

Wohldefinierte polymere Paclitaxel-Prodrugs über eine Grafting-From-Methode ausgehend vom Arzneistoff

Benoit Louage, Lutz Nuhn, Martijn D. P. Risseuw, Nane Vanparijs, Ruben De Coen, Izet Karalic, Serge Van Calenbergh und Bruno G. De Geest*

Abstract: Ein polymeres Prodrug-Konzept für das Chemotherapeutikum Paclitaxel (PTX) basierend auf einer Grafting-From-Methode ausgehend vom Arzneistoff wird vorgestellt. Ein Kettentransferreagenz für die reversible Additions-Fragmentierungs-Kettentransferpolymerization (RAFT) wurde mit hoher Ausbeute und Regioselektivität an die für seine Bioaktivität entscheidende C2'-Position von Paclitaxel angebunden. Nach anschließender RAFT-Polymerization mit einem hydrophilen Monomer konnten wohldefinierte Paclitaxel-Polymer-Konjugate erhalten werden, die eine hohe Wirkstoffbeladung, Wasserlöslichkeit und Stabilität aufweisen. Die Vielseitigkeit der Methode konnte weiterhin durch ω -Endgruppenmodifizierung des Polymers mit einem Fluoreszenzmarker demonstriert werden. In In-vitro-Experimenten wurden diese Konjugate bereitwillig von Zellen in deren Endosome aufgenommen, von wo aus das native PTX ergiebig freigesetzt wurde und an seine subzellulären Wirkorte gelangte. Dies konnte über das Zytotoxizitätsprofil des Konjugats bestätigt werden, da es mit den kommerziellen PTX-Formulierungen übereinstimmt, die nur auf einfachen physikalischen Verkap-selungen beruhen.

Krebs bleibt weiterhin eine der häufigsten Todesursachen. Aufgrund der Vielzahl an Nebenwirkungen, die durch Chemotherapeutika hervorgerufen werden, bedarf es der Entwicklung neuartiger und effizienter Formulierungsstrategien für solche Arzneistoffe. Paclitaxel (PTX) zählt zu den potentesten und am häufigsten angewendeten Wirkstoffen in der Krebstherapie. Durch seine hohe Affinität zu Tubulin stabilisiert es die Mikrotubuli in den Zellen und verhindert deren Depolymerisierung. Dadurch werden sich teilende Zellen in die G2/M-Phase gezwungen, die zum kontrollierten Zelltod (Apoptose) führen kann.^[1] PTX allein besitzt jedoch nur eine geringe Wasserlöslichkeit. Seine erste klinisch zugelassene Formulierung Taxol enthält dafür Cremophor EL, ein Tensid, das selbst wiederum für eine Vielzahl an Nebenwirkung verantwortlich ist. Seither haben sich umfangreiche

Studien damit beschäftigt, alternative nanopartikuläre Formulierungsstrategien für PTX auf der Basis nicht-toxischer Tenside zu entwickeln. Darunter sind inzwischen Formulierungen mit Albumin (z.B. Abraxane) oder amphiphilen Blockcopolymeren (z.B. Genexol-PM) kommerziell erhältlich.^[2–5] Ihnen werden geringere Nebenwirkungen zugeschrieben, und sie erlauben eine Verabreichung höherer PTX-Dosierungen.^[6,7] Obwohl diese Formulierungen als nanopartikulär eingestuft sind, weisen beide in der Pharmakokinetik des Wirkstoffs keine signifikanten Unterschiede zu freiem PTX auf.^[8] In der Literatur wird dieses Verhalten dadurch erklärt, dass PTX sehr schnell mittels passiver Diffusion vom Nanopartikel systemisch freigesetzt wird und anschließend unmittelbar an Plasmaproteine wie endogenem menschlichen Serumalbumin (HSA) adsorbiert. Eine wirklich kontrollierte Freisetzung vom Wirkstoffträger sei eher in Frage gestellt.^[9]

Hier könnte die chemische Anbindung von PTX eine vielversprechende Lösung sein, um vor allem solch plötzliche und schlagartige Freisetzungen auszuschließen. Dadurch würde nicht nur die abrupte systemische Toxizität vermieden, sondern es könnten auch längere Blutzirkulationszeiten erreicht werden, die letztlich zu einer verbesserten Tumoranreicherung über den EPR-Effekt führen.

In diesem Zusammenhang haben Polymer-Wirkstoff-Konjugate bereits seit ihrer Einführung durch Ringsdorf in den 1970er Jahren eine rasante Entwicklung erlebt.^[10] Als beliebte Anbindungsstrategie hat sich die Verknüpfung wasserlöslicher Polymere an PTX durch Veresterung der Hydroxyeinheiten am Arzneistoff etabliert. Viele dieser PTX-Polymer-Konjugate wurden durch Anbindung von PTX an die Seitenketten oder Kettenenden der zuvor hergestellten Polymere synthetisiert.^[11] Solche Grafting-Onto-Methoden weisen jedoch ähnliche Mängel auf, wie bei Polymer-Protein-Konjugaten.^[12,13] Darunter fallen Probleme wie sterische Beeinträchtigungen, die zu geringen Anbindungseffizienzen führen, sowie Schwierigkeiten bei der Reaktionskontrolle (Regioselektivität) und der anschließenden Aufarbeitung (aufwändige Abtrennung von freiem Wirkstoff und nicht-modifiziertem Polymer). Alternativ kann auch auf Monomer-Wirkstoff-Konjugate zurückgegriffen werden, die bereits zu einem Einbau des Arzneistoffs während der Polymerisation führen. Hierbei können aber nicht nur Probleme während der Synthese auftreten. Bereits bei zu hohen Beladungseffizienzen bilden sich hydrophobe Domänen, in die Wasser keinen Zugang findet, und es kommt dadurch zu verzögerter Wirkstofffreisetzung. Häufig werden die Arzneistoffe auch über Ester, Hydrazone oder Ketale an die Polymere angebunden. Nach der Abgabe des Wirkstoffs tragen die polymeren Abbauprodukte jedoch polyanionische oder polykationische

[*] B. Louage, Dr. L. Nuhn, N. Vanparijs, R. De Coen, Prof. Dr. B. G. De Geest
Biopharmaceutical Technology Unit
Faculteit Farmaceutische Wetenschappen
Universiteit Gent, Gent (Belgien)
E-Mail: br.degeest@ugent.be

Dr. M. D. P. Risseuw, I. Karalic, Prof. Dr. S. Van Calenbergh
Laboratorium voor Medicinale Chemie
Faculteit Farmaceutische Wetenschappen
Universiteit Gent, Gent (Belgien)

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind unter:
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201605892> zu finden.

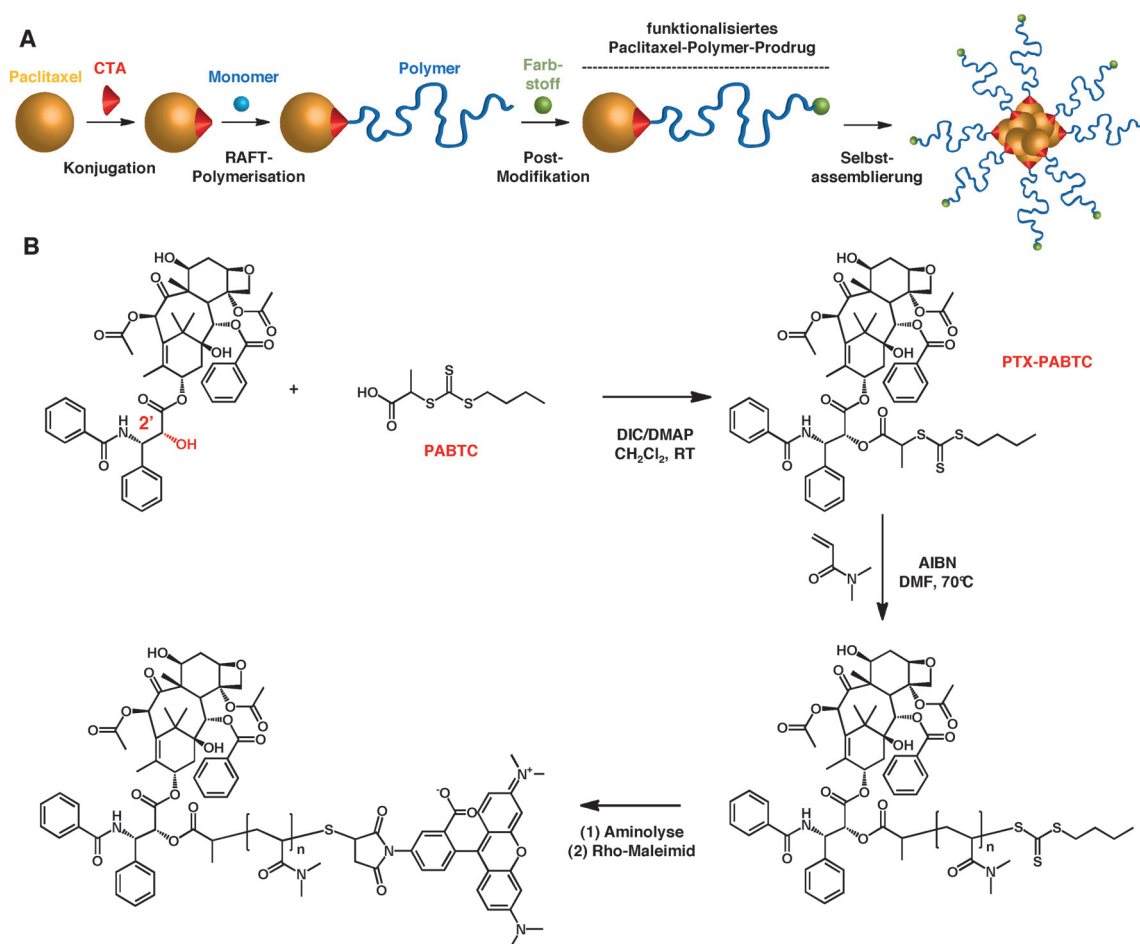
Motive, oder bestehen aus Polyhydrazinen/Polyhydraziden bzw. Polyaldehyden/Polyketonen, die alle ein toxisches Risiko darstellen können, vor allem bei dauerhaften Ablagerungen im Körper.

Demzufolge sollten alternative Synthesestrategien entwickelt werden, die einen besseren Zugang zu wohldefinierten Polymer-Prodrugs ermöglichen. Dabei sollten die Konjugate eine geringe Uneinheitlichkeit, aber gleichzeitig auch eine hohe Wirkstoffbeladung aufweisen. Weiterhin sollte die Löslichkeit in Wasser und die Möglichkeit zur Einführung weiterer Funktionalitäten gegeben sein. Als vielversprechende Strategie, die all diese Voraussetzungen erfüllt, hat sich die Grafting-From-Methode ausgehend vom Wirkstoff etabliert, erneut vergleichbar zu den Polymer-Protein-Konjugaten.^[14–19] Durch die Einführung kontrollierter Polymerisationsmethoden ermöglicht diese Strategie den Zugang zu wohldefinierten Polymer-Wirkstoff-Konjugaten mit hoher Kontrolle über die Kettenlänge und nur einem Wirkstoffmolekül pro Polymer. Größere Bedeutung finden hierbei vor allem die Aufarbeitungsmethoden, die eine einfache Abtrennung des überschüssigen Monomers erlauben (keine nicht-modifizierten Polymere oder freier Wirkstoff). In der Literatur findet man diesbezüglich Berichte über die ringöffnende Lactid-Polymerisation ausgehend von PTX hin zu wohldefinierten PTX-haltigen Polymilchsäuren.^[20] Durch ihren wasserunlöslichen Charakter benötigten diese polymeren Prodrugs jedoch zusätzliche Tenside, die erst eine stabile Formulierung in wässriger Lösung ermöglichen. Die Nicolas-Gruppe hat ebenfalls kürzlich eine Präparationsmethode über hydrophobe Nanopartikel vorgestellt, die aus Polysqualenmethacrylaten aufgebaut sind. Diese wurden über RAFT- oder NMP-vermittelte Polymerisation hergestellt, ausgehend von Gemcitabin, das mit einem RAFT-Ketten-transferreagenz oder einem NMP-Initiator kovalent modifiziert wurde.^[21]

In dieser Arbeit stellen wir ein Konzept zur Synthese regioselektiver, amphiphiler PTX-Polymer-Konjugate vor, die über eine RAFT-Polymerisation mithilfe eines PTX-Ketten-transferreagenz hergestellt wurden. Dabei dient PTX als hydrophobes Segment und die hydrophile Polymerkomponente als unterstützender wasserlöslicher Anteil. Um die Vielseitigkeit dieser Methode voll auszuschöpfen, kann in einem nachfolgenden Schritt die Trithiocarbonatgruppe am entgegengesetzten Polymerende für weitere Modifikationen ausgenutzt werden. Als Beispiel haben wir einen Farbstoff zur Fluoreszenzmarkierung des Polymers angebunden. Denkbar sind hier aber auch weitere Moleküle, wie etwa Erkennungsstrukturen zum aktiven Targeting von Krebszellen. Schema 1 fasst unsere gesamte Synthesestrategie zusammen. Im ersten Schritt wurde ein RAFT-CTA (hier 2-(Butylthiocarbonothioylthio)propansäure (PABTC)) regioselektiv an die C2'-Hydroxygruppe von PTX als Ester angebunden. Jene Hydroxygruppe weist die höchste Reaktivität zum Verestern auf.^[22] Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde der PTX RAFT-CTA (PTX-PABTC) mit einer Ausbeute von 93 % isoliert und mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie (ESI-MS) nachgewiesen (Abbildung 1 und Abbildungen S10–S15 in den Hintergrundinformationen). Im ¹H-NMR-Spektrum findet man eine gute Überein-

stimmung der Signale von sowohl PTX als auch PABTC, wobei das Verschwinden des C2'-Hydroxyprotons bei 3.85 ppm (d, $J=5.5$ Hz, 1H), sowie die Verschiebung des benachbarten Protons am C2'-Kohlenstoff von 4.77 ppm (dd, $J=5.5, 2.8$ Hz, 1H) zu 5.45 ppm (dd, $J=12.9, 2.6$ Hz, 1H) eindeutige Hinweise für die regioselektive PTX-Modifizierung sind. Da die C2'-Hydroxygruppe von entscheidender Bedeutung für die Bioaktivität von PTX ist,^[23] kann das Konjugat als Prodrug angesehen werden. In einer anschließenden RAFT-Polymerisation von *N,N*-Dimethylacrylamid (DMA) wurde PTX-PABTC als Kettentransferreagenz verwendet. PolyDMA selbst ist ein hydrophiles und biokompatibles Polymer.^[24] Denkbar sind aber auch andere Vinylmonomere, sofern diese sich in denselben organischen Lösungsmitteln lösen wie der PTX-funktionalisierte RAFT-CTA. Ein mittelgroßer Polymerisationsgrad (DP) von 30 DMA-Wiederholungseinheiten wurde angepeilt, um ein Polymerkonjugat zu erzeugen, das sowohl eine hohe Wasserlöslichkeit als auch eine hohe Wirkstoffbeladung aufweist. Darüber hinaus wurden auch ein PTX-polyDMA-Konjugat mit einem DP von 15 sowie ein Kontrollpolymer mit PABTC ohne PTX und einem DP von 30 hergestellt. Die Polymerkonjugate und das Kontrollpolymer konnten durch dreifaches Fällen in Ether problemlos isoliert werden, da sowohl die verschiedenen Kettentransferreagenzien als auch das freie PTX darin löslich sind. Mittels Größenausschlusschromatographie (SEC, Abbildung 2A) wurden für die erzeugten Polymere enge Molekulargewichtsverteilungen ohne jegliche hoch- oder niedermolekulare Nebenprodukte nachgewiesen. In den jeweiligen ¹H-NMR-Spektren (Abbildung 1A und Abbildungen S17–S20 in den Hintergrundinformationen) konnten die funktionellen Endgruppen dieser Polymere wiedergefunden werden, wobei die Protonensignale von PTX und PABTC exakt übereinstimmten. Freies PTX oder PTX-PABTC konnte weiterhin durch Diffusions-NMR (DOSY-NMR) ausgeschlossen werden. In Abbildung 1B erkennt man jeweils, dass die Protonensignale von PolyDMA und PTX für PTX-polyDMA₁₅ bzw. PTX-polyDMA₃₀ dasselbe Diffusionsverhalten zeigen, wobei das Polymer mit einem höheren Polymerisationsgrad eine geringere Diffusion aufweist. In Tabelle 1 werden die Eigenschaften aller isolierten Polymere zusammengefasst.

In nachfolgenden Experimenten wurde das Verhalten der PTX-Polymer-Konjugate im wässrigen Milieu untersucht. PTX-polyDMA₃₀ ergab sowohl in Reinstwasser als auch in PBS bei Konzentrationen bis mindestens 30 mg mL⁻¹ eine transparente Formulierung. Mit einer Wirkstoffbeladung von rund 21 % wurde so die Löslichkeit von PTX auf das 2×10^4 -fache gesteigert.^[25] Im Gegensatz dazu konnten die PTX-Polymer-Konjugate mit einem DP von 15 (also PTX-polyDMA₁₅) im Wässrigen weder gelöst noch hinreichend dispergiert werden (z. B. in PBS). Selbst nach intensiver Ultraschallbehandlung oder Verdünnung blieb die Lösung trüb, wodurch der Beitrag der hydrophilen Polymerkette an der PTX-Löslichkeit deutlich wird. Analog könnten hier auch wasserunlösliche Polymerketten anpolymerisiert werden, um daraus unter kontrolliertem Lösungsmittelaustausch in Anwesenheit von Detergentien harte hydrophobe Nanokolloide zu erzeugen. In einem nächsten Schritt wurde das supramo-



Scheme 1. A) Illustration des funktionalisierten polymeren PTX-Prodrug-Konzepts mit einer (konzentrationsabhängigen) Selbstassemblierung im wässrigen Milieu zu Nanopartikeln und (B) das dazugehörige Reaktionsschema. Nach Veresterung von PTX mit einem RAFT-CTA erfolgt eine kontrollierte radikalische Polymerisation mit *N,N*-Dimethylacrylamid. In der anschließenden Modifikation wird die Trithiocarbonat-Endgruppe zur Anbindung eines Maleimid-funktionalisierten Fluoreszenzfarbstoffs genutzt.

lekulare Verhalten von PTX-polyDMA₃₀ im wässrigen Medium näher betrachtet. Bei einer Konzentration von 30 mg mL⁻¹ in PBS wiesen dynamische Lichtstreuungsmessungen (DLS; Abbildung 2 C) auf das Vorhandensein selbstassemblierter Nanostrukturen mit einem α -gemittelten hydrodynamischen Mittelwert von 27.9 nm \pm 0.8 und einer niedrigen Dispersität (PDI) von 0.100 \pm 0.038 (Abbildung 2 D) hin. Für das Kontrollpolymer polyDMA₃₀ selbst konnten bei ähnlichen Konzentrationen (z. B. 30 mg mL⁻¹ in PBS) dagegen nur einzeln gelöste Polymerketten gefunden werden. Im Verlauf von fünf Tagen konnten keine Veränderungen in der Größe und der Dispersität festgestellt werden, sodass ein Auskristallisieren von freigesetztem PTX ausgeschlossen werden kann. Derart wässrige PTX-Formulierungen können somit auch nicht zu schlagartigen Wirkstofffreisetzungen führen. Mithilfe der Pyren-Fluoreszenzspektrophotometrie wurde für PTX-polyDMA₃₀ eine kritische Aggregationskonzentration (CAC) von 102 \pm 12 μ g mL⁻¹ gefunden (Abbildung 2 B). Im Vergleich zu anderen amphiphilen Blockcopolymeren ist dieser Wert ausgesprochen groß, was an dem relativ kleinen hydrophoben Anteil im PTX-polyDMA₃₀-Konjugat liegt. Solche CAC weisen darauf hin, dass unter physiologischen

Bedingungen das Polymer höchstwahrscheinlich als lösliche Einzelkomponente vorliegt und damit auch sicherlich an Serumproteine binden kann. Dennoch kann, falls stabile nanopartikuläre Formulierungen gewünscht sind, die Vielseitigkeit der RAFT-Polymerisation dazu ausgenutzt werden, reaktive Komonomere mit in das Polymer einzubauen, die dann entweder zur kovalenten Vernetzung oder als abbaubare Monomere mit transientser Löslichkeit^[19] verwendet werden.

Wie bereits zuvor erwähnt, ermöglicht die RAFT-Polymerisation im Vergleich zu anderen Polymerisationsarten auch den direkten Zugang zu α,ω -telechelen Polymeren.^[26] PTX-polyDMA₃₀ selbst trägt ein PTX an seinem α -Kettenende, während seine ω -Endgruppe für weitere Modifikationen verwendet werden kann.^[27] Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir dies durch die Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffs Tetramethylrhodaminmaleimid zeigen. Dafür wurde zunächst die Trithiocarbonatfunktion am ω -Ende durch Aminolyse in ein Thiol überführt (nachgewiesen durch UV/Vis-Spektroskopie, Abbildung S21 in den Hintergrundinformationen). Im Anschluss wurde das Thiol unmittelbar mit dem Tetramethylrhodaminmaleimid (Rho-Maleimid) umgesetzt, um eine stabile Thioetherbindung zwischen Polymer

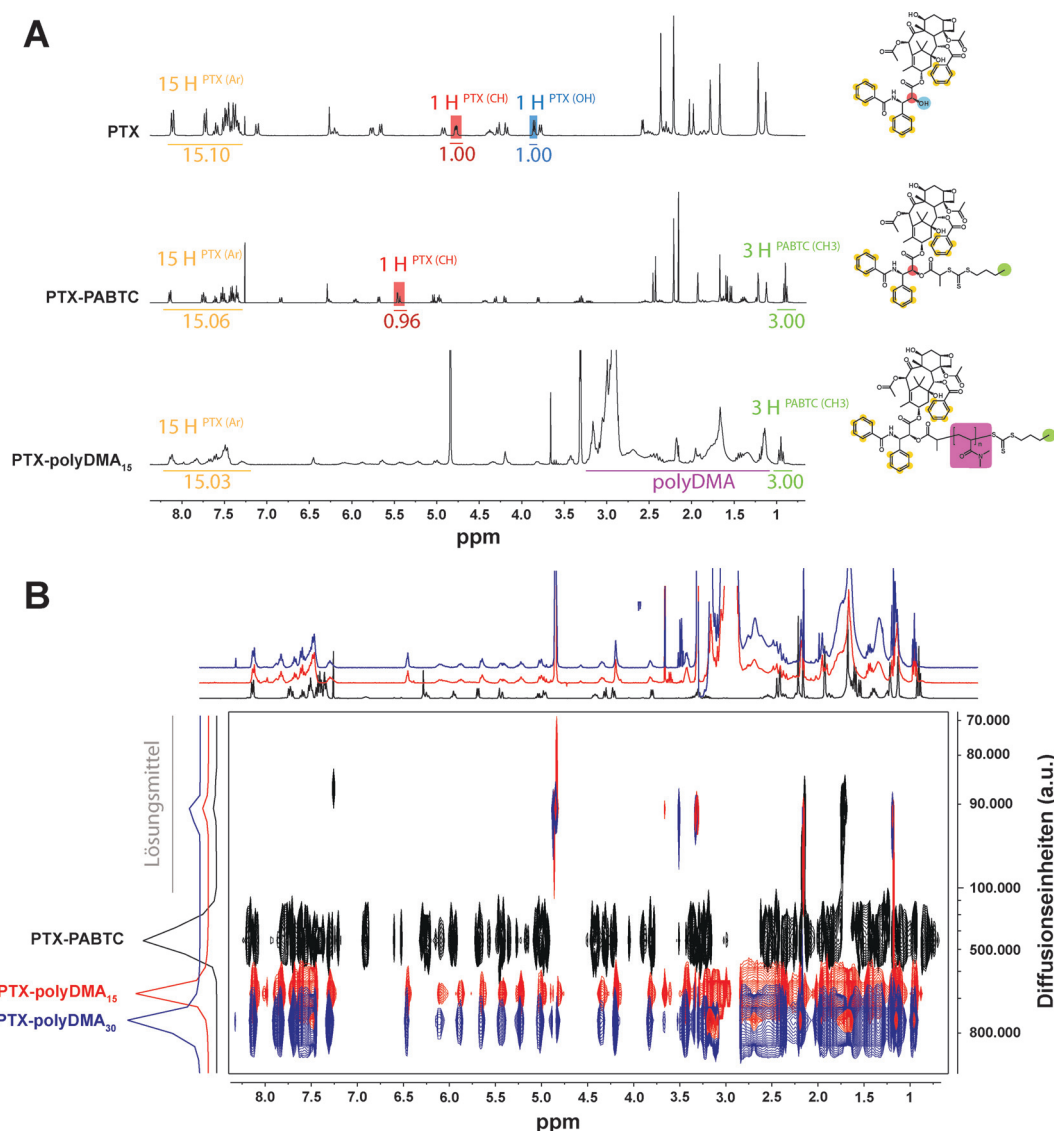


Abbildung 1. A) ¹H-NMR- und B) DOSY-NMR-Spektren von PTX, PTX-PABTC und PTX-polyDMA_{15/30}.

und Farbstoff auszubilden. Eine ähnliche Strategie könnte analog verfolgt werden, um radioaktive Markierungen oder Erkennungsstrukturen anzubinden. Nach abschließender Dialyse wurde kein freier Farbstoff mehr auf der Umkehrdünnschichtchromatographieplatte nachgewiesen (Abbildung S22 in den Hintergrundinformationen). Dynamische Lichtstreuung bestätigten, dass die Anbindung des Rhodamin-Farbstoffs an das so erzeugte PTX-polyDMA₃₀-

Rho-Polymerkonjugat keinen signifikanten Einfluss auf dessen supramolekulares Verhalten hatte (Abbildung S23 in den Hintergrundinformationen).

Nachfolgend wurde die Wirkung dieser PTX-polyDMA₃₀-Rho-Polymerkonjugate auf menschliche Eierstockkrebszellen SKOV-3 untersucht. Nach zweistündiger Inkubation wurden die Konjugate über konfokale Mikroskopie bereits innerhalb dieser Krebszellen gesichtet. In Abbildung 3 A1

Tabelle 1: Übersicht der synthetisierten Polymere.

Polymer	[DMA] ₀ / [CTA]	Umsatz DMA [%] ^[a]	DP _{Umsatz} ^[b]	DP _{Endgruppe} ^[c]	M _n [Da] ^[d]	Đ ^[d]	PTX-Beladungskapazität [%] ^[e]
PTX-polyDMA ₁₅	15	90	14	16	2648	1.09	35
PTX-polyDMA ₃₀	30	99	30	31	4356	1.07	21
polyDMA ₃₀	30	91	27	29	3477	1.09	–

[a] Ermittelt durch ¹H-NMR-Spektroskopie. [b] Ermittelt durch ¹H-NMR-Spektroskopie basierend auf dem Monomer-Umsatz. [c] Ermittelt durch ¹H-NMR-Spektroskopie basierend auf der Endgruppen-Analyse. [d] Bestimmt durch Größenausschlusschromatographie mit DMAc als Laufmittel und einer Kalibrierung mit PMMA-Standards. [e] Berechnet über den Umsatz (ermittelt durch ¹H-NMR-Spektroskopie): MW_{PTX}/MW_{PTX-polyDMA} × 100%.

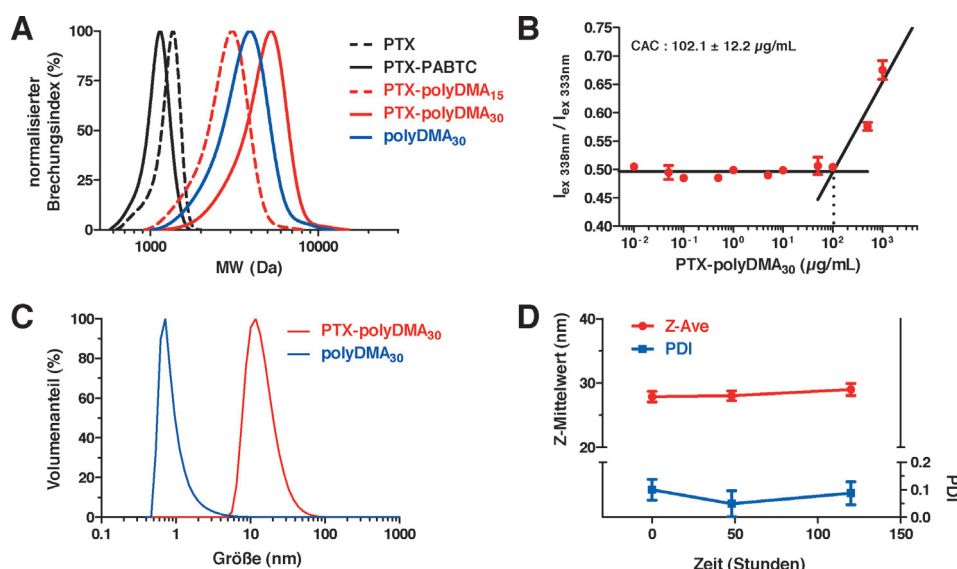


Abbildung 2. A) Größenausschlusschromatogramme von PTX, PTX-PABTC, PTX-polyDMA_{15/30} und polyDMA₃₀. B) CAC von PTX-polyDMA₃₀ in PBS ermittelt durch Pyren-Fluoreszenzspektrophotometrie ($n=2$). C) Größenverteilung von PTX-polyDMA₃₀ und polyDMA₃₀ (30 mg mL^{-1} in PBS) ermittelt durch dynamische Lichtstreuung ($n=4$). D) Kolloidale Stabilität von PTX-polyDMA₃₀ ermittelt durch dynamische Lichtstreuung (30 mg mL^{-1} in PBS, 37°C) ($n=4$).

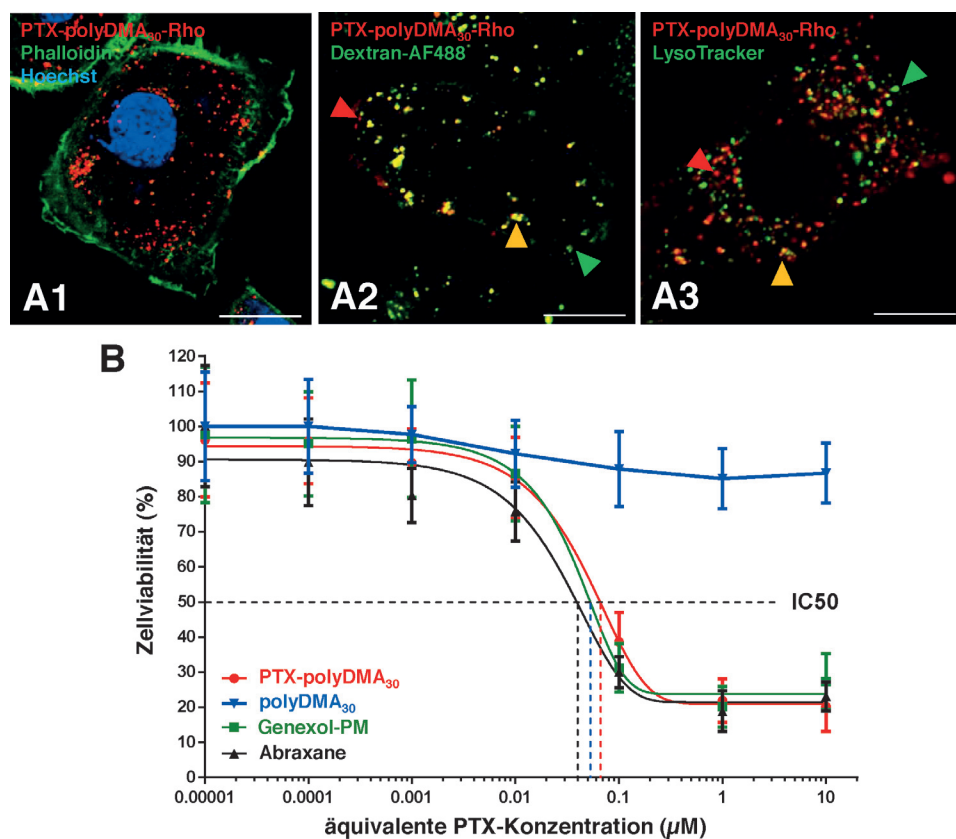


Abbildung 3. A) Konfokale Mikroskopiebilder von menschlichen Eierstockkrebszellen SKOV-3, die mit PTX-polyDMA₃₀-Rho-Konjugaten inkubiert wurden. Zellkerne wurden dafür mit Hoechst und die Plasmamembranen mit Phalloidin angefärbt (A1). Die Konjugate wurden zusätzlich zusammen mit Dextran-AF488 den Zellen verabreicht, um deren (frühe) Endosome zu markieren (A2). Außerdem konnten lysosomale Vesikel mit LysoTracker angefärbt werden (A3). Als Hilfestellung sind in A2 und A3 Kolokalisationen mit einem gelben Pfeil bzw. zwei Nicht-Kolokalisationen mit einem roten oder grünen Pfeil markiert. Maßstabskalen (weiß, jeweils in den Teilbildern unten rechts) entsprechen einer Länge von $15 \mu\text{m}$. B) In-vitro-Zytotoxizität von PTX-polyDMA₃₀ im Vergleich zu den kommerziell erhältlichen PTX-Nanoformulierungen Abraxane und Genexol-PM. PolyDMA₃₀ ohne PTX diente als Kontrollprobe ($n=6$).

erkennt man punktförmige Fluoreszenzsignale im Zellinneren, was auf eine effektive Aufnahme der Konjugate in diese Zellen hindeutet. Um den Aufnahmeprozess zu verdeutlichen, wurden die Zellen neben PTX-polyDMA₃₀-Rho auch mit Alexa-Fluor-488-markiertem Dextran (Abbildung 3 A2) koinkubiert oder zusätzlich mit LysoTracker angefärbt (Abbildung 3 A2). Dextran-Konjugate werden bekanntlich von den Zellen mittels Pinozytose^[28] aufgenommen, während LysoTracker gewöhnlich lysosomale Vesikel markiert. Eine hohe Kolokalisation von PTX-polyDMA₃₀-Rho mit Dextran-AF488 und eine teilweise vorhandene Kolokalisation mit LysoTracker weist auf eine aktive Endozytose mit anschließendem Verbleib in sich ansäuernden intrazellulären Vesikeln hin. Bei einer Wiederholung dieser Experimente bei 4°C , wenn eine energieabhängige Endozytose nicht mehr möglich ist, konnte keine Aufnahme der Konjugate festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Ergebnissen lässt sich insgesamt rückschließen, dass der polymere Prodrug-Wirkstoff im Vergleich zum membrangängigen PTX^[29] nur über aktive Endozytose (z.B. Pinozytose) in die Zellen gelangt und dort nach zwei Stunden nicht ausschließlich in lysosomalen Vesikeln zu finden ist. Da PTX von Krebszellen bekanntermaßen recht schnell wieder über P-Glycoprotein-Effluxpumpen ausgeschleust werden kann, ermöglichen andere Zellaufnahmewege, wie der von uns nachgewiesene, eine längere intrazelluläre PTX-Verweildauer. Somit ergäben sich möglicherweise sogar Ansätze zur Überwindung der Wirkstoffresistenz.^[30]

Abschließend wurde der Einfluss von PTX-polyDMA₃₀ auf die In-vitro-Viabilität der SKOV-3-Zellen untersucht.

Dafür wurden die Zellen für 72 Stunden jeweils mit dem PTX-polyDMA₃₀-Konjugat, dem polyDMA₃₀-Kontrollpolymer oder den zwei kommerziell erhältlichen PTX-Nanoformulierungen Abraxane bzw. Genexol-PM inkubiert. Die Zellviabilität wurde anschließend mittels MTT-Test nachgewiesen. Aus den Ergebnissen in Abbildung 3 B wird deutlich, dass das Polymer polyDMA₃₀ als Kontrolle selbst keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen nimmt und damit als zellkompatibel im Rahmen dieser experimentellen Studien angesehen werden kann. Demgegenüber weist das PTX-polyDMA₃₀-Konjugat einen IC₅₀-Wert von 79 ± 7 nm auf, der ähnlich zu den Ergebnissen von Abraxane und Genexol-PM ist (IC₅₀ = 56 ± 11 nm für Abraxane bzw. 65 ± 13 nm für Genexol-PM). Dies deutet darauf hin, dass trotz der kovalenten Anbindung eines Polymers an die für seine Bioaktivität notwendige C2'-OH-Position vergleichbare In-vitro-Zytotoxizitäten von PTX erzielt werden können wie für die sonst üblichen physikalischen Verkapselungen. Mit anderen Worten sprechen diese Ergebnisse dafür, dass selbst nach einem Verbleib des Polymer-Wirkstoff-Konjugats in endosomalen/lysosomalen Vesikeln ausreichend Esterasen wie z. B. Cathepsin B^[31] vorhanden sind, um natives PTX vom inaktiven polymeren Prodrug freizusetzen, welches unmittelbar an seine subzellulären Wirkorte gelangen und dort seine zytotoxische Wirkung entfalten kann.

Zusammengefasst haben wir in dieser Arbeit die Synthese wohldefinierter polymerer Prodrugs für das Krebsmedikament PTX basierend auf einer Grafting-From-Methode ausgehend von Arzneistoff in Kombination mit der RAFT-Polymerisation vorgestellt. PolyDMA konnte regioselektiv an einen modifizierten PTX-Ester-CTA polymerisiert werden, wodurch die Wasserlöslichkeit des Wirkstoffs deutlich zunahm und sich stabile Nanopartikel ausbilden konnten bzw. je nach Konzentration einzeln gelöste PTX-Polymerketten vorlagen. Weiterhin ermöglichte diese Strategie die Anbindung eines Fluorophors an das ω-Polymerkettenende, wodurch das intrazelluläre Verhalten dieses Prodrugs erst verfolgt werden konnte. Dabei verloren diese PTX-Polymerkonjugate auch nicht ihre In-vitro-Aktivität.

Wir gehen davon aus, dass die Vielseitigkeit dieser Strategie großes Interesse wecken könnte, vor allem im Hinblick auf die Synthese ganzer Substanzbibliotheken an Polymer-PTX-Konjugaten ausgehend von umfassend charakterisierten PTX-Kettentransferreagenzien. Solche Bibliotheken könnten Konjugate mit unterschiedlichen Polymerkettenlängen umfassen, aufgebaut aus verschiedenen Monomeren mit diversen Seitenketten- und Endgruppenfunktionen, und dazu genutzt werden, um Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufzuklären, die das pharmakokinetische Profil von PTX besser auf den Tumor ausrichten. In Anbetracht der Tatsache, dass unser PTX-Polymer-Konjugat als inaktives Prodrug angesehen werden kann, sollte dies auch zu einer höheren maximal tolerierten Dosis (MTD) führen, mit der ein verbesserter therapeutischer Effekt erzielt werden könnte. Neben diesen Untersuchungen sollten in Zukunft auch noch Strategien zum aktiven Tumor-Targeting, der Einbau transient löslicher Monomere und weitere Möglichkeiten zur Überwindung der Tumor-Wirkstoffresistenz in Angriff genommen werden.

Danksagung

B.L., N.V.P. und R.D.C. danken der IWT Flandern sowie der Universität Gent (BOF) für Stipendien. B.G.D.G. dankt der FWO Flandern und der Flämischen Liga gegen Krebs („Kom op tegen Kanker“) für ihre Unterstützung. L.N. dankt der Alexander von Humboldt-Stiftung für ein Feodor Lynen-Forschungsstipendium.

Stichwörter: Krebs · Nanotechnologie · Paclitaxel · Prodrugs · RAFT-Polymerisation

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 11791–11796
Angew. Chem. **2016**, 128, 11967–11973

- [1] A. F. Wahl, K. L. Donaldson, C. Fairchild, F. Y. F. Lee, S. A. Foster, G. W. Demers, D. A. Galloway, *Nat. Med.* **1996**, 2, 72–79.
- [2] A. Z. Wang, R. Langer, O. C. Farokhzad in *Annu. Rev. Med.*, Bd. 63 (Hrsg.: C. T. Caskey, C. P. Austin, J. A. Hoxie), **2012**, S. 185–198.
- [3] M. Elsbahy, K. L. Wooley, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 2545–2561.
- [4] S. Kasmi, B. Louage, L. Nuhn, A. Van Driessche, J. Van Deun, I. Karalic, M. D. P. Risseuw, S. Van Calenbergh, R. Hoogenboom, R. De Rycke et al., *Biomacromolecules* **2016**, 17, 119–127.
- [5] B. Louage, Q. Zhang, N. Vanparijs, L. Voorhaar, S. Vande Castele, Y. Shi, W. E. Hennink, J. Van Boclaer, R. Hoogenboom, B. G. De Geest, *Biomacromolecules* **2015**, 16, 336–350.
- [6] N. Desai, *Clin. Cancer Res.* **2006**, 12, 1317–1324.
- [7] T.-Y. Kim, *Clin. Cancer Res.* **2004**, 10, 3708–3716.
- [8] Y. Shi, R. van der Meel, B. Theek, E. O. Blenke, E. H. E. Pieters, M. H. A. M. Fens, J. Ehling, R. M. Schiffelers, G. Storm, C. F. van Nostrum, et al., *ACS Nano* **2015**, 9, 3740–3752.
- [9] H. Chen, S. Kim, L. Li, S. Wang, K. Park, J.-X. Cheng, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 6596–6601.
- [10] N. Larson, H. Ghandehari, *Chem. Mater.* **2012**, 24, 840–853.
- [11] F. Greco, M. J. Vicent, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, 61, 1203–1213.
- [12] E. M. Pelegri-O'Day, E.-W. Lin, H. D. Maynard, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 14323–14332.
- [13] N. Vanparijs, S. Maji, B. Louage, L. Voorhaar, D. Laplace, Q. Zhang, Y. Shi, W. E. Hennink, R. Hoogenboom, B. G. De Geest, *Polym. Chem.* **2015**, 6, 5602–5614.
- [14] K. L. Heredia, D. Bontempo, T. Ly, J. T. Byers, S. Halstenberg, H. D. Maynard, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 16955–16960.
- [15] B. S. Sumerlin, *ACS Macro Lett.* **2012**, 1, 141–145.
- [16] P. De, M. Li, S. R. Gondi, B. S. Sumerlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 11288–11289.
- [17] J. Xu, K. Jung, N. A. Corrigan, C. Boyer, *Chem. Sci.* **2014**, 5, 3568.
- [18] Q. Zhang, M. Li, C. Zhu, G. Nurumbetov, Z. Li, P. Wilson, K. Kempe, D. M. Haddleton, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 9344–9353.
- [19] N. Vanparijs, R. De Coen, D. Laplace, B. Louage, S. Maji, L. Lybaert, R. Hoogenboom, B. G. De Geest, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 13972–13975.
- [20] R. Tong, J. Cheng, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 4830–4834; *Angew. Chem.* **2008**, 120, 4908–4912.
- [21] D. T. Bui, A. Maksimenko, D. Desmaële, S. Harisson, C. Vauthier, P. Couvreur, J. Nicolas, *Biomacromolecules* **2013**, 14, 2837–2847.
- [22] H. M. Deutsch, J. A. Glinski, M. Hernandez, R. D. Haugwitz, V. L. Narayanan, M. Suffness, L. H. Zalkow, *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 788–792.

- [23] D. G. I. Kingston, *Chem. Commun.* **2001**, 867–880.
- [24] P. H. Kierstead, H. Okochi, V. J. Venditto, T. C. Chuong, S. Kivimäe, J. M. J. Fréchet, F. C. Szoka, *J. Controlled Release* **2015**, *213*, 1–9.
- [25] Y. Shi, M. J. van Steenberg, E. A. Teunissen, L. Novo, S. Gradmann, M. Baldus, C. F. van Nostrum, W. E. Hennink, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 1826–1837.
- [26] C. Boyer, V. Bulmus, T. P. Davis, V. Ladmiral, J. Q. Liu, S. Perrier, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5402–5436.
- [27] H. Willcock, R. K. O'Reilly, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 149–157.
- [28] E. L. Racoosin, *J. Cell Biol.* **1993**, *121*, 1011–1020.
- [29] C. Ryppa, H. Mann-Steinberg, M. L. Biniossek, R. Satchi-Fainaro, F. Kratz, *Int. J. Pharm.* **2009**, *368*, 89–97.
- [30] M. M. Gottesman, T. Fojo, S. E. Bates, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 48–58.
- [31] A. Eldar-Boock, K. Miller, J. Sanchis, R. Lupu, M. J. Vicent, R. Satchi-Fainaro, *Biomaterials* **2011**, *32*, 3862–3874.
- [32] C. J. Ferguson, R. J. Hughes, D. Nguyen, B. T. T. Pham, R. G. Gilbert, A. K. Serelis, C. H. Such, B. S. Hawkett, *Macromolecules* **2005**, *38*, 2191–2204.

Eingegangen am 17. Juni 2016,
veränderte Fassung am 14. Juli 2016
Online veröffentlicht am 25. August 2016