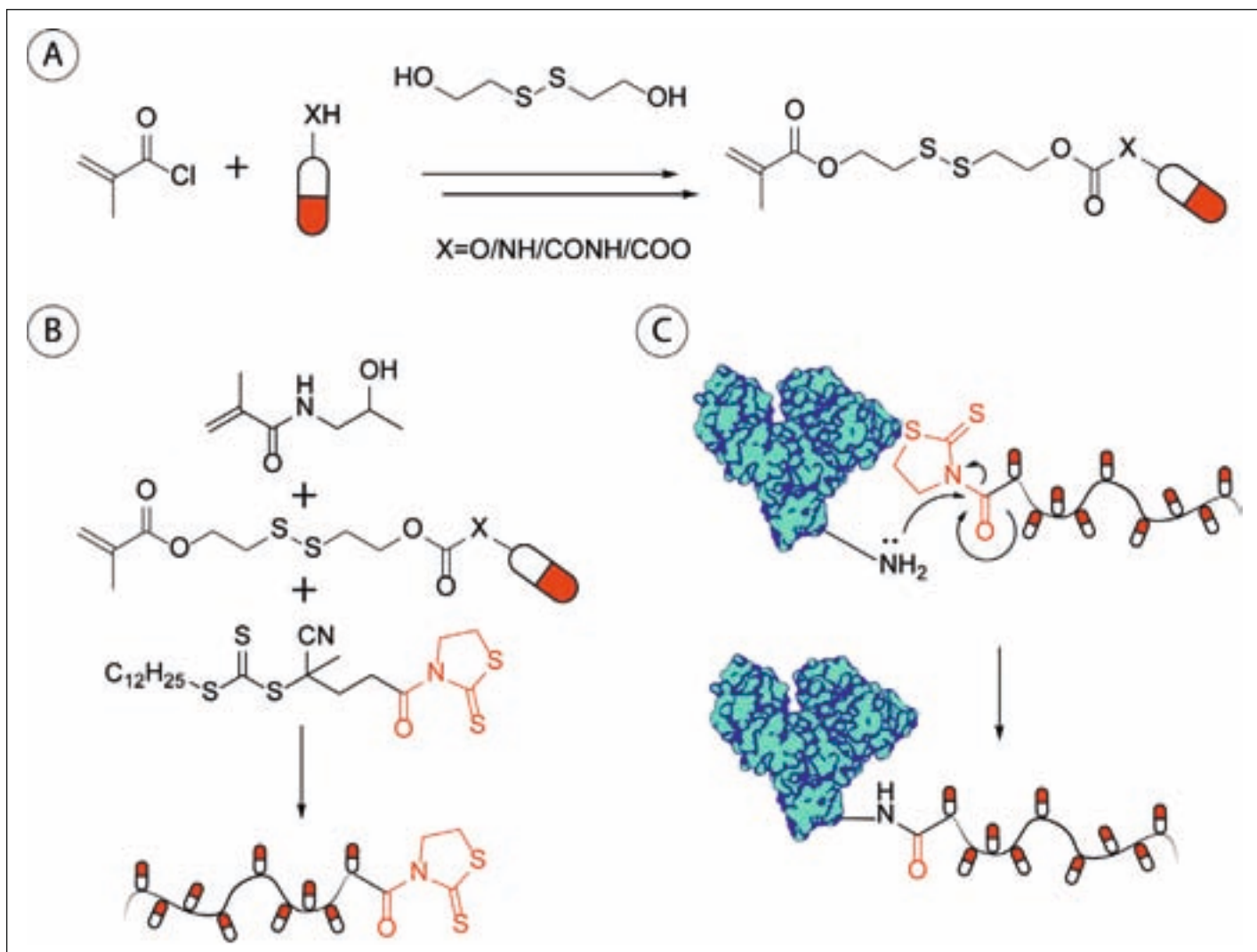
Lægemiddel-albumin-polymer-konjugaterne syntetiseres trinvist. Først syntetiseres i to-tre trin en metakrylatbaseret monomer indeholdende disulfidtriggeren og med lægemidlet for enden, figur 2A. Denne monomer anvendes i en "reversible addition-fragmentation chain transfer" (RAFT) polymerisering. Til polymeriseringen anvendes et særligt "RAFT-agent", som er det stof, hvorfra polymeren vokser, figur 2B. Det specielle RAFT-agent gør det efterfølgende muligt at binde enden af polymeren kovalent til albumin, hvorved lægemiddel-albumin-polymer-konjugatet dannes, figur 2C [5].

Forsøg *in vitro* og *in vivo* underbygger hypotesen

Konjugationen til albumin sker uden kontrol over det eksakte konjugationssite.



Figur 1. Lægemiddelfrigivelsen starter ved, at disulfidbindingen kløves af glutathion i det reductive intracellulære miljø (1), herefter sker en ringslutningsreaktion, hvor lægemidlet fungerer som den udtrædende gruppe. Resultatet bliver, at lægemidlet frigives i sin originale form uden rester fra linkeren.



Figur 2. A) Lægemidlet anvendes i en simpel tretrinssyntese sammen med billige startstoffer, i syntesen af monomeren indeholdende en disulfidbinding. B) Lægemiddelmonomeren kopolymeriseres via en RAFT-polymerisering, hvilket bevirker, at polymeren har en aktiveret endegruppe og indeholder mange kopier af lægemidlet per molekyle. C) Den aktiverede endegruppe reagerer med albumin og det endelige konjugat formes.

En åbenlys faldgrube kunne derfor være, at albumin, pga. konjugationen, mister evnen til at binde til albuminreceptoren (hFcRn). Receptoren er ansvarlig for, at

albumin bliver genanvendt, hvilket danner grund for den lange vævs- og blod-residenstid. Et forsøg blev derfor udført, hvor disse receptorer er immobiliseret på

en chip. Når receptorerne binder albumin, ændrer chippen egenskaber, hvilket kan detekteres, og receptorens affinitet for konjugatet kan bestemmes. Det ob-

NYHED
Laboratorieglass-
udstyr fra GLASSCO

SPAR 15%
Brug koden:
GLASSCO15

Tilbuddet er gældende frem til 31.07.2018

DRIFTON
THE SCIENCE OF DISPENSING

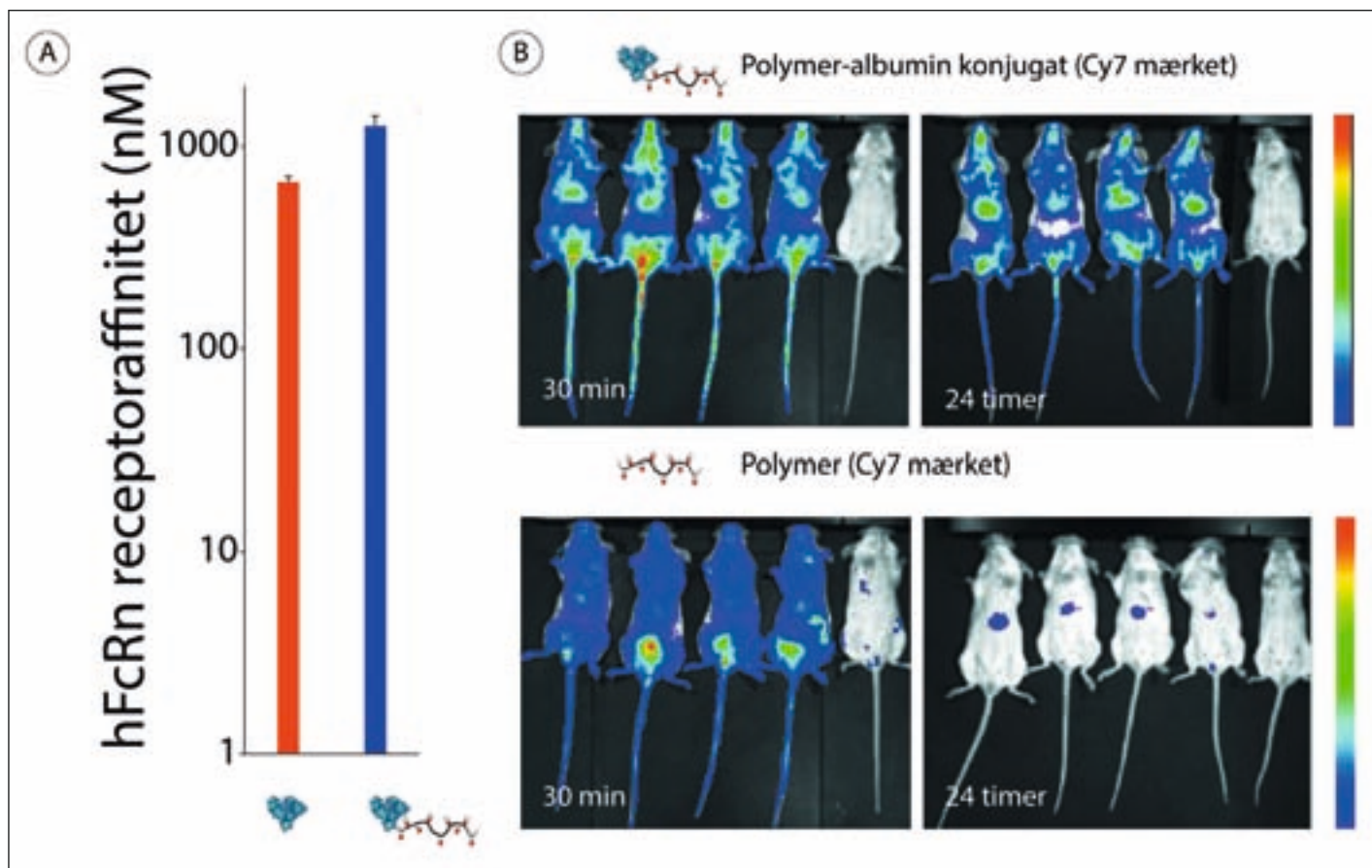
HAR DU BRUG FOR PRÆCIS DOSERING?

DRIFTON TILBYDER ET STORT UDVALG AF PUMPER OG LABORATORIEUDSTYR TIL ATTRAKTIVE PRISER

KONTAKT OS, HVIS DU HAR SPØRGSMÅL ELLER BRUG FOR VEJLEDNING TIL DEN RETTE LØSNING

info@drifton.dk
Telefon 3679 0000

Se udvalget på webshoppen www.drifton.dk



Figur 3. A) Affiniteten af polymer-albumin-konjugatet til hFcRn-receptoren er tilnærmelsesvist uændret sammenlignet med affiniteten af fri albumin, hvilket gør det rimeligt at antage, at polymer-albumin-konjugatet kan benytte sig af de samme genanvendelsesmekanismer som albumin, hvilket resulterer i en forlænget residensid. B) Mus injiceret med hhv. polymer-albumin-konjugat og polymer (begge mærket med fluoroforen Cy7) blev undersøgt vha. en IVIS-scanner efter hhv. 30 min. og 24 timer. Det ses tydeligt, at polymeren i sig selv udskilles inden for 24 timer, hvorimod albumin-polymer-konjugatet forbliver i cirkulation og væv. Musen længst til højre i hver gruppe er kontrol og har modtaget en blank saltvandsinjektion.

serveres, at forskellen i affinitet mellem albumin og polymer-albumin-konjugat er meget lille, og man må derfor forvente, at polymer-albumin-konjugatet vil besidde de samme favorable egenskaber som albumin [5].

For at sammenligne residensiden mellem de små polymerer og de større polymer-albumin-konjugater, blev disse fremstillet mærket med fluoroforen Cy7, hvilket muliggør detektion i levende mus vha. en IVIS-scanner. Musene blev injiceret med stofferne og scannet hhv. 30 min. og 24 timer efter injektion. Det ses tydeligt på billederne, at polymeren efter 24 timer er stort set forsvundet (udskilt via urin og fæces), hvorimod polymer-albumin-konjugatet stadigvæk er til stede spredt ud i hele kroppen. Disse data bakkes desuden op af blodprøvemålinger, som ikke er medtaget her [5].

En bred platform med mange anvendelsesmuligheder

Albumin-polymer-konjugaterne er i vores forskning primært blevet anvendt med henblik på antivirale lægemidler [5,6]. Der er dog ingen indkodede be-

grænsninger i platformen, hvorfor konjugater til andre formål let kan produceres. De simple og få kemiske syntesetrin gør metoden let anvendelig, og muliggør en kombinatorisk tilgang, hvor både lægemidlet og proteinet kan udskiftes. Ved at udskifte proteinet kan man modificere receptoraaffiniteten og dermed kontrollere, hvor konjugatet optages. Ændring af lægemidlet vil gøre det muligt at benytte konjugaterne til andre sygdomme, hvor bl.a. kræft er meget oplagt. En nylig udvidelse af systemet indebærer, at der anvendes flere forskellige lægemidler i det samme konjugat. Herved opnås såkaldt kombinationsterapi, hvilket allerede er meget anvendt inden for behandling med små lægemidler. Fordelen ved konjugater til kombinationsterapi, sammenlignet med små lægemidler, er, at man kan styre ratioen af lægemidler ift. hinanden på cellulært niveau, hvorfor den bedste kombination og dermed højeste effekt kan opnås [5].

E-mail:
Alexander N. Zelikin
zelikin@chem.au.dk

Referencer

1. Duncan R, Vicent MJ. Polymer therapeutics-prospects for 21st century: The end of the beginning. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 60-70 (2013).
2. Sockolosky JT, Szoka FC. The neonatal Fc receptor, FcRn, as a target for drug delivery and therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 91, 109-124 (2015).
3. Kock A, Zuwala K, Smith AAA, Ruiz-Sanchis P, Wohl BM, Tolstrup M, et al. Disulfide reshuffling triggers the release of a thiol-free anti-HIV agent to make up fast-acting, potent macromolecular prodrugs. *Chem Comm.* 50, 14498-14500 (2014).
4. Riber Camilla F, Smith Anton AA, Zelikin Alexander N. Self-Immolative Linkers Literally Bridge Disulfide Chemistry and the Realm of Thiol-Free Drugs. *Adv. Healthc. Mater.* 4, 1887-1890 (2015).
5. Andersen AHF, Riber CF, Zuwala K, Tolstrup M, Dagnæs-Hansen F, Denton PW, et al. Long-Acting, Potent Delivery of Combination Antiretroviral Therapy. *ACS Macro Lett.* 5, 587-591 (2018).
6. Smith AAA, Zuwala K, Pilgram O, Johansen KS, Tolstrup M, Dagnæs-Hansen F, et al. Albumin-Polymer-Drug Conjugates: Long Circulating, High Payload Drug Delivery Vehicles.