

Dendrymery domino – wielofunkcyjne, biodegradowalne cząsteczki do zastosowań w terapii onkologicznej

Domino dendrimers – polyfunctional, biodegradable molecules for application in cancer therapy

STRESZCZENIE: Opracowanie oryginalnych leków o nowej strukturze i nowym mechanizmie działania jest w obecnych czasach procesem długotrwałym. Optymalizacja struktury chemicznej oraz konieczność wszechstronnych badań przedklinicznych i klinicznych jest kosztowna nawet dla dużych firm farmaceutycznych. Z drugiej strony, efekt terapeutyczny wielu leków obecnie stosowanych jest niewystarczający z powodu ich nieefektywnego transportu do zmienionej chorobowo tkanki lub niedostatecznego w niej stężenia. Dotyczy to w znacznym stopniu leków onkologicznych, które pomimo licznych niedoskonałości (np. toksyczności w stosunku do zdrowych komórek) często ratują życie i są lekami z wyboru. Dlatego w naukach farmaceutycznych aktualnym trendem jest poszukiwanie nowych nośników dla leków już znanych, które poprawiają ich własności farmakodynamiczne, zwiększają selektywność oraz nie wywołują odpowiedzi immunologicznej. Wśród kilku grup związków makrocząsteczkowych (polimery, liposomy, nanocząsteczki, itp.) szczególnie zaawansowane są badania nad farmaceutycznymi zastosowaniami dendrymerów.

SŁOWA KLUCZOWE: dendrymery domino, spust, proleki, doxorubicyna, kamptotecyna.

SUMMARY: Development of new original drugs with new structure and new mechanism of action is at present long term process. Necessity of conducting of pre-clinical and clinical trials makes it also for pharmaceutical companies very expensive with low level of revenue. Therefore, search for new delivery vectors that increase efficacy of known anticancer drugs and improve their pharmacological profile became a very popular trend in pharmaceutical sciences.

Among several groups of macromolecular compounds improving drug delivery and drug targeting (polymers, liposomes, nanoparticles, etc.) development of dendrimers as carriers of oncological drugs is particularly advanced.

KEY WORDS: domino dendrimers, trigger, prodrug, doxorubicin, camptothecin.

Zatwierdzono do publikacji: październik 2010 r.



prof.
**ZOFIA URBANCZYK-
LIPKOWSKA**



mgr
MARTA SOWIŃSKA

Instytut Chemii Organicznej PAN, Warszawa

Dendrymery są nową klasą związków polimerycznych, charakteryzujących się rozgałęzioną strukturą. Zastosowanie do ich otrzymywania metodyki syntezy typowej dla związków małowcząsteczkowych powoduje, że w przeciwieństwie do polimerów, charakteryzują się one małym rozrzutem mas (polidispersyjność) i mają całkowicie zdefiniowaną strukturę. Daje to możliwość precyzyjne-

go planowania ich budowy a w następnym w szczególności właściwości chemicznych, fizycznych i biologicznych. Najszerzej rozpoznawanymi cechami związków dendrymerycznych jest ich poliwalentność, a więc możliwość umieszczenia w drzewie dendrymeru (kowalencyjnie) lub w jego wnętrzu (niekowalencyjnie) wielu elementów farmakoforowych. Stąd szerokie potencjalne możliwości ich zastosowań farmaceutycznych, w tym jako nowe nośniki leków [1].

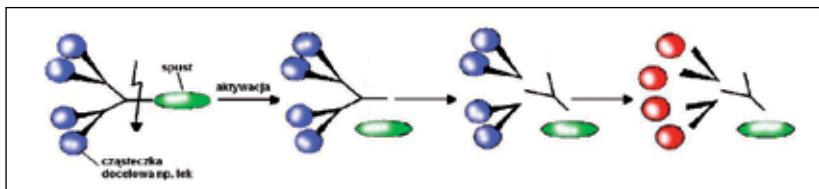
Przy projektowaniu substancji nośnikowych należy brać pod uwagę ich: * toksyczność względem zdrowych komórek * możliwość zainicjowania odpowiedzi immunologicznej * akumulację w niektórych tkankach (np. nerkach lub wątrobie) oraz * czasy retencji tkankowej. Najczęściej badane, dostępne handlowo dendrymery typu PAMAM, zakończone wieloma grupami aminowymi nawet po częściowej funkcjonalizacji przez układy farmakoforowe, są nadal cytotoksyczne i nieselektywne, i aby mogły być stosowane do konkretnych celów wymagają zaawansowanej chemicznej „obróbki”. Obiecujący wydaje się pomysł konstrukcji mniejszych dendrymerów, które po dotarciu do chorej tkanki w sposób zaprogramowany rozpadają się na cząsteczki leku oraz inne małe fragmenty eliminowane z organizmu poprzez układ moczowy.

Dendrymery domino

Niezależnie od siebie, trzy zespoły badawcze: de Groot'a [2], McGrath'a [3]

i Shabat'a [4], opisały i zsyntetyzowały nowy typ dendrymerów, które ulegają samodestrukcji po zainicjowaniu procesu rozpadu (Rys. 1). Zawierają one w swojej strukturze specyficzny spust (ang. *trigger*), który poddany działaniu odpowiedniego bodźca inicjuje łańcuchową fragmentację do niskocząsteczkowych bloków budulcowych. Opisana strategia rozkładu prowadzi nie tylko do całkowitej i szybkiej degradacji dendrymeru, ale również stanowi narzędzie do uwalniania aktywnych związków (np. leków) przyłączonych do jego peryferii.

Powyższe dendrymery znane są pod różnymi nazwami: „*cascade-release dendrimers*” [2], „*disassembled dendrimers*”



Rys. 1. Mechanizm rozpadu dendrymeru domino

[3] czy „*self-immolative dendrimers*” (SI-D's) [4]. Ponieważ proces ich rozpadu określany jest często jako efekt domino, gdzie po etapie aktywacji następuje spontaniczna reakcja łańcuchowa, nazywane są również dendrymerami domino [5].

Budowa

W syntezie dendrymerów domino jako bloki budulcowe wykorzystuje się tzw. łącznikowe układy chemiczne (ang. *chemical adaptor systems*) [6] oparte na specyficznej reaktywności pozwalającej na kontrolowaną fragmentację. Zwykle jest to cząsteczka, której fragmenty spełniają trzy funkcje. Jeden fragment to tzw. uchwyt (ang. *handle*), pełniący rolę naprowadzającą/zakotwiczącą. Drugi działa jako tzw. chemiczny czy biochemiczny spust (ang. *trigger*), którego rozpad inicjuje spontaniczne uwolnienie trzeciego fragmentu, którym jest tzw. cząsteczka docelowa (ang. *target molecule*), np. cząsteczka leku (Rys. 1).

W dendrymerach domino kluczową rolę odgrywają spusty, które w wyniku działania odpowiedniego bodźca inicjują rozpad makrocząsteczki. Spusty można podzielić na aktywowane przez czynniki chemiczne (reakcje redoks, reakcje

redukcji, światło, pH, itp.) i aktywowane przez czynniki biologiczne (tj. enzymy, przeciwciała) [7].

Dendrymery domino zsyntetyzowane przy wykorzystaniu opisanych chemicznych układów łącznikowych, służących jako bloki budulcowe, i spustów, mogą ulegać degradacji na sposób liniowy i geometryczny [3, 8, 9].

Wzmocnienie dendrytyczne [8, 9]

Rozpad geometryczny, zainicjowany przez ściśle określony bodziec (ang. *cleavage event*), prowadzi do uwolnienia wszystkich peryferyjnych i rozgałęziających fragmentów (podjednostek) dendrymeru. Połączenie tych dwóch aspek-

tów: fragmentacja dendrymeru poprzez geometryczny rozpad w wyniku pojedynczego działania bodźca i uwolnienie wysokiego lokalnego stężenia podjednostek – składają się na pojęcie, które nazwano „wzmocnieniem dendrytycznym” (ang. *dendritic amplification*). Stopień wzmocnienia zależy od generacji dendrymeru, tzn. od liczby uwalnianych podjednostek. Natomiast rodzaj wzmocnienia zależy od rodzaju uwalnianych podjednostek.

Przykłady potencjalnego wykorzystania dendrymerów domino

Większość możliwych zastosowań dendrymerów można zaklasyfikować do grupy **pasywnego wykorzystania dendrymeru**, gdzie dendrytyczna struktura i jej z natury globularna morfologia służą efektywnej pasywacji czy izolacji cząsteczkowych składników układu.

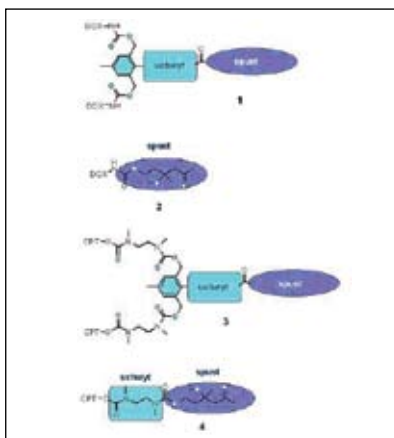
Aktywne wykorzystanie dendrymeru jest o wiele mniej powszechne. Polega ono na tym, że dendrytyczna struktura jest reaktywnym składnikiem systemu i chemiczne reakcje są „rozprzestrzeniane” wzdłuż sieci dendrytycznej [9]. Większość prac koncentruje się na zastosowaniu dendrymerów domino

w terapii celowanej, opierającej się na wykorzystaniu subtelnych różnic morfologicznych pomiędzy komórkami nowotworowymi a zdrowymi, do dostarczania leków antynowotworowych (ang. *tumor-targeted drug delivery*) bezpośrednio do komórki nowotworowej i tam selektywnie uwalnianych.

Jednym ze sposobów osiągnięcia takiej selektywności jest aktywacja proleku przez specyficzny enzym – dostarczony z zewnątrz lub wydzielany w obszarze komórek nowotworowych. Takie podejście skutkuje zminimalizowaniem niespecyficznej toksyczności.

Dobrym przykładem są tu dendrymery zaprojektowane przez De Groot'a i wsp., wykorzystane jako nośniki antynowotworowego paklitakselu (Taksolu) [2]. Zsyntetyzowali oni, stosując aminodiol jako blok budulcowy, dendrymery pierwszej i drugiej generacji, przenoszące odpowiednio dwie i cztery cząsteczki leku. Aktywacja rozpadu odbywała się poprzez redukcję grupy nitrowej do aminy w łagodnych warunkach (Zn/AcOH). Jednocześnie wykazali, że produkty degradacji dendrymeru, z wyjątkiem oczywiście paklitakselu, są nietoksyczne. Inne zalety tych związków, to np. szybka biodostępność (rozpad charakteryzujący się krótkim okresem półtrwania – 30 minut dla 1 generacji) oraz połączenie monomerów poprzez stabilne w warunkach fizjologicznych wiązania karbaminianowe. Jednakże nie ma żadnych przesłanek, że powyższe dendrymery mogą być aktywowane w warunkach fizjologicznych, a ich konstrukcja zapewnia selektywne dostarczenie leku do tkanki nowotworu. Inaczej jest w przypadku substancji zsyntetyzowanych przez zespół Shabat'a. Są to dendrymery domino przenoszące dwie cząsteczki leku: dokсорubicyny (DOX) lub kamptotecyny (CPT) [10]. Jako spust wykorzystano substrat retro-aldol/retro-Michael dla katalizacyjnego przeciwciała 38C, które, jak podaje literatura [11], posiada zdolność katalizowania sekwencji reakcji: retro-aldol/retro-Michael. Możliwość wystąpienia niespecyficznej aktywacji proleku jest minimalna ze względu na to, że reakcja retroaldolowa trzeciorzędowych aldoli nie jest katalizowana przez żaden z naturalnych enzymów. Co więcej, wykazano, że takie proleki anty-

nowotworowe dużo skuteczniej inhibują wzrost komórek nowotworowych, zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, jeśli leczenie powiązane jest z wewnątrznowotworowym wstrzyknięciem przeciwciała 38C2. Bioaktywacja dendrytycznych proleków o różnych miejscach podstawienia DOX i CPT była oszacowywana przez zespół Shabat'a na podstawie testów inhibicji wzrostu, przeprowadzanych na komórkach białaczkowych linii Molt-3 (ludzkie linie komórek limfocytów T). Po aktywacji, w wyniku działania przeciwciała 38C2, homodimeryczne, dendrytyczne proleki – 1 i 3, wykazywały efektywniejsze działanie (2-4-krotny wzrost toksyczności leku) w porównaniu do analogicznych, monomerycznych proleków 2 i 4 (Rys. 2). Warto zaznaczyć, że do aktywacji obu rodzajów proleku – dendrytycznych, jak i monomerycznych, zastosowano jednakowe stężenie przeciwciała.



Rys. 2. Struktury chemiczne dendrymerów domino 1 generacji (1, 3) i monomerycznych proleków (2, 4): DOX-NH₂ – dokсорubicyna, CPT-OH – kamptotecyna.

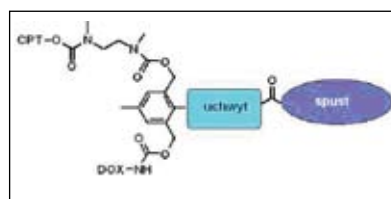
Analogiczny dendrymer domino przenoszący trzy cząsteczki kamptotecyny [12], po etapie aktywacji wykazywał ok. 5,5-krotny wzrost aktywności w porównaniu do monomerycznego proleku 4. Ponadto wykazano, że homotrimeryczny prolek powoduje 3-krotnie efektywniejszą inhibicję wzrostu komórek linii Molt-3 niż monomeryczny prolek, jeśli stosuje się stężenie przeciwciała w zakresie 15-150 nM. Innymi słowy, stężenie przeciwciała wymagane do uzyskania 50 proc. inhibicji wzrostu komórek przez trimeryczny prolek jest około trzy razy mniejsze niż jest to wymagane przez monomeryczny prolek 4.

Dwa, a nawet trzy w jednym

Dendrymery domino umożliwiają skonstruowanie proleku dostarczającego również dwa lub więcej rodzajów cząsteczek leku. Dzięki tej właściwości mogą znaleźć zastosowanie w tzw. terapii kombinowanej. To istotna zaleta, gdyż chemioterapia wielolekowa jest skuteczniejsza i mniej toksyczna niż leczenie jednym preparatem.

Heterodimeryczny prolek z antynowotworowymi lekami – dokсорubicyną i kamptotecyną (Rys. 3), został zsyntetyzowany przez Shabat'a [10]. Wykorzystał on ten sam rodzaj dendrymeru domino, którego użył do syntezy proleków homodimerycznych 1 i 3. Aktywowany heterodimeryczny prolek wykazywał aż 50-krotnie większą toksyczność względem komórek nowotworowych w porównaniu do działania mieszaniny dwóch monomerycznych proleków 2 i 4. Wynik ten sugeruje, że różne leki uwalniane z tego samego dendrymeru mogą dawać efekt synergistyczny.

Wyższe aktywności w działaniu wykazywane przez homodimeryczne proleki w porównaniu do ich monomerycznych



Rys. 3. Heterodimeryczny prolek aktywowany przez przeciwciało 38C2

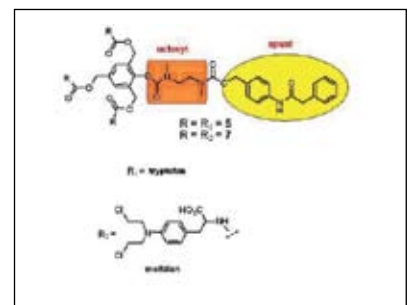
analogów autorzy wyjaśniają wzmocnieniem dendrytycznym a dokładniej liczbą rozpadów enzymatycznych wymaganych do aktywacji proleków. Do uwolnienia dwóch cząsteczek leku z proleków monomerycznych są konieczne dwa procesy rozpadu (ang. *cleavage event*), podczas gdy z proleku homodimerycznego – tylko jeden. W przypadku heterodimerycznego dendrymeru, znaczący wzrost aktywności tłumaczony jest nie tylko wzmocnieniem dendrytycznym, ale również brakiem w etapie aktywacji czynnika inhibującego. W bioaktywacji dwóch monomerycznych proleków może mieć miejsce zjawisko kompetycyjności substratów. Zgodnie z nim, jeśli jeden z proleków jest lepszym substratem niż drugi, następuje jego szybsza aktywacja.

W konsekwencji stężenie jednego uwolnionego leku jest wyższe niż drugiego, pochodzącego z proleku będącego tzw. gorszym substratem. Autorzy przypuszczają, że kompozycja leków może być dopasowywana do specyficznych typów nowotworu, a ich proporcje mogą być regulowane w etapie wbudowywania do dendrytycznego szkieletu proleku.

Naukowcy zsyntetyzowali również heterotrimeryczny prolek zawierający dokсорubicynę, kamptotecynę i etopozyd [12], w którym aktywacja przeciwciałem 38C2 prowadziła do niemalże jednoczesnego uwolnienia wszystkich leków w tym samym miejscu. Inhibicja wzrostu komórek linii Molt-3 po aktywacji proleku zwiększyła się blisko 15-krotnie.

Ten sam zespół zsyntetyzował również dwa typy dendrymerów domino aktywowanych przez amidazę penicylinową – PGA (Rys. 4) [13]. Jako spust wykorzystali oni kwas fenylooctowy w połączeniu z chemoterapeutycznym melfalanem, który ze względu na dość dużą toksyczność i wąski zakres działania jest rzadko stosowany w onkologii.

Aktywność antynowotworową *in vitro* otrzymanych proleków zbadano wobec komórek białaczkowych linii Molt-3.



Rys. 4. Struktury chemiczne dendrytycznych z tryptofanem i melfalanem (7) oraz spustem aktywowanym przez PGA.

Oba proleki przy nieobecności PGA wykazywały toksyczność względem komórek białaczki około 100-krotnie zmniejszoną w porównaniu do wolnego melfalanu. W obecności PGA cytotoksyczność jednego proleku nieznacznie wzrosła ($IC_{50} = 6$ i $0.3 \mu M$ odpowiednio dla proleku i melfalanu). W przypadku drugiego proleku cytotoksyczność, po aktywacji PGA, była prawie taka sama jak obserwowana dla wolnego melfalanu ($IC_{50} = 0.5$ i $0.3 \mu M$ odpowiednio dla proleku i melfalanu).

Podobne dendrytyczne proleki ze spustami, które są aktywowane przez specyficzne endogenne, nowotworowe enzymy, mogą być zastosowane w selektywnej chemioterapii. Jako przykład Shabat podaje legumainę, niedawno zidentyfikowaną lizosomalną proteazę, która może być obiecującym celem w terapii przeciwnowotworowej, której nadekspresja występuje w wielu ludzkich stałych nowotworach.

Wszystkie opisane dotychczas dendrymery domino zawierały w swojej strukturze pojedynczy spust, który aktywowany odpowiednim bodźcem, inicjował rozpad dendrymeru i w konsekwencji uwolnienie aktywnych cząsteczek leku. Możliwe jest również wbudowanie do dendrymerów domino kilku spustów.

Spusty logiczne

Shabat zsyntetyzował prolek z tzw. cząsteczkowym, logicznym spustem „OR” (ang. *molecular „OR” logic trigger*), zawierający łącznik złożony z dwóch spustów, które mogą być włączane przez różne mechanizmy [14]. Rolę łącznika pełniła dietylenotriamina, która poprzez aminę drugorzędową łączyła się z cząsteczką leku antynowotworowego – doksorubicyną, natomiast przez dwie aminy pierwszorzędowe – z dwoma enzymatycznymi substratami. Jednym był kwas fenylooctowy – substrat dla PGA, drugim – substrat retro-aldol/retro-Michael, usuwany przez przeciwciało katalityczne 38C2. Enzymatyczna aktywacja jednego ze spustów, bądź obu, prowadziła do rozpadu proleku i uwolnienia cząsteczki leku, którego aktywność antynowotworową przebadano przeciw komórkom limfocytów T linii Molt-3 i komórkom białaczki erytroblastycznej linii HEL-a. Okazało się, że aktywacja proleku zarówno przez PGA, jak i przeciwciało 38C2, prowadziła do inhibicji wzrostu komórek z wartościami IC_{50} bliskimi wartości wykazywanej przez wolną doksorubicynę.

Autorzy wskazują, że proleki z cząsteczkowym logicznym spustem „OR” mogą celować w dwie odmienne tkanki nowotworowe, różniące się rodzajem enzymu wydzielanego w ich obszarze (ang. *dual-prodrug monotherapy*), a tym samym dwoma sposobami aktywacji. Mogą więc być zastosowane w warunkach, gdzie

w różnych obszarach nowotworu obecne są dwa enzymy o podwyższonym stężeniu. Ponadto proleki z cząsteczkowym logicznym spustem „OR” mogą służyć jako efektywne narzędzie do oszacowywania katalitycznej aktywności enzymów. Prolek przedstawiony przez Shabat'a umożliwił porównanie aktywności pomiędzy PGA a przeciwciałem 38C2. Okazało się, że PGA wykazuje około 50-krotnie większą aktywność w inhibicji wzrostu komórek linii HEL, jak i linii Molt-3, niż przeciwciało 38C2.

Zalety dendrymerów domino jako nośników leku

Szybsze i efektywniejsze działanie oraz nietoksyczność

Dendrymery domino zawierają spust, pośredniczący w uwalnianiu wszystkich bioaktywnych jednostek w jednym etapie i fragmentację cząsteczki nośnika. W ten sposób eliminuje się toksyczność makrocząsteczkowego dendrymerowego nośnika i zapewnia wysokie, lokalne stężenie uwalnianego leku.

Selektywność

Poprzez wbudowanie do dendrymeru odpowiedniego spustu wrażliwego na działanie konkretnego bodźca, możliwe jest jego nacelowanie na specyficzny typ komórek. Odpowiednim spustem może być np. specyficzny, peptydowy substrat dla enzymu związanego z chorobą (ang. *specific peptide substrate for a disease-associated enzyme*) lub przeciwciało.

Redukcja efektów ubocznych

Lokalne wydzielanie leku zapewnia jego odpowiednie stężenie w chorych tkankach przy jednocześnie bardzo niskiej dawce systemowej, co praktycznie niweluje ryzyko występowania działań niepożądanych.

Możliwość zastosowania w terapii kombinowanej

W celu osiągnięcia efektu synergistycznego, do dendrymeru domino mogą być jednocześnie przyłączane różne leki.

Mniejsza wymagana ilość czynnika przetwarzającego prolek w jego formę aktywną

W przeciwieństwie do innych dendrytycznych antynowotworowych proleków opisanych do tej pory, zaprojektowanych dla selektywnej aktywacji przez specyficzny enzym wydzielany w obszarze no-

wotworu, ilość uwalnianego leku w docelowej tkance, zależy tylko od stężenia tego enzymu.

Dendrytyczne proleki aktywowane poprzez enzymatyczną reakcję katalityczną lepiej inhibują wzrost nowotworu w porównaniu do monomerycznych proleków, zwłaszcza jeśli celowany czy wydzielany enzym (ang. *tumor-associated or targeted enzyme*) występuje na stosunkowo niskim poziomie w tkance zmutowanej nowotworowo.

EPR

Dendrymery domino o odpowiednim rozmiarze, podobnie jak inne dendrymery, mogą być transportowane pasywnie dzięki efektowi zwiększonej przepuszczalności błony komórkowej nowotworu i retencji w tkance (EPR).

Zofia Urbanczyk-Lipkowska,
ocryst@icho.edu.pl
Marta Sowińska,
martas@icho.edu.pl

Piśmiennictwo:

1. P. Polcyn, J. Janiszewska, Z. Urbanczyk-Lipkowska: Syntheses, methods of identification and selected medical applications of dendrimers. *Polimery*. **2009**, 54, 407-416.
2. F. M. H. de Groot, C. Albrecht, R. Koekkoek, P. H. Beusker, H. W. Scheeren: „Cascade-release dendrimers” liberate all end groups upon a single triggering event in the dendritic core.” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4490-4494.
3. S. Li, M. L. Szalai, R. M. Kevitch, D. V. McGrath: „Dendrimer disassembly by benzyl ether depolymerization.” *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 10516-10517.
4. R. J. Amir, N. Pessah, M. Shamis, D. Shabat: „Self-immolative dendrimers.” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4494-4499.
5. R. J. Amir, D. Shabat: „Domino dendrimers.” *Adv. Polym. Sci.* **2006**, 192, 59-93.
6. D. Shabat, R. J. Amir, A. Gopin, N. Pessah, M. Shamis: „Chemical adaptor systems.” *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 2626-2634.
7. M. Gingras, J.-M. Raimundo, Y. M. Chabre: „Cleavable dendrimers.” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 1010-1017.
8. M. L. Szalai, R. M. Kevitch, D. V. McGrath: „Geometric disassembly of dendrimers: dendritic amplification.” *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 15688-15689.
9. D. V. McGrath: „Dendrimer disassembly as a new paradigm for the application of dendritic structures.” *Mol. Pharm.* **2005**, 2, 253-263.
10. M. Shamis, H. N. Lode, D. Shabat: „Bioactivation of self-immolative dendritic prodrugs by catalytic antibody 38C2.” *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1726-1731.
11. D. A. Evans: „Modern aldol reactions.” *VCH*, **2004**.
12. K. Haba, M. Popkov, M. Shamis, R. A. Lerner, C. F. Barbas III, D. Shabat: „Single-triggered trimeric prodrugs.” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 716-720.
13. A. Sagi, E. Segal, R. Satchi-Fainaro, D. Shabat: „Remarkable drug-release enhancement with an elimination-based AB₂ self-immolative dendritic amplifier.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, 15, 3720-3727.
14. R. J. Amir, M. Popkov, R. A. Lerner, C. F. Barbas III, D. Shabat: „Prodrug activation gated by a molecular “OR” logic trigger.” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 4378-4381.