

# Dual-Responsive Boronat-vernetzte Micellen für den Wirkstofftransport\*\*

Weixuan Chen, Yunfeng Cheng und Binghe Wang\*

Bor · FRET · Micellen · Nanotechnologie · Wirkstofftransport

In den letzten Jahren wurden große Anstrengungen zur Entwicklung stimuliresponsiver Wirkstofftransportsysteme unternommen, die ihren Wirkstoff auf spezifische zelluläre Signale hin kontrolliert freisetzen.<sup>[1]</sup> Hintergrund ist die Notwendigkeit zur Verbesserung der Spezifitäten und Bioverfügbarkeiten therapeutischer Wirkstoffe, der Verringerung der Zytotoxizität von Wirkstoffen und der Überwindung von Wirkstoffresistenzen. Polymere Micellen haben eine besonders große Aufmerksamkeit erfahren, da sie über viele der gewünschten Eigenschaften von Wirkstofftransportern verfügen.<sup>[2]</sup> Micellen können eine breite Vielfalt von Wirkstoffmolekülen mit hoher Beladungskapazität aufnehmen. Der Effekt der verstärkten Permeation und Retention (EPR) kann für ihre bevorzugte Anreicherung am Zielort sorgen,<sup>[3]</sup> wo sie ihre Fracht als Reaktion auf biologische Stimuli wie pH,<sup>[4]</sup> Temperatur,<sup>[5]</sup> Redoxreaktionen<sup>[6]</sup> und Enzyme<sup>[7]</sup> freisetzen. Bei allen Fortschritten auf dem Gebiet gibt es noch immer große praktische Probleme, z.B. vorzeitige Wirkstofffreisetzung und Wirkstoffverluste bei der Speicherung durch Dissoziation der Micellen. Die starke Schubspannung im Blutkreislauf verursacht ebenfalls Probleme für die Stabilität der Micellen.<sup>[8]</sup> Aus diesen Gründen ist die Entwicklung von vernetzten Micellen mit verbesserter Stabilität und Zirkulationszeit von großem Interesse. Andererseits jedoch könnten vernetzte Micellen mit ihrer erhöhten Stabilität Schwierigkeiten bei der Freisetzung verursachen. Eine mögliche Lösung ist die Verwendung von reversiblen vernetzten Micellen, deren Verknüpfungen auf geeignete Stimuli hin aufbrechen. Bemerkenswerte Fortschritte wurden bei der Entwicklung von stimuliresponsiven vernetzten Micellen (SCMs) erzielt, darunter pH-spaltbare,<sup>[9]</sup> Disulfidbrücken enthaltende<sup>[6b]</sup> und hydrolysierbare Esterbindungen enthaltende<sup>[2a]</sup> SCMs. Noch vielversprechender sind auf multiple Stimuli reagierende SCMs, wie sie kürzlich für die präzise

räumlich-zeitlich kontrollierte Freisetzung in vivo beschrieben wurden.<sup>[10]</sup>

Auf der Grundlage früher beschriebener Telodendrimer-systeme für den effizienten Transport von Tumortheraeutika entwickelten Lam und Mitarbeiter eine andere Klasse von SCM-Nanoträgern, die als dual-responsive Boronat-vernetzte Micellen (BCM) bezeichnet werden.<sup>[11]</sup> Die zentrale Hypothese ist, dass die Micellen die Stabilität vernetzter Systeme beibehalten, sodass die vorzeitige Freisetzung unter physiologischen Bedingungen minimiert wird, indem sie die reversible Boronsäure/Catechol-Komplexierung zum Aufbau des als Kern-Schale-Polymer vorliegenden SCM nutzen. Der verkapselte Wirkstoff kann bei niedrigen pH-Werten oder durch Zuführung exogener konkurrierender Dirole selektiv an den Zielorten freigesetzt werden (Abbildung 1). Diese Studie demonstriert klar, welches Potenzial die Verwendung von Boronsäure-Diol-Wechselwirkungen zum Aufbau von SCMs hat und wird sicher zusätzliche Forschungen in diesem Gebiet anstoßen.

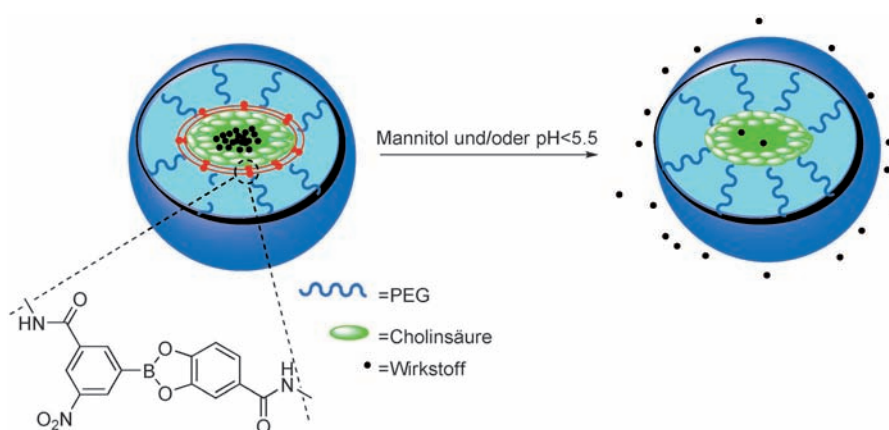
Im speziellen Fall wurde ein Paar von vernetzbaren Telodendrimeren, PEG<sup>5k</sup>-NBA<sub>n</sub>/BA<sub>n</sub>-CA<sub>8</sub> und PEG<sup>5k</sup>-Catechol<sub>n</sub>-CA<sub>8</sub>, gezielt entworfen und synthetisiert (PEG = Polyethylenglycol, CA = Cholsäure, NBA = Nitroboronsäure, BA = Boronsäure; *n* = 2 oder 4). PEG<sup>5k</sup>-CA<sub>8</sub> wurde ebenfalls synthetisiert, um nicht vernetzte Micellen (NCMs) als Kontrolle herzustellen. Die Bildung von BCMs gelang durch Lösungsmittelverdampfung und wurde mithilfe der von Wang und Mitarbeitern entwickelten Alizarinrot-Methode zum Nachweis von Boronsäurevernetzungen verifiziert.<sup>[12]</sup>

Als nächstes wurden die physikalischen Eigenschaften einer Serie von BCMs aus Boronsäure- und Catechol-Telodendrimeren ermittelt. Die BCMs hatten ähnliche Größen (rund 20 nm mit enger Größenverteilung) und sehr viel niedrigere kritische Micellkonzentrationen (CMC = 50 µg mL<sup>-1</sup>) als die NCM-Kontrolle (4–10 µg mL<sup>-1</sup>).<sup>[11]</sup> Des Weiteren wurden die Stabilitäten der BCMs gegenüber Plasmaproteinen und micellsplattendenden Bedingungen untersucht. BCM4, das aus dem Telodendrimerpaar PEG<sup>5k</sup>-Catechol<sub>4</sub>-CA<sub>8</sub> (**1**) und PEG<sup>5k</sup>-NBA<sub>4</sub>-CA<sub>8</sub> (**2**; Abbildung 2) hergestellt wurde, erwies sich als der beste Kandidat für weiterführende Wirkstofftransportstudien. BCM4 zeigte keine nennenswerte Änderung der Teilchengröße, wenn es für 24 h 50-proz. (v/v) menschlichem Blutplasma ausgesetzt wurde. Selbst nach 2-tägiger Einwirkung von 2.5 mg mL<sup>-1</sup> Natriumdodecylsulfat(SDS)-Lösung wies BCM4 nur geringe Ände-

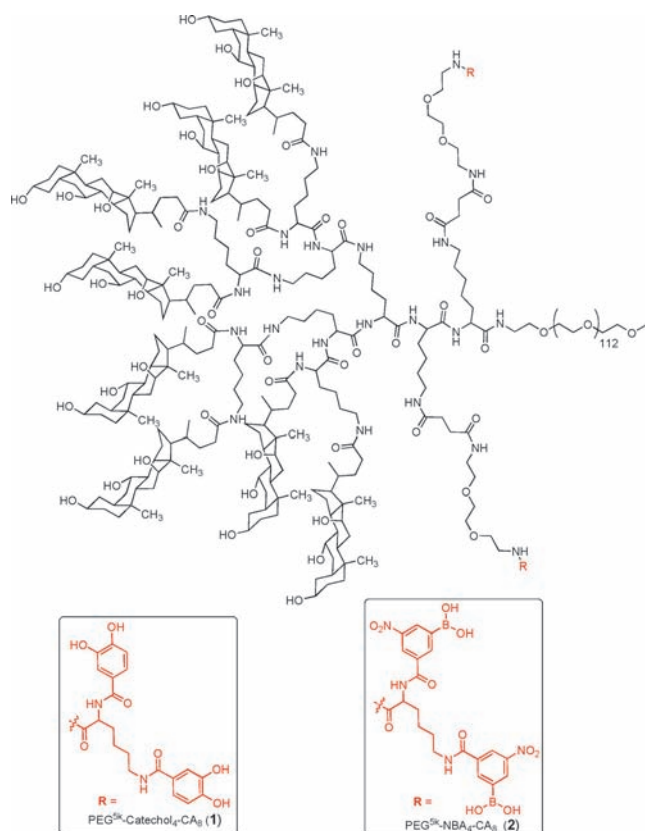
[\*] W. Chen, Dr. Y. Cheng, Prof. Dr. B. Wang

Department of Chemistry, Center for Biotechnology and Drug Design, and Center for Diagnostics and Therapeutics Georgia State University, Atlanta, GA 30302-4098 (USA)  
E-Mail: wang@gsu.edu  
Homepage: [http://chemistry.gsu.edu/Groups/Bing\\_Wang/default.html](http://chemistry.gsu.edu/Groups/Bing_Wang/default.html)

[\*\*] Wir danken den National Institutes of Health (GM086925 und GM084933) und dem GSU Molecular Basis of Disease program für Unterstützung unserer Arbeiten.



**Abbildung 1.** Aufbau der Boronat-vernetzten Micellen und deren Zersetzung in Gegenwart von Mannitol oder bei niedrigen pH-Werten.



**Abbildung 2.** Struktur des Telodendrimerpaares [PEG<sup>Sk</sup>-(Nitroboronsäure/Catechol)<sub>4</sub>-CA<sub>8</sub>].

rungen der Teilchengröße auf. Erwartungsgemäß sank die Stabilität aber stark, wenn der pH-Wert von 7.4 auf 5.0 gesenkt wurde oder wenn 100 mM Mannitol zugegeben wurden (Mannitol ist ein zugelassener Diurese-Wirkstoff, der bei empfohlener Dosis hohe Blutspiegel von > 50 mM erreicht). Ermutigt durch die vorläufigen Ergebnisse wurde das Freisetzungsprofil für Paclitaxel (PTX) als Modellwirkstoff ermittelt. BCM4 setzte PTX deutlich langsamer frei als das Kontrollsystem (NCM), was die Stabilität des BCM belegte. Dagegen war die Freisetzung aus BCM4 stark beschleunigt,

wenn 100 mM Mannitol zugegeben oder der pH-Wert auf 5.0 gesenkt wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden im MTT-Test gegen SKOV-3-Eierstockkrebszellen *in vitro* erhalten. Es wurde gefunden, dass PTX-BCM4 bei gleichen Dosierungen nahezu zweimal weniger zytotoxisch war als Taxol (der freie Wirkstoff von PTX) und PTX-NCM, und dass die Zytotoxizität bei pH 5.0 in der Gegenwart von Mannitol (100 mM) gesteigert war.

Unter Verwendung eines FRET-Systems aus dem grünen Farbstoff DiO als Donor und dem roten Rhodamin B als Akzeptor wurden Stabilitätstest *in vivo* durchgeführt (FRET = resonanter Fluoreszenzenergietransfer). DiO wurde im Inneren der Micellen eingesperrt, sodass es den Wirkstoff nachahmt, und Rhodamin B wurde kovalent an die Telodendrimer gebunden. Bei intakten Micellen führt die Anregung von DiO zur Fluoreszenzemission des Rhodamin B. Die Fluoreszenzintensität von Rhodamin B ist somit ein Indikator für die Stabilität der Micellen. Die FRET-BCM4- und FRET-NCM-Micellen wurden jeweils intravenös Nacktmäusen injiziert. Dann wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Blutproben genommen, und das FRET-Verhältnis ( $I_{\text{Rhodamin B}} / (I_{\text{Rhodamin B}} + I_{\text{DiO}})$ ) wurde als Maß für die Integrität der Micellen verwendet. Die Ergebnisse zeigten klar, dass das FRET-Verhältnis von FRET-BCM4 sehr viel langsamer sank als das von FRET-NCM, was beweist, dass FRET-BCM4 stabiler ist als FRET-NCM.

Des Weiteren wurden kinetische Studien der Blutauswaschung der Micellen mit Rhodamin-B-NCM und Rhodamin-B-BCM4 durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität von Rhodamin-B-BCM4 war 10 h nach der Injektion sechsmal höher als die von Rhodamin-NCM. Die lange nachweisbare (24 h) Fluoreszenz des BCM4 belegt dessen lange Blutzirkulationszeit.

Fluoreszenzbilder von Mausmodellen entnommenen Organen ließen schließlich die bevorzugte Aufnahme von mit DiO und PTX beladenem BCM4 im SKOV-3-Eierstocktumor erkennen. Allerdings kommt es auch zu einer sichtbaren Freisetzung in der Leber.

Zusammengefasst hat die von Lam und Mitarbeitern beschriebene Strategie klar aufgezeigt, welches Potenzial die Nutzung der Boronsäure-Diol-Wechselwirkung zum Aufbau

von dual-responsiven, vernetzten Micellen mit verbesserter Stabilität und schneller Freisetzung als Antwort auf pH-Ab-senkung und Diol-Zusatz hat. Bevor dieses vielversprechende System in den klinischen Gebrauch übertragen werden kann, bleibt aber noch viel zu tun. Beispielsweise muss die Anti-tumorwirkung im Tiermodell nachgewiesen werden. Die Arbeit von Lam und Mitarbeitern eröffnet neue Möglichkeiten für den Entwurf von stimuliresponsiven Wirkstofftransport-systemen. So weiß man, dass Boronsäure-Catechol-Komplexe empfindlich auf oxidierende Reagentien wie  $H_2O_2$  reagieren, was eine Möglichkeit für die Verwendung von BCMs als Nanoträger zur oxidationsinitiierten Wirkstofffreisetzung in oxidativen Mikroumgebungen aufzeigt. Allerdings ist die Empfindlichkeit des Boronatsystems gegenüber oxidativen Bedingungen ein zweischneidiges Schwert und könnte uner-wünschte Effekte auf die Stabilität der Micellen und den Ort oder die Geschwindigkeit der Freisetzung in vivo haben.<sup>[13]</sup> Eine Kombination anderer redoxempfindlicher Gruppen, wie z.B. Disulfidgruppen, an Telodendrimeren könnte zu ver-besserten Spezifitäten im gezielten Wirkstofftransport füh-ren, da feste Tumoren tendenziell niedrige pH-Werte und eine reduzierende Mikroumgebung haben.

Eingegangen am 13. Februar 2012

Online veröffentlicht am 18. April 2012

- [1] a) S. Ganta, H. Devalapally, A. Shahiwala, M. Amiji, *J. Con-trolled Release* **2008**, *126*, 187–204; b) E. S. Lee, Z. Gao, Y. H. Bae, *J. Controlled Release* **2008**, *132*, 164–170; c) V. Torchilin, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, *58*, 1532–1555.

- [2] a) C. J. Rijcken, C. J. Snel, R. M. Schiffelers, C. F. van Nostrum, W. E. Hennink, *Biomaterials* **2007**, *28*, 5581–5593; b) Y. Bae, K. Kataoka, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 768–784.  
[3] a) H. Maeda, L. W. Seymour, Y. Miyamoto, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 351–362; b) R. K. Jain, *J. Controlled Release* **2001**, *74*, 7–25.  
[4] a) E. S. Lee, K. Na, Y. H. Bae, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 325–329; b) Y. Bae, N. Nishiyama, K. Kataoka, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1131–1139.  
[5] a) Y. Li, S. Pan, W. Zhang, Z. Du, *Nanotechnology* **2009**, *20*, 065104; b) S.-W. Choi, Y. Zhang, Y. Xia, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 8076–8080; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7904–7908.  
[6] a) R. A. Petros, P. A. Ropp, J. M. DeSimone, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5008–5009; b) M. Talelli, M. Iman, A. K. Varkouhi, C. J. F. Rijcken, R. M. Schiffelers, T. Etrych, K. Ulbrich, C. F. van Nostrum, T. Lammers, G. Storm, W. E. Hennink, *Biomate-rials* **2010**, *31*, 7797–7804.  
[7] B. Law, C.-H. Tung, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1683–1695.  
[8] J. Dai, S. Lin, D. Cheng, S. Zou, X. Shuai, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 9576–9580; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9404–9408.  
[9] K. Zhou, Y. Wang, X. Huang, K. Luby-Phelps, B. D. Sumer, J. Gao, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 6233–6238; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6109–6114.  
[10] a) N. Ma, Y. Li, H. Xu, Z. Wang, X. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 442–443; b) E. S. Olson, T. Jiang, T. A. Aguilera, Q. T. Nguyen, L. G. Ellies, M. Scadeng, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 4311–4316; c) C. Wei, J. Guo, C. Wang, *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 451–455.  
[11] Y. Li, W. Xiao, K. Xiao, L. Berti, J. Luo, H. P. Tseng, G. Fung, K. S. Lam, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 2918–2923; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2864–2869.  
[12] G. Springsteen, B. Wang, *Chem. Commun.* **2001**, 1608–1609.  
[13] S. G. Rhee, *Science* **2006**, *312*, 1882–1883.

## Wir stellen aus...

### Reaktionssysteme für das Labor

- Labor-Reaktoren u. -Druckbehälter 25ml bis 20 Lit.
- Multi-Reaktions-Systeme 6 x 70 oder 45 ml
- Parallelanlagen und Strömungsreaktoren
- Hochdruck- und Hochtemperatur-Anlagen
- zehn Metalle verfügbar oder Glas
- auch kundenspezifisches Engineering



**Parr Instrument – Ihr Partner wenn es um Druckreaktionen geht.**

**ACHEMA 2012** Halle 4.1  
Stand F 53-59

Kalorimeter Reaktoren Druckbehälter Aufschluss-Systeme



**Parr Instrument (Deutschland) GmbH**  
Zeilweg 15 · D - 60439 Frankfurt a. M.  
Tel. 069 / 951 07 951 · Fax 069 / 5 87 03 00

info@parrinst.de · www.parrinst.de