

Udvikling af nyt nanomedicin-koncept med potentiale i kræftbehandling

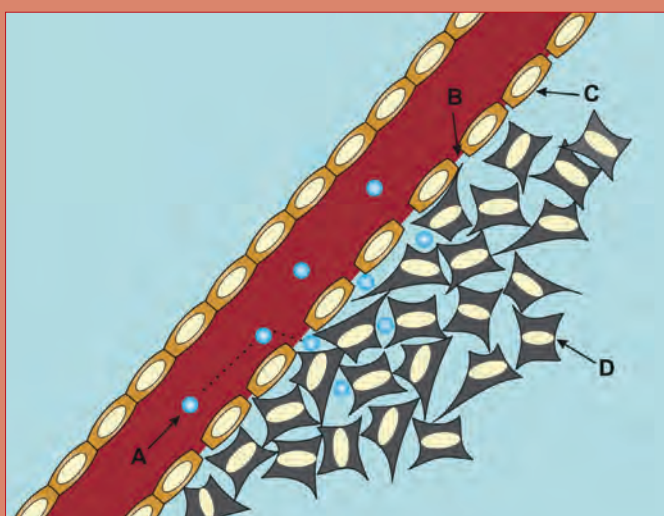
Nanopartikelsystemer er meget lovende i jagten på forbedret medicin til kræftbehandling. Et projekt støttet af Det Strategiske Forskningsråd har i de sidste 4 år fokuseret på at undersøge en ny type nanopartikelsystemer baseret på liposomer, og resultaterne er lovende.

Af Palle J. Pedersen, Mikkel S. Christensen, Fredrik Melander, Thomas L. Andresen, Robert Madsen og Mads H. Clausen, DTU Nanotech og DTU Kemi

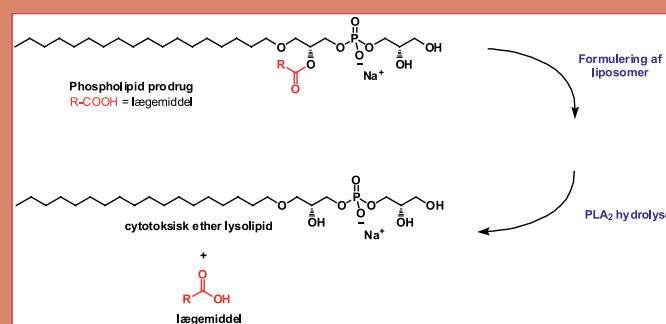
Kræft er en af de hyppigste dødsårsager i den vestlige verden og en sygdom med meget alvorlige følger for patienterne. Sygdommen behandles med kirurgi, stråleterapi og medicin, hvor den sidste type behandling kendes som kemoterapi. Til trods for at kemoterapi er under konstant udvikling og bliver bedre og bedre, er der stadig behov for nye løsninger for at forbedre effektiviteten og nedsætte de meget ubehagelige bivirkninger. Ved en typisk systemisk kemoterapi når blot 0,1% af det aktive stof frem til cancercellerne i en tumor – resten er enten uden effekt eller giver bivirkninger

ved at påvirke kroppens raske celler. Derfor er der stor fokus på at udvikle metoder, der kan øge mængden af aktivt stof, som når frem til tumorer. Anvendelsen af nanopartikler er en brugbar teknologi, da partiklerne kan akkumulere selektivt i kræftvæv. Figur 1 illustrerer denne ophobning, kaldet EPR-effekten (*Enhanced Permeability and Retention*).

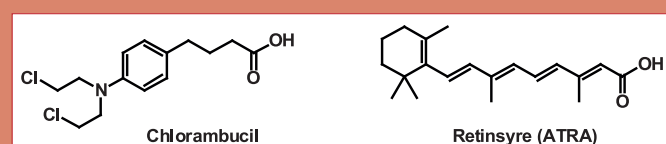
I modsætning til små lægemiddelmolekyler, der passivt kan passere over cellemembraner og få adgang til alt væv, er situationen anderledes for nanopartikler. Partikler med en diameter på 50-200 nm cirkulerer i blodbanen, indtil de kommer i kontakt med en kræftknode. Herefter kan de pga. det porøse vaskulatiske væv penetrere fra blodet til tumoren, som man finder ved cancer og inflammation. Sammen med den stærkt nedsatte lymfedræning fra cancervæv fører det til en ophobning af na-



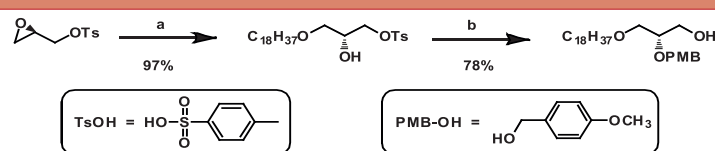
Figur 1. EPR-effekten. Liposomer (A) cirkulerer i blodet, indtil de møder porer (B) i laget af endotelceller (C) ved tumurvæv. Herved kan liposomerne trænge ud i tumurvævet og fremføre lægemidler til cancercellerne (D).



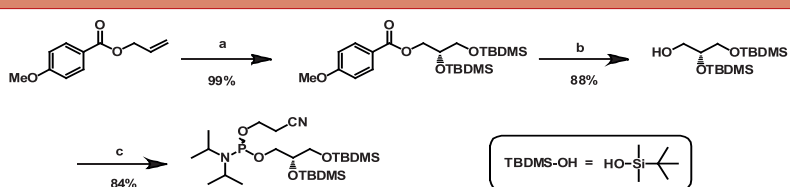
Figur 2. Konceptet for anvendelsen af PLA₂-nedbrydelige liposomer til bekæmpelse af kræft. Lægemidler koblet til fosfolipider formuleres som liposomer, der pga. EPR-effekten akkumulerer i kræftvæv. Her vil PLA₂, der forekommer i forhøjede koncentrationer i cancervæv, nedbryde fosfolipiderne og frigive det aktive stof sammen med cytotoxiske lysolipider, der i fællesskab angriber kræftvævet.



Figur 3. Struktur af lægemidlerne chlorambucil og retinsyre (ATRA).



Skema 1. Syntese af phospholipid-byggeblok.



Skema 2. Syntese af phosphoramidit til brug i phospholipid-syntese.

nopartikler i tumorer. Kliniske forsøg har vist, at nanopartikler bringer op til 5-10% af det aktive lægemiddel til cancercellerne. Det er en dramatisk forbedring.

Nanopartikelsystemer

De fleste nanopartikelsystemer til kemoterapi er baseret på indkapsling af det aktive stof i partiklerne. Dette koncept fungerer for vandopløselige stoffer, så længe man kan forhindre, at stofferne lækker fra partiklerne. Men mange lægemiddelkandidater er relativt lipofile, og for disse typer af stoffer er metoden ikke optimal.

Vi har udviklet en ny tilgang til formulering af kemoterapeutika som liposombaserede nanopartikler.

Princippet er illustreret i figur 2: Phospholipiderne syntetiseres med et lægemiddel, der er kovalent bundet til lipidstrukturen i position *sn*-2. Disse forbindelser kaldes prodrug-lipider, da de kræver en kemisk reaktion for at frigive de aktive stoffer fra phospholipiderne.

De fleste kræfttyper overudtrykker enzymet phospholipase A₂ (PLA₂), derfor sørger enzymerne i tumorer for at hydrolysere lipidene og frigiver det aktive stof. Det er en stor fordel, at lægemidlet indgår som en integreret del af dobbeltlaget i liposomerne, så der kan benyttes lipofile stoffer. Derved undgår man, at stofferne frigives for tidligt, f.eks. under transport i blodbanen.

Designet stiller nogle krav til de aktive stoffer, der indgår i phospholipiderne: De skal indeholde en carboxylsyre, så der

kan dannes en esterbinding til lipidernes *sn*-2-position; de skal være tilstrækkeligt lipofile til at danne stabile membran-dobbeltlag; og de dannede liposomer skal kunne spaltes af PLA₂-enzymet. Endelig skal stofferne være cytotoxiske, når de spaltes fra phospholipidet af enzymet.

I de senere år, har vi arbejdet med forskellige stoffer. I det følgende illustrerer vi princippet med eksemplerne chlorambucil og retinsyre (*all-trans retinoic acid*, ATRA) (figur 3).

Syntese af phospholipid-prodrugs

Med udgangspunkt i to centrale byggeblokke er der fremstillet phospholipider med chlorambucil og ATRA: Octadecylglycerol er fremstillet ud fra (*R*)-glycidyltosylat (skema 1) og et beskyttet phosphoramidit (skema 2), som udgør glyceroldelen af lipidernes hovedgruppe. Skema 3, side 24 viser fremstillingen af et phospholipid-prodrug med chlorambucil: Kobling af de to byggeblokke medieret af tetrazol fulgt af oxidation af P^{III} til P^V, oxidativ fjernelse af *p*-methoxybenzyl (PMB)-gruppen, esterficering med chlorambucil og endelig debeskyttelse af glycerolhovedgruppen, fører til det ønskede produkt.

Under arbejdet med syntesen af prodrug, som indeholder retinsyre i *sn*-2-positionen, fandt vi desværre, at fremgangsmåden til chlorambucil ikke virkede. Det skyldes, at den diimid-promoverede esterficering førte til isomerisering af C2-C3-dobbeltbindingen i ATRA-esterne (skema 4, side 24). Denne isomerisering kunne undertrykkes ved i stedet at benytte en

LUFTSTRÅLE SIGTEAPPARAT AS 200 JET

Retsch
Solutions in Milling & Sieving

- Hurtig sigtning af fint pulver
- Præcise, reproducerbare resultater
- Stort måle område fra 10 µm til 4 mm

SKANLAB

Kvinderupvej 30 · 3550 Slangerup · Tlf: 4738 1014 · www.retsch.dk

Nyhed!

Pipettecenteret

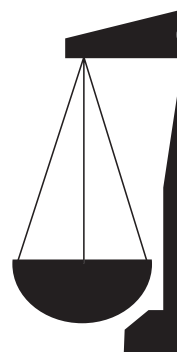
Kalibrering og service af alle fabrikater pipetter.

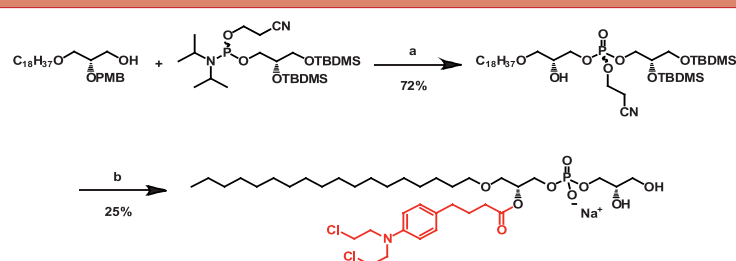
Vi kalibrerer både ved indsendelse eller på kundens adresse.

Salg af pipetter og laboratorie varer.



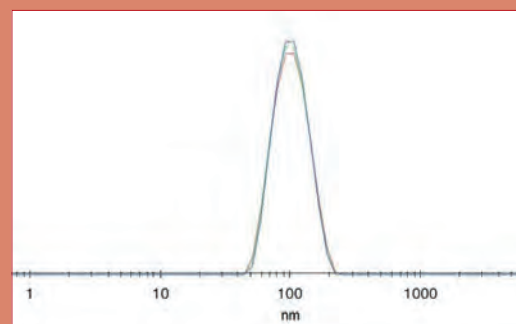
Pipettecenteret
Skovkanten 41 · 4700 Næstved
Tlf. 55 73 62 05 · Mobil 30 33 32 49
Email: nielslindgaard@stofanet.dk
www.pipettecenteret.dk



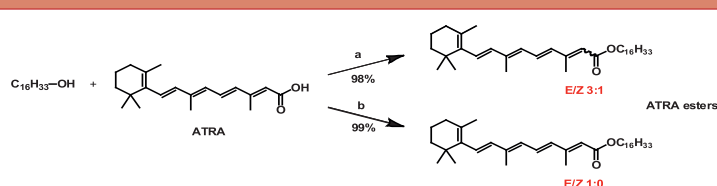


Reagenser: (a) (i) tetrazol, CH_2Cl_2 , CH_3CN ; (ii) *tert*-butylhydroperoxid; (iii) 2,3-dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzoquinon (DDQ), CH_2Cl_2 , H_2O ; (b) (i) chlorambucil, *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid hydrochlorid (EDCI-HCl), 4-(dimethylamino)pyridin, CH_2Cl_2 ; (ii) 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU), CH_2Cl_2 ; (iii) HF, CH_3CN , H_2O .

Skema 3. Syntese af chlorambucil phospholipid-prodrug.

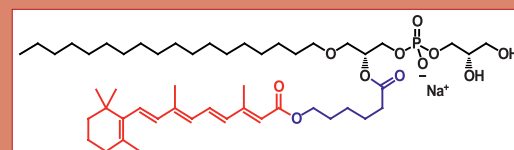


Figur 4. DLS måling ($n=3$) af partikelstørrelsen for ATRA-phospholipid prodrug. Den gennemsnitlige diameter er 96 nm.

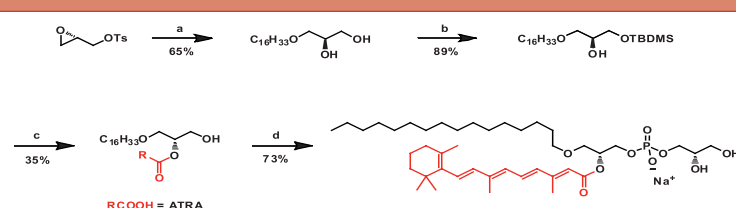


Reagenser: (a) EDCI-HCl, 4-(dimethylamino)pyridin, CH_2Cl_2 (b) diisopropylazodicarboxylat, PPh_3 , tetrahydrofuran.

Skema 4. Acylering af ATRA – carbodiimid-baserede koblingsreagenser med-førte isomerisering, hvorimod Mitsunobu-betingelser danner ATRA-estere uden isomerisering.



Figur 5. sPLA₂-nedbrydeligt phospholipid prodrug med kædeforlænget ATRA.



Reagenser: (a) (i) $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{OH}$, $\text{BF}_3 \cdot \text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, CH_2Cl_2 ; (ii) CH_3COOCs , $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, DMF; (iii) NaOCH_3 , CH_3OH ; (b) TBDMSCl, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$, 4-(dimethylamino)pyridin, DMF, CH_2Cl_2 ; (c) (i) ATRA, diisopropylazodicarboxylat, PPh_3 , tetrahydrofuran; (ii) HF, H_2O , CH_3CN ; (d) (i) phosphoramidit, tetrazol, CH_2Cl_2 , CH_3CN ; (ii) *tert*-butylhydroperoxid; (iii) DBU, CH_2Cl_2 ; (iv) HF, CH_3CN , H_2O .

Skema 5. Syntese af det første ATRA phospholipid prodrug – acyleringen med ATRA (trin c) udføres via en Mitsunobu-reaktion. Desværre viste det sig, at dette prodrug ikke kunne hydrolyseres af PLA₂.

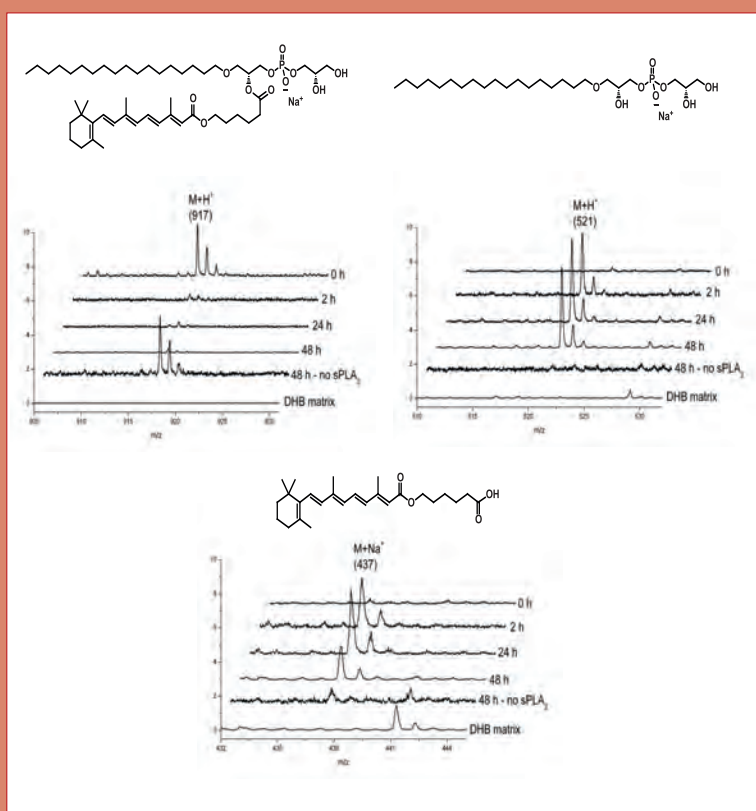
Mitsunobu-reaktion til at danne esteren (skema 4). Det blev udnyttet i syntese af ATRA-prodrug (skema 5): startende fra (S)-glycidyltosylat introduceres etherkæden, den primære alkohol beskyttes, hvorefter Mitsunobu-esterificering introducerer ATRA i *sn*-2-stillingen. Fjernelse af silylgruppen, introduktion af hovedgruppen samt de beskyttelse afslutter syntesen.

Formulering af liposomer og enzymaktivitet

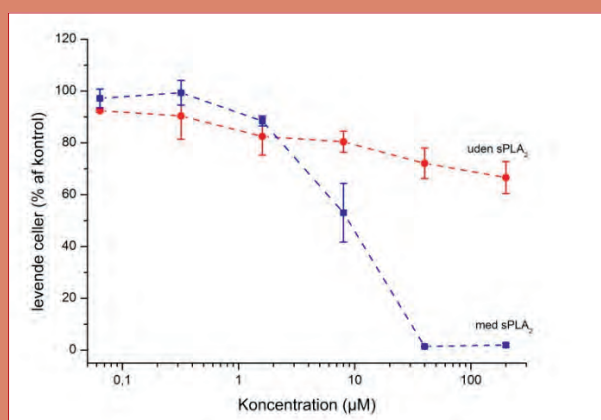
Den første test, vores prodrug-lipider skulle bestå, var om de kunne danne stabile liposomer. Der er mange muligheder for at variere formuleringen ved at iblande naturlige diacylphospholipider. Skal de kunne bruges i dyreforsøg og på sigt i kliniske forsøg, skal liposomerne have 5-10% poly-(ethylenglycol) (PEG) på overfladen. Det forlænger blodcirkulationstiden signifikant. I første omgang formulerede vi liposomer, som udelukkende bestod af prodrug-lipid. Det foregik vha. *dry lipid film*-teknik, hvor phospholipiderne blev opløst i chloroform, der langsomt blev afdampet, så der blev dannet en film af lipid i kolben. Filmen blev herefter hydreret i buffer, og blandingen blev ekstruderet gennem et 100 nm polycarbonatfilter. Processen førte til dannelsen af liposomer med et enkelt

lipid-dobbeltlag på 50-120 nm. Det blev bekræftet med dynamisk lysspredningsmålinger (figur 4).

Essentielt for drug delivery-konceptet er, at *sn*-2-esteren kan spaltes af phospholipase A₂. Det blev testet ved at inkubere de formulerede liposomer med enzymet og udtage prøver til forskellige tidspunkter, som herefter blev analyseret med MALDI-TOF-massespektrometri (se Dansk Kemi 2007, nr. 4, s. 28-32). Prodrug med chlorambucil blev hydrolyseret på under 6 timer. Det viste sig, at ATRA-prodrug ikke kunne hydrolyseres af enzymet. Det skyldes sterisk hindring fra den trisubstituerede dobbeltbinding ved esteren, hvilket er bekræftet med molekyledynamiske beregninger samt ved syntese af lignende modelstoffer. Løsningen blev, at vi forlængede ATRA med en mættet kæde med 6 carbonatomer og fremstillede det prodrug, der ses i figur 5. Kædeforlængelsen medførte mere plads omkring det aktive site i enzymet, og som det fremgår af figur 6, var dette phospholipid et meget godt substrat for PLA₂, med næsten fuld hydrolyse efter blot 2 timer. Figur 6 viser samtidig, at liposomerne er kemisk stabile, da der efter 48 timers inkubation uden enzymet ikke er sket nogen hydrolyse af prodrug.



Figur 6. Undersøgelse af sPLA₂-aktivitet på ATRA phospholipid prodrug vha. MALDI-TOF MS målinger. Enzymforsøgene er udført ved 37°C.



Figur 7. Behandling af HT-29 tyktarmskræftceller med phospholipid prodrug med kædeforlænget ATRA i fravær af sPLA₂ (—●—) og i tilstedeværelse af sPLA₂ (—■—).

Cytotoksicitet

Det er helt centralt, at prodrug-lipiderne kan medføre celledød i cancerceller ved tilstedeværelsen af PLA₂-enzymet. Det er vigtigt for selektiviteten og bivirkningsprofilen, at liposomerne ikke udviser uspecifik cytotoksicitet, dvs. at de kun er giftige ved enzymatisk hydrolyse, som frigiver de aktive stoffer. Mange kræftceller udtrykker PLA₂, hvilket er baggrunden for designet af prodrug-lipiderne.

For at få et bedre kontrolsystem har vi også valgt at teste vores liposomer på cellelinjer, som ikke udtrykker enzymet. Derved kan partiklernes evne til at medføre celledød måles, både ved fravær og tilstedeværelse af PLA₂. I figur 7 ses et eksempel på dette. Ved tilstedeværelse af PLA₂, og med en IC₅₀-værdi omkring 7 µM ses der en koncentrationsafhængig cytotoksicitet af liposomerne. Samtidig ses det, at der selv ved høje koncentrationer af liposomer i cellekulturen kun er en meget lille grad af celledød uden tilsætning af enzymet. Lignende resultater blev opnået i andre cancercellelinjer og for andre af disse systemer, inkl. prodrug-lipider med chlorambucil.

Konklusion

Dette projekt har både været spændende og udfordrende at arbejde med, og det har medført lovende resultater. Kombinationen af organisk syntese-kemi, biofysik, computermodellering og cellebiologi har været helt essentiel for at kunne afdække alle aspekter og opnå de lovende resultater.

Fremtidigt arbejde vil fokusere på yderligere raffinering af metoderne til frigivelse af kovalent bundne aktive stoffer fra denne type prodrug-lipider og dels på at teste de mest lovende systemer i dyremodeller for kræft. Det sidstnævnte er helt centralt, hvis der fremover skal skabes kræftmedicin baseret på de principper, som projektet har afdækket.

E-mail-adresse

Mads H. Clausen: mhc@kemi.dtu.dk

Kilder:

Synthesis and Biophysical Characterization of Chlorambucil Anticancer Ether Lipid Prodrugs, PJ Pedersen, MS Christensen, L Linderoth, T Ruysschaert, TL Andresen, F Melander, OG Mouritsen, R Madsen and MH Clausen, *J. Med. Chem.* 2009, 52, 3408–3415.
Liposomal Formulation of Retinoids Designed for Enzyme Triggered Release, PJ Pedersen, SK Adolph, AK Subramanian, A Aroui, TL Andresen, OG Mouritsen, R Madsen, MW Madsen, GH Peters and MH Clausen, *J. Med. Chem.* 2010, 53, 3782–3792.
Prostaglandin phospholipid conjugates with unusual biophysical and cytotoxic properties, PJ Pedersen, SK Adolph, TL Andresen, MW Madsen, R Madsen and MH Clausen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010, 20, 4456–4458.
Isomerization of all-trans retinoic acid mediated by carbodiimide activation – Synthesis of ATRA ether lipid conjugates, MS Christensen, PJ Pedersen, TL Andresen, R Madsen and MH Clausen, *Eur. J. Org. Chem.* 2010, 419–724.
Enzyme-triggered nanomedicine: Drug release strategies in cancer therapy, TL Andresen, DH Thompson and T Kaasgaard, *Mol. Membr. Biol.* 2010, 27, 353–363.

KLIMASKABE TEMPERATURSKABE

- Stabilitetstestkamre
- Temperatur ÷ 75...+ 300°C ± 0,2K
- Luftfugtighed 10...98% ± 2% r.f.
- Over 45 år med klimaskabe
- Rådgivning • Projektering • Levering

mb-teknik, ingeniørfirma a-s
brøndbytoften 8 • DK-2605 brøndby
tlf. +45 36 47 33 22 • fax +45 36 47 02 22
www.mb-teknik.dk • mb@mb-teknik.dk

