

# Nanoskalige, biologisch abbaubare organisch-anorganische Hybride für effiziente Zellaufnahme und Wirkstofftransport

Sebastian Hörner<sup>+</sup>, Sascha Knauer<sup>+</sup>, Christina Uth<sup>+</sup>, Marina Jöst, Volker Schmidts, Holm Frauendorf, Christina Marie Thiele, Olga Avrutina und Harald Kolmar\*

**Abstract:** Wir präsentieren eine umfassende Studie über neuartige, hocheffiziente und bioabbaubare molekulare Transporter. Hierzu entwarfen wir verschiedene kubisch-oktamer Silsesquioxane („cube-octameric silsesquioxane“, COSS) und untersuchten deren Zellaufnahme mit Konfokalmikroskopie und Durchfluszytometrie. Für ein mit kompakt angeordneten Guanidinogruppen funktionalisiertes COSS wurde bereits bei nanomolaren Konzentrationen eine schnelle Aufnahme in lebende HeLa-Zellen beobachtet. Diese effiziente Aufnahme wurde ebenfalls in Bakterien, Hefen und Archaeen festgestellt. Der COSS-basierte Transporter war deutlich effizienter als zellpenetrierende Peptide und zeigte geringe Toxizität. Mit seiner Hilfe wurde der kovalent gekuppelte zytotoxische Wirkstoff Doxorubicin in lebende Tumorzellen transportiert. Da die Zellaufnahme eines fluoreszenzmarkierten Transporters in Gegenwart von Serum erhalten blieb, könnte das System auch als Wirkstofftransporter für In-vivo-Anwendungen interessant sein.

Seit Linus Paulings bahnbrechender Publikation in der Zeitschrift *Science*<sup>[1]</sup> im Jahre 1949 wurden beeindruckende Fortschritte in der molekularen Medizin und in angrenzenden Disziplinen erzielt. Heutzutage ist eine Vielzahl wirksamer und selektiver Wirkstoffe verfügbar. Damit ist eine effiziente Strategie, diese therapeutischen Verbindungen in die Zelle, insbesondere in den Zellkern zu transportieren, ebenso wichtig geworden wie die Gestaltung und Optimierung des Pharmakophors an sich. In Anbetracht der Tatsache, dass viele der neuen, vielversprechenden Wirkstoffkandidaten wie Peptide und Proteine wasserlöslich sind, ist der Transport über die Zellmembran limitierend für ihre medizinische Anwendung. Daher ist die Entwicklung von Verfahren zum

Wirkstofftransport zu einem wichtigen Feld der biomedizinischen Forschung avanciert. Im Jahr 1994 wurde das erste zellpenetrierende Peptid („cell-penetrating peptide“, CPP) als Vehikel für den intrazellulären Transport beschrieben.<sup>[2]</sup> Seitdem wurden CPPs eingehend untersucht und verbessert.<sup>[3]</sup> Dennoch sind einige Eigenschaften wie Toxizität, Stabilität und Effizienz der zellulären Aufnahme weiterhin optimierungsbedürftig. Da die peptidische Struktur der CPPs den Raum für Verbesserungen einschränkt, konzentrieren sich aktuelle Ansätze auf Nanopartikel oder nichtpeptidische niedermolekulare Gerüste.<sup>[4]</sup> Diese einfachen, gleichmäßig aufgebauten molekularen Strukturen können leicht modifiziert werden, wodurch zellpenetrierende Moleküle mit komplett neuen Eigenschaften erzeugt werden können. Im Unterschied zu makromolekularen Transportsystemen wie (Bio)Polymeren, Dendrimeren, Lipid-basierten oder viralen Systemen, die entweder bereits Einzug in Produkte gefunden habe oder sich in klinischen Prüfungen befinden,<sup>[4c]</sup> bedürfen die molekularen Transporter der weiteren Optimierung. Allgemeine Strategien zur Verbesserung der Zellaufnahme beinhalten die Reduktion der konformativen Freiheitsgrade durch Cyclisierung zellpenetrierender Peptide oder die Verwendung von Gerüstmolekülen, die die Kontrolle der räumlichen Anordnung der Zellaufnahme-vermittelnden funktionalen Gruppen ermöglichen.<sup>[3a,4d,5]</sup> Interessanterweise wurde beobachtet, dass der Abstand der geladenen Gruppen vom Gerüst die Effizienz der Zellaufnahme mit beeinflusst.<sup>[3c,d,5c,6]</sup>

Wir wählten das kubisch-oktamer Silsesquioxangerüst als Ausgangspunkt für die Entwicklung neuartiger zellpenetrierender Verbindungen. COSS sind hochgeordnete organisch-anorganische Hybridmoleküle mit einem käfigartigen anorganischen Kern aus abwechselnden Sauerstoff- und Siliciumatomen, der mit 8 organischen Resten funktionalisiert ist. Diese Struktur, in der geladene Gruppen am kompakten Kern (0.7 nm)<sup>[7]</sup> angebunden sind, ermöglicht das Design eines geladenen, starren und symmetrischen Konstrukts. Im Allgemeinen werden COSS in verschiedenen medizinischen Anwendungen, z.B. Gewebekonstruktion oder Oligomerisierung biologisch aktiver Liganden wie Peptide und Kohlenhydrate verwendet.<sup>[7,8]</sup> Sie werden als ungiftig eingestuft, und die hydrolytische Zersetzung des anorganischen Kerns unter physiologischen Bedingungen wurde sorgfältig untersucht.<sup>[7]</sup>

Die zellpenetrierenden Eigenschaften eines mit sieben Ammoniumgruppen funktionalisierten COSS wurden bereits beschrieben.<sup>[7,9]</sup> In früheren Studien haben wir gezeigt, dass diese Moleküle den Transport eines funktionellen Peptids in lebende HeLa-Zellen ermöglichen.<sup>[10]</sup> Zur Verbesserung dieses Systems synthetisierten wir eine Reihe neuer COSS-

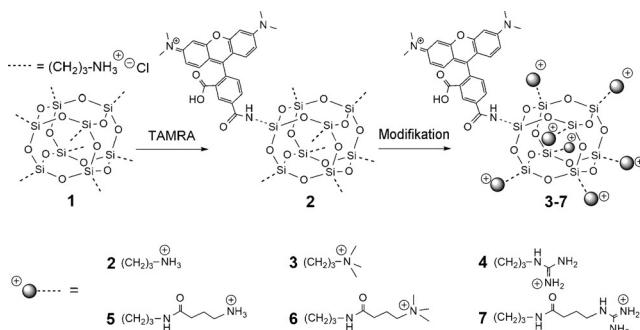
[\*] S. Hörner,<sup>[+]</sup> S. Knauer,<sup>[+]</sup> C. Uth,<sup>[+]</sup> M. Jöst, Dr. O. Avrutina, Prof. Dr. H. Kolmar  
Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie  
Technische Universität Darmstadt  
Alarich-Weiss-Straße 4, 64287 Darmstadt (Deutschland)  
E-Mail: kolmar@biochemie.tud.de  
Dr. V. Schmidts, Prof. Dr. C. M. Thiele  
Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie  
Technische Universität Darmstadt  
Alarich-Weiss-Straße 16, 64287 Darmstadt (Deutschland)  
Dr. H. Frauendorf  
Institut für Organische und Biomolekulare Chemie  
Georg-August Universität Göttingen  
Tammannstraße 2, 37077 Göttingen (Deutschland)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.  
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind unter:  
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201606065> zu finden.

basierter molekularer Transporter und untersuchten die Aufnahmeeffizienz eines kovalent angebunden zytotoxischen Wirkstoffs.

Die Verbindungen **2–7** wurden in einer zweistufigen Synthese hergestellt (Schema 1). Dazu wurden das kostengünstig kommerziell erhältliche Oktaammonium-COSS-Hydrochlorid **1** mit unterschiedlichen Gruppen funktionalisiert: a) Guanidinogruppen, die unter physiologischen Bedingun-

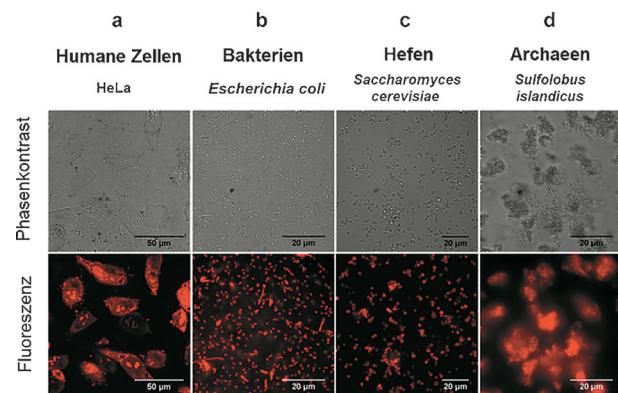
Medium („Dulbecco's modified eagle medium“, DMEM). Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit phosphatgepufferter Salzlösung („phosphate buffered saline“, PBS) gewaschen und anschließend in DMEM mit fetalem Kälberserum („fetal bovine serum“, FBS) mikroskopiert. Bei **2–4** mit kürzeren Linkern wurden eine verstärkte Zellaufnahme und eine Anreicherung im Zellkern sowie im Nukleolus und im Zytoplasma beobachtet (Abbildungen 1a und S1). Dagegen



**Schema 1.** Synthese der fluoreszenzmarkierten zellpenetrierenden COSS-Derivate **2–7** mit kationischen funktionellen Gruppen in unterschiedlichem Abstand vom anorganischen Kern. Gegenionen wurden der Übersichtlichkeit halber nicht abgebildet. Die Aminosäuresequenzen der CPPs sind in SI 5.2 abgebildet.

gen positiv geladen sind, oder b) permanent positiv geladene quartäre Amine. Zusätzlich untersuchten wir den Einfluss der Länge der Linker auf die Aufnahmeeffizienz. Um die Verbindungen in Zellversuchen verfolgen zu können, brachten wir in einer stöchiometrisch kontrollierten Reaktion an einer Ecke von COSS **1** den Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin (TAMRA) an, was zuder Verbindung TAMRA-aminoCOSS (**2**) führte. Im Anschluss wurden die sieben Aminofunktionalitäten von **2** entweder durch N-Methylierung in quartäre Amine überführt (TAMRA-quartCOSS, **3**), oder guadinyliert (TAMRA-GuCOSS, **4**). Alternativ wurden verschiedene Linker zwischen dem anorganischen Siloxankern und den geladenen Gruppen installiert. Dazu wurden 4-Aminobutan-, 4-Trimethylaminobutan- oder 4-Guanidinobutansäure über eine Amidbindung gekuppelt, was in den Verbindungen TAMRA-aminoCOSS-L (**5**), TAMRA-quartCOSS-L (**6**) und TAMRA-GuCOSS-L (**7**) resultierte (Schema 1). Um die Toxizität des molekularen Transporters zu untersuchen, synthetisierten wir die Verbindung amino-GuCOSS (**8**) ohne Fluoreszenzmarkierung (siehe die Hintergrundinformationen, SI 5.2). Für die Untersuchung der Bioabbaubarkeit des Transportmoleküls stellten wir die Verbindung Fluorescein-TAMRA-GuCOSS (**9**) her (Abbildung 3a). Die Integrität der käfigartigen Struktur des Siloxankerns wurde durch NMR-Spektroskopie bestätigt (Verbindungen **2–7**; SI 5.3).

Die fluoreszenzmarkierten Derivate **2–7** wurden auf ihre zellpenetrierenden Eigenschaften untersucht. Um die Zellaufnahme qualitativ zu analysieren, führten wir Konfokalmikroskopiestudien mit lebenden Zellen durch. Dazu inkubierten wir HeLa-Zellen mit den Verbindungen **2–7** in einer Konzentration von 20  $\mu$ M für 30 Minuten in serumfreien



**Abbildung 1.** Zelluläre Aufnahme von TAMRA-GuCOSS (**4**). a) Konfokalmikroskopische Aufnahmen von lebenden HeLa-Zellen, inkubiert mit **4** bei 37°C. b–d) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von **4** mit b) Gram-negativen Bakterien (*Escherichia coli*), bei 37°C inkubiert, c) Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*), bei 37°C inkubiert, und d) Archaeen (*Sulfolobus islandicus*), bei 80°C inkubiert.

wurde bei den Derivaten mit längeren Linkern eine verminderte zelluläre Aufnahme und eine Anreicherung im Zytoplasma beobachtet (**5–7**, Abbildung S1). Aufgrund der starken Anreicherung der molekularen Transporter **2–4** im Zellkern sind diese besonders im Hinblick auf den Transport von Wirkstoffen von Interesse, die in diesem Kompartiment wirken.

Da bei dem guadinylierten Transporter TAMARA-GuCOSS (**4**) die höchste Aufnahme in HeLa-Zellen beobachtet werden konnte, wurde dieser im Hinblick auf seine Fähigkeit, Zellen aus allen drei Domänen des Lebens zu penetrieren, untersucht. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen weisen darauf hin, dass **4** sowohl in eukaryotische als auch prokaryotische Zellen wie Hefen (*S. cerevisiae*), Säugerzellen (HeLa) sowie Bakterien (*E. coli*) und Archaeen (*S. islandicus*, *S. tokodaii*, *Halobacterium salinarum*) aufgenommen wird (Abbildung 1b–d, S2). Diese Beobachtungen sind im Hinblick auf die spezielle Zusammensetzung der Zellmembranen von Archaeen von besonderem Interesse.<sup>[11]</sup> Da guadinylierte COSS für den Transport von Antibiotika interessant sein könnten, untersuchten wir die Aufnahme in *E. coli* im Detail (Abbildung S2c).

Um die Aufnahme in eukaryotische Zellen zu quantifizieren, führten wir umfangreiche durchflusszytometrische Studien mit den COSS-Derivaten **2–7** und den TAMRA-markierten zellpenetrierenden Peptiden TAT (**10**), Penetratin (**11**), Heptaarginin (**12**) und Dekaarginin (**13**) durch.<sup>[12]</sup> Dazu inkubierten wir HeLa-Zellen mit diesen Verbindungen für bis zu 60 Minuten bei einer Endkonzentration von 20  $\mu$ M bei

37°C in serumfreiem DMEM. Um oberflächengebundene Transportmoleküle zu entfernen, wurden die Zellen nach der Inkubation mit Trypsin behandelt (SI 5.1). Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt, und alle Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Messungen bestätigt (Abbildung S3a–g), wobei der molekulare Transporter **4** als der effizienteste identifiziert wurde. Das Fluoreszenzsignal von Zellen, die mit **4** inkubiert wurden, war dabei etwa 155mal stärker als das der mit dem TAT-Peptid **10** inkubierten Zellen. Interessanterweise wurde für **4** mit sieben Guanidinogruppen eine 78-fach stärkere Zellaufnahme als im Fall von Heptarginin **12** beobachtet (Abbildung 2a). Im Einklang mit un-

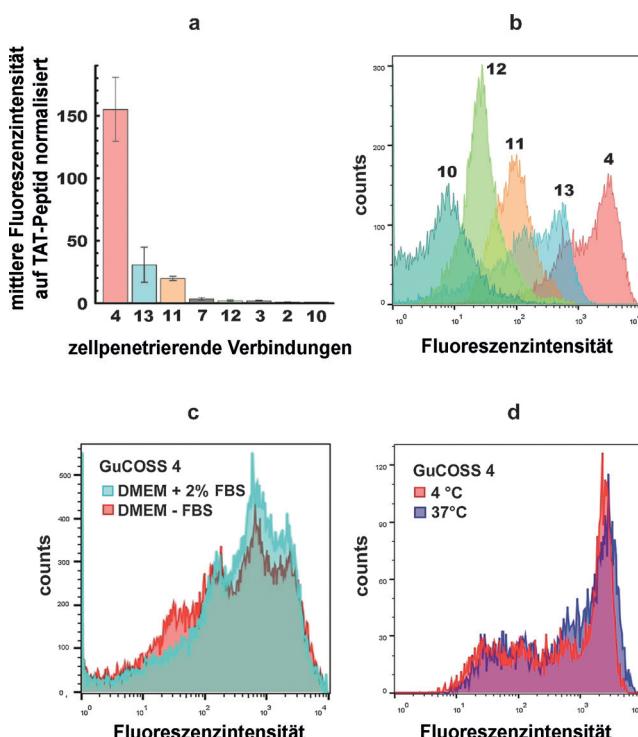
gespannten und damit starreren Struktur führt, eine effiziente Strategie, um die Zellaufnahme zu verbessern.<sup>[5c]</sup>

Um zu bestimmen, ob die Zellaufnahme energieabhängig ist, verglichen wir die Fluoreszenzintensität von HeLa-Zellen nach der Inkubation mit **4** bei 37°C oder bei 4°C (Abbildung 2d). Da die Aufnahme bei 4°C nur geringfügig reduziert war, gehen wir von einem energieunabhängigen Aufnahmemechanismus aus. Zeitaufgelöste Durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten bei 37°C eine schnelle Aufnahme mit einer ersten Verschiebung der Population nach einer Inkubationszeit von einer Minute (Abbildung S6). Um den minimalen Schwellenwert für die Aufnahme zu bestimmen, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von **4** inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 37°C konnte dabei schon bei der niedrigsten Konzentration (80 nm) eine Verschiebung der Fluoreszenzintensität beobachtet werden, und eine Konzentration von 1 µm wurde benötigt, um eine Verschiebung der gesamten Population zu erreichen (Abbildung S7). Im Unterschied zu zellpenetrierenden Peptiden konnte innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs kein unterer Schwellenwert für die Zellaufnahme identifiziert werden.<sup>[13]</sup> Da sowohl für den anorganischen Kern von COSS als auch für Guanidinogruppen die Bildung höherer Strukturen beobachtet wurde,<sup>[7,14]</sup> könnte eine über einen solchen Mechanismus induzierte erhöhte lokale Konzentration von **4** (als Folge der Ansammlung an der Zelloberfläche) die Zellpenetration auch bei niedrigen Konzentrationen ermöglichen. Unsere Beobachtungen deuten auf eine auch bei anderen Polyguanidinen beobachtete energieunabhängige direkte Membrantranslokation hin.<sup>[13]</sup>

Generell ist die Aufnahme von zellpenetrierenden Peptiden in Gegenwart von Serum vermindert.<sup>[15]</sup> Eine solche Abnahme der Zellgängigkeit wurde für Polyarginine sowohl in serumhaltigem Medium als auch in In-vivo-Versuchen beschrieben. Die Ursache hierfür liegt vermutlich in deren Aggregation mit Serumproteinen. Um den Einfluss von Serum auf die Zellpenetration von **4** zu quantifizieren, untersuchten wir diese in Gegenwart von 10% FBS in DMEM (Abbildung S8). Im Vergleich zu FBS-freiem Medium lag die Intensität des dabei erhaltenen Fluoreszenzsignals bei 40%.<sup>[3c,15a,16]</sup> Diese Toleranz gegenüber Serumproteinen in Kombination mit der schnellen und effizienten Zellaufnahme macht den molekularen Transporter **4** für In-vivo-Anwendungen interessant.

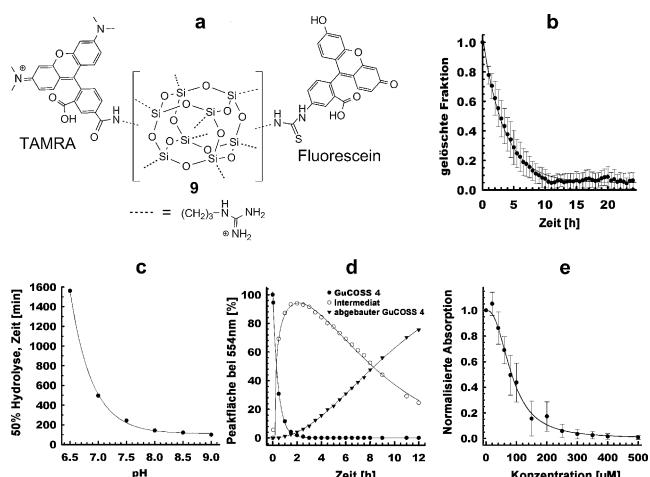
Da viele zellpenetrierende Verbindungen sich oberhalb einer bestimmten Konzentration als toxisch herausstellten, untersuchten wir die Toxizität der nicht fluoreszenzmarkierten Verbindung **8** in einem XTT-basierten Lebendzelltest mit HeLa-Zellen (SI 5.2). Dabei wurde die LC<sub>50</sub> zu 84 µm bestimmt (Abbildung 3e), was mit der Toxizität von Polyargininen (76 µm), TAT (86.6% Zellviabilität bei 50 µm) und Penetratin (88.2% Zellviabilität bei 50 µm) vergleichbar ist.<sup>[17]</sup> Diese niedrige Toxizität kann möglicherweise mit dem biologischen Abbau des anorganischen Kerns unter physiologischen Bedingungen zurückgeführt werden, der zur Bildung primärer Siloxanen führt.<sup>[7]</sup>

Um den pH-abhängigen Abbau von **4** zu untersuchen, verfolgten wir die Hydrolyse des anorganischen Kerns mittels



**Abbildung 2.** Durchflusszytometrische Experimente mit HeLa-Zellen. a) Mittlere Fluoreszenzintensität ausgewählter COSS-Derivate und zellpenetrierender Peptide. b) repräsentative Histogramme von TAMRA-GuCOSS (4) und zellpenetrierenden Peptiden: petrogrün: TAT (10), gelbgrün: Heptarginin (12), orange: Penetratin (11), hellblau: Dekaarginin (13), rot: TAMRA-GuCOSS (4). c) HeLa-Zellen inkubiert mit **4** in An- und Abwesenheit von 2% FBS in DMEM. d) Zelluläre Aufnahme von **4** in HeLa-Zellen, Inkubation in serumfreiem DMEM für 10 Minuten entweder bei 37°C oder bei 4°C.

seren Mikroskopiestudien zeigten COSS-Derivate mit kürzeren Linkern zwischen dem Kern und den positiv geladenen funktionellen Gruppen eine höhere Fluoreszenzintensität (Abbildung S4). Vergleichbare Ergebnisse wurden ebenfalls für HEK293- und CHO-Zellen erhalten (Abbildung S5a–c). Diese deutlich erhöhte Zellaufnahme von **4** kann mit der kompakten Anordnung auf einem starren Strukturgerüst und der damit verbundenen höheren Dichte der die Aufnahme vermittelnden Gruppen erklärt werden. Tatsächlich ist die Cyclisierung von zellpenetrierenden Peptiden, die zu einer



**Abbildung 3.** Abbaustudien des GuCOSS-Transportsystems. a) Guanidinylierter COSS-Kern mit zwei Fluorophoren, Fluorescein und TAMRA (Fluorescein-TAMRA-GuCOSS (**9**)). b) Abnahme der gelösten Fraktion von Fluorescein in den In-vitro-Abbaustudien in lebenden HeLa-Zellen. c) 50% Hydrolyse von **4** als Funktion des pH-Werts in PBS. d) Mit HPLC analysierte Kinetik des Abbaus von **4** bei pH 7.0 in PBS. e) XTT-Lebendzellzahlbestimmung nach Inkubation mit guanidinyliertem COSS **8**.

Umkehrphasen-HPLC. Dafür inkubierten wir **4** bei pH 6.5 bis 9.0 bei 37°C in PBS und nahmen über 12 Stunden HPLC-Chromatogramme bei einer Wellenlänge von 554 nm auf (Absorptionsmaximum von TAMRA). Hydrolyseintermediate und Abbauprodukte wurden dabei durch Bestimmung der Peakflächen quantifiziert. Während die vermehrt Hydroxygruppen beinhaltenden Intermediate früher von der Säule eluiert wurden, waren die Retentionszeiten für komplett hydrolysierte TAMRA-funktionalisierte Siloxane erhöht. In Abbildung S9 sind exemplarisch HPLC-Chromatogramme bei pH 7.0 abgebildet. Die auf diese Weise bestimmten Halbwertszeiten zwischen pH 6.5 und 9.0 sind in Abbildung 3c gezeigt. Auf diese Weise wurde die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  in PBS, pH 7.4, zu 252 Minuten bestimmt. Der Abbau bei neutralem pH ist zudem exemplarisch in Abbildung 3d gezeigt.

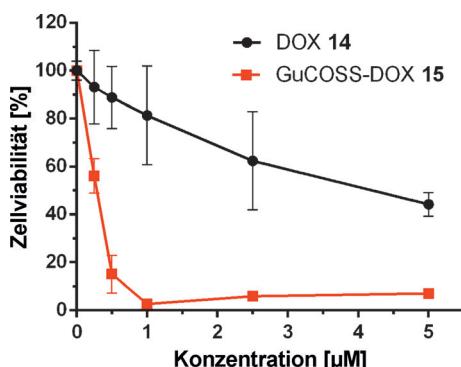
Um den Abbau des COSS-basierten Transportsystems in lebenden Zellen zu untersuchen, synthetisierten wir COSS-Derivat **9**, an das die beiden Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescein und TAMRA gekuppelt wurden (Abbildung 3a). Da beide Fluorophore an denselben Silsesquioxankern gekoppelt sind, ist der Abstand ausreichend, um die Fluoreszenz von Fluorescein durch einen Förster-Energetransfer (FRET; Abbildung S10) effizient zu unterdrücken. Da der anorganische Kern während des hydrolytischen Abbaus zerfällt, wird entweder Fluorescein oder TAMRA vom Siloxankern abgetrennt und die Fluoreszenz von Fluorescein wieder hergestellt. Mit Anregung bei 488 nm wurde die Zunahme der Emission bei 520 nm gemessen, um den Anteil des teilweise abgebauten Transportmoleküls zu quantifizieren. Basierend auf der Wiederherstellung der Fluoreszenz von Fluorescein wurde in humanem Serum eine Halbwertszeit von 186 Minuten berechnet, was auf eine ausreichende Stabilität für In-vivo-Anwendungen hindeutet (Abbildung S11). Da im Rahmen der HPLC-Analysen der Abbau bis hin zu den

Endprodukten untersucht werden konnte, war die auf diese Weise bestimmte Halbwertszeit erheblich länger (252 Minuten bei pH 7.4). In früheren Studien wurden die Halbwertszeiten von zellpenetrierenden Peptiden in Gegenwart von Serum bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass diese innerhalb von Minuten abgebaut werden (e.g.  $t_{1/2} = 5$  min für Penetratin).<sup>[18]</sup> Dieser schnelle Abbau wird sehr wahrscheinlich durch Proteolyse verursacht. Die Ergebnisse unserer Versuche lassen den Schluss zu, dass das COSS-basierte Transportmolekül für proteolytische Enzyme nicht als Substrat dient und die Geschwindigkeit des Abbaus von **9** in erster Linie durch den pH-Wert bestimmt wird.

Um den Abbauprozess besser zu verstehen, verfolgten wir das Auftauchen der Fluoreszenz von Fluorescein nach Aufnahme von **9** in lebende HeLa-Zellen über Konfokalmikroskopie (Abbildung 3b, Abbildung S12). Dabei wurde eine Halbwertszeit von 149 Minuten bestimmt und die vollständige Wiederherstellung der Fluoreszenz innerhalb von 11 Stunden beobachtet. Diese experimentell bestimmte Halbwertszeit liegt in der gleichen Größenordnung wie die, die bei der Inkubation in humanem Serum erhalten wurden ( $t_{1/2} = 186$  Minuten).

Die Eignung des GuCOSS-Gerüsts als molekularer Transporter wurde durch den Transport des cytotoxischen und antitumoralen Wirkstoffs Doxorubicin (DOX, **14**) geprüft.<sup>[19]</sup> Doxorubicin induziert durch DNA-Interkalation Apoptose in Krebszellen.<sup>[20]</sup> Daher ist es offensichtlich, dass DOX seine therapeutische Wirkung nur ausüben kann, wenn der Wirkstoff in den Zellkern gelangt. Da die Aufnahme in das Tumorgewebe aber nur durch passive Diffusion erfolgt, ist die Effizienz des ansonsten hochwirksamen DOX begrenzt.<sup>[21]</sup> Als Modellsubstanz für schlecht zellgängige Wirkstoffe kuppelten wir **14** als funktionelle Fracht über eine Disulfidbrücke an GuCOSS und erhielten so das Konjugat **15** (SI 5.2). Die Disulfidbrücke wird nach der Zellaufnahme schnell im reduktiven Milieu des Zytosols gespalten, was die Freisetzung des Wirkstoffes in der Zelle ermöglicht.<sup>[22]</sup>

Der Transport von DOX in HeLa-Zellen wurde untersucht. Dazu wurde zuerst die Wirkung von freiem DOX nach unterschiedlichen Inkubationszeiten getestet (SI 4.0, 5.1). Wegen der langsamen Zellaufnahme des freien DOX korrelierte die Zahl an abgetöteten Zellen mit der Inkubationszeit (Abbildung S13). In einem weiteren Versuch wurde **15** zusammen mit den Kontrollen (freies DOX (**14**) und unbehandelte Zellen) bei identischen Konzentrationen für eine Stunde inkubiert (SI 3.0). Im Anschluss wurden die Zellen mit DMEM gewaschen und nach 18 Stunden wurde ein MTT-Lebendzellzahlbestimmung durchgeführt (Abbildung 4). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass das Konjugat **15** im Vergleich zum freien Wirkstoff **14** eine erhöhte zytotoxische Wirkung aufweist. Als einer der wichtigsten Wirkstoffe in der Krebstherapie verursacht freies Doxorubicin irreversible Herzschäden,<sup>[23]</sup> während liposomale Formulierungen<sup>[24]</sup> diese Nebenwirkungen abschwächen,<sup>[23]</sup> die Wirksamkeit aber nicht verringern.<sup>[25]</sup> Von aktuell in der Literatur diskutierten Formulierungen, die durch die gemeinsame Verkapselung von DOX mit Listeriolysin O den Transport in den Zellkern einiger Krebszelllinien verbessern, wird jedoch angenommen, dass diese hoch immunogen sind.<sup>[26]</sup>



**Abbildung 4.** Zellviabilitätstest (MTT): Vergleich der zytotoxischen Wirkung von freiem Doxorubicin (DOX, 14) und dem DOX-COSS-Konjugat 15. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Da das GuCOSS-Transportsystem eine hoch effiziente Zellpenetration mit geringer Größe, geringer Toxizität und biologischer Abbaubarkeit vereint, glauben wir, dass es in der praktischen Anwendung eine Reihe von Vorteilen bietet. Um dieses Potenzial zu prüfen, werden in der nächsten Phase Tierversuche nötig sein, in denen z. B. die kardiotoxischen Effekte im Vergleich zur liposomalen Formulierung von Doxorubicin untersucht werden. Weiterhin wäre es interessant zu sehen, ob die Zellaufnahme anderer Zytostatika mit geringer Zellgängigkeit, z. B. Hygromycin,<sup>[27]</sup> durch die Anbindung an COSS verbessert werden kann.

Zusammengefasst haben wir eine neue Generation zellpenetrierender Verbindungen entwickelt, die auf dem organisch-anorganischen kubisch-oktameren Silsesquioxan-Gerüst basieren. Dabei fanden wir heraus, dass das mit Guanidinogruppen funktionalisierte Derivat Zellen aus allen drei Domänen des Lebens penetrieren kann und im Vergleich zum zellpenetrierenden Peptid TAT eine 155-fach erhöhte Aufnahme in HeLa-Zellen zeigt. Fluoreszenzmarkierte GuCOSS werden bereits bei zweistellig nanomolaren Konzentrationen sehr schnell von Zellen aufgenommen. GuCOSS sind darüber hinaus wenig toxisch, zersetzen sich unter physiologischen Bedingungen innerhalb von 11 Stunden und sind auch in Gegenwart von Serum aktiv. Damit sind diese Silsesquioxane vielversprechende Kandidaten für den In-vivo-Transport von Wirkstoffen. In Anbetracht der geringen Größe des organisch-anorganischen Hybridmoleküls ist die Wahrscheinlichkeit des Auslösens einer Immunantwort als gering anzusehen. Wir glauben, dass die GuCOSS-Plattform die Auswahl an ungiftigen und hocheffizienten Transportern für die Entwicklung moderner Therapeutika erweitert.

## Danksagung

Wir danken Dr. Anna-Lena Krause (Nationales Zentrum für Tumorerkrankungen, DKFZ, Heidelberg) für ihre Unterstützung bei der Interpretation der durchflusszytometrischen Untersuchungen, Thomas Pirzer für die Bereitstellung der HeLa-Zellen und PD Dr. Arnulf Kletzin (Fachbereich Biologie, Technische Universität Darmstadt) für die Bereitstellung von *Sulfolbacter* und *Archaea*.

**Stichwörter:** COSS · Silsesquioxane · Wirkstofftransport · Zellpenetration · Zellpenetrierende Verbindung

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 14842–14846  
*Angew. Chem.* **2016**, *128*, 15063–15068

- [1] L. Pauling, H. A. Itano, S. J. Singer, I. C. Wells, *Science* **1949**, *110*, 543–548.
- [2] D. Derossi, M. H. Joliot, G. Chassaing, M. Prochiantz, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 10444–10450.
- [3] a) A. Ho, S. R. Schwarze, S. J. Mermelstein, G. Waksman, S. F. Dowdy, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 474–477; b) A. Nasrolahi Shirazi, R. Tiwari, B. S. Chhikara, D. Mandal, K. Parang, *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 488–499; c) P. A. Wender, D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman, J. B. Rothbard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 13003–13008; d) P. A. Wender, J. B. Rothbard, T. C. Jessop, E. L. Kreider, B. L. Wylie, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13382–13383.
- [4] a) V. Bagnacani, V. Franceschi, M. Bassi, M. Lomazzi, G. Donofrio, F. Sansone, A. Casnati, R. Ungaro, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1721; b) S. Bersani, S. Salmaso, F. Mastrotto, E. Ravazzolo, A. Semenzato, P. Caliceti, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1415–1425; c) Z. G. Chen, *Trends Mol. Med.* **2010**, *16*, 594–602; d) N. W. Luedtke, P. Carmichael, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12374–12375; e) M. Okuyama, H. Laman, S. R. Kingsbury, C. Visintin, E. Leo, K. L. Eward, K. Stoeber, C. Boshoff, G. H. Williams, D. L. Selwood, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 153–159; f) J. Valero, M. Van Gool, R. Perez-Fernandez, P. Castreno, J. Sanchez-Quesada, P. Prados, J. de Mendoza, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5417–5430.
- [5] a) Y. A. Fillon, J. P. Anderson, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11798–11803; b) N. P. Gabrielson, H. Lu, L. Yin, D. Li, F. Wang, J. Cheng, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1143–1147; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1169–1173; c) G. Lättig-Tünemann, M. Prinz, D. Hoffmann, J. Behlke, C. Palm-Apergi, I. Morano, H. D. Herce, M. C. Cardoso, *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 453; d) D. Mandal, A. Nasrolahi Shirazi, K. Parang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9633–9637; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 9807–9811; e) A. Nasrolahi Shirazi, R. K. Tiwari, D. Oh, B. Sullivan, K. McCaffrey, D. Mandal, K. Parang, *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 3137–3151; f) H. Tang, L. Yin, K. H. Kim, J. Cheng, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 3839.
- [6] K. K. Maiti, W. S. Lee, T. Takeuchi, C. Watkins, M. Fretz, D. C. Kim, S. Futaki, A. Jones, K. T. Kim, S. K. Chung, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5880–5884; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5984–5988.
- [7] S. Fabritz, S. Hörner, O. Avrutina, H. Kolmar, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2224–2236.
- [8] a) S. Fabritz, S. Hörner, D. Könning, M. Empting, M. Reinwarth, C. Dietz, B. Glotzbach, H. Frauendorf, H. Kolmar, O. Avrutina, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 6287–6293; b) D. Heyl, E. Rikowski, R. C. Hoffmann, J. J. Schneider, W. D. Fessner, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 5544–5548.
- [9] C. McCusker, J. B. Carroll, V. M. Rotello, *Chem. Commun.* **2005**, 996–998.
- [10] S. Hörner, S. Fabritz, H. D. Herce, O. Avrutina, C. Dietz, R. W. Stark, M. C. Cardoso, H. Kolmar, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2258–2265.
- [11] M. De Rosa, A. Gambacorta, A. Gliozzi, *Microbiol. Rev.* **1986**, *50*, 70–80.
- [12] a) D. Derossi, S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing, A. Prochiantz, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 18188–18193; b) S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 5836–5840; c) E. Vivès, P. Brodin, B. Lebleu, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16010–16017.

- [13] F. Duchardt, M. Fotin-Mleczek, H. Schwarz, R. Fischer, R. Brock, *Traffic* **2007**, *8*, 848–866.
- [14] M. Vazdar, E. Wernersson, M. Khabiri, L. Cwiklik, P. Jurkiewicz, M. Hof, E. Mann, S. Kolusheva, R. Jelinek, P. Jungwirth, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 11530–11540.
- [15] a) M. Kosuge, T. Takeuchi, I. Nakase, A. T. Jones, S. Futaki, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 656–664; b) I. Nakase, Y. Konishi, M. Ueda, H. Saji, S. Futaki, *J. Controlled Release* **2012**, *159*, 181–188; c) K. Park, *J. Controlled Release* **2012**, *159*, 153.
- [16] A. F. Saleh, A. Arzumanov, R. Abes, D. Owen, B. Lebleu, M. J. Gait, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1902–1911.
- [17] S. W. Jones, R. Christison, K. Bundell, C. J. Voyce, S. M. Brockbank, P. Newham, M. A. Lindsay, *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *145*, 1093–1102.
- [18] M. Hällbrink, J. Oehlke, G. Papsdorf, M. Bienert, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2004**, *1667*, 222–228.
- [19] A. M. Meredith, C. R. Dass, *J. Pharm. Pharmacol.* **2016**, *68*, 729.
- [20] a) Y. Sun, X. Yan, T. Yuan, J. Liang, Y. Fan, Z. Gu, X. Zhang, *Biomaterials* **2010**, *31*, 7124–7131; b) S. Wesselborg, I. H. Engels, E. Rossmann, M. Los, K. Schulze-Osthoff, *Blood* **1999**, *9*, 3053–3063.
- [21] A. I. Minchinton, I. F. Tannock, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 583–592.
- [22] G. Saito, J. A. swanson, K. D. Lee, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 199–215.
- [23] T. Safra, *Oncologist* **2003**, *8*, 17–24.
- [24] A. L. B. Seynhaeve, B. M. Dicheva, S. Hoving, G. A. Koning, T. L. M. ten Hagen, *J. Controlled Release* **2013**, *172*, 330–340.
- [25] a) L. Harris, G. Batist, R. Belt, D. Rovira, R. Navari, N. Azarnia, K. Welles, E. Winer, T. D.-S. Grp, *Cancer* **2002**, *94*, 25–36; b) E. Rivera, *Oncologist* **2003**, *8*, 3–9.
- [26] a) J. A. Carrero, H. Vivanco-Cid, E. R. Unanue, *Plos One* **2012**, *7*, e32310; b) Z. F. Walls, H. Gong, R. J. Wilson, *Mol. Pharm.* **2016**, *13*, 1185–1190.
- [27] J. C. Lacal, L. Carrasco, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1983**, *24*, 273–275.

Eingegangen am 22. Juni 2016,  
veränderte Fassung am 27. September 2016  
Online veröffentlicht am 24. Oktober 2016