



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA**
Uniwersytet Łódzki

Stacjonarne Studia Doktoranckie
Genetyki Molekularnej, Cytogenetyki
i Biofizyki Medycznej

Michał Gorzkiewicz

**Dendrymery polipropylenoiminowe
jako nośniki przeciwnowotworowych
nukleotydów adenzynowych**

Poly(propyleneimine) dendrimers as carriers
of anticancer adenosine nucleotides

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Biofizyki Ogólnej
Instytutu Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego

pod kierunkiem
prof. dr hab. Barbary Klajnert-Maculewicz

Streszczenie w języku polskim

Leki z grupy analogów adenozynowych należą do antymetabolitów o szerokim zastosowaniu w leczeniu białaczek i chłoniaków. Jednakże związki te dla swojej aktywności cytotoksycznej wymagają ułatwionego transportu dokomórkowego za pośrednictwem specyficznych transporterów błonowych oraz fosforylacji przez kinazy wewnątrzkomórkowe, skutkującej tworzeniem aktywnych form trójfosforanowych. Tak złożony metabolizm może prowadzić do zmniejszenia efektu terapeutycznego i wystąpienia oporności komórkowej związanej z obniżeniem ekspresji transporterów lub aktywności wewnątrzkomórkowych kinaz. W celu pokonania tych ograniczeń i zwiększenia skuteczności terapii przeciwnowotworowej z wykorzystaniem analogów adenozynowych, zaproponowano bezpośredni dokomórkowy transport aktywnych, trójfosforanowych form leków za pomocą nanonośników.

Liczne badania potwierdziły, że rozgałęzione dendrymery o ściśle określonej strukturze są dobrymi kandydatami na nośniki leków. Dowiedziono, że dendrymery mogą przenosić dużą liczbę cząsteczek aktywnych, jednocześnie zapewniając ich zwiększoną rozpuszczalność i kontrolowaną biodystrybucję. Ponadto niewielki rozmiar i kulisty kształt tych polimerów sprzyjają ich wnikaniu do komórek i długotrwałemu krążeniu we krwi.

Dendrymery kationowe mogą tworzyć stabilne niekowalencyjne kompleksy z lekami naładowanymi ujemnie, jednak ich toksyczność ogranicza bezpośrednie zastosowanie kliniczne. Dlatego też w celu zmniejszenia dodatniego ładunku powierzchniowego dendrymerów wprowadza się kowalencyjne modyfikacje ich powierzchni, na przykład za pomocą reszt cukrowych. Ponieważ analogi adenozynowe są najczęściej stosowane jako leki przeciwbiałczkowe, wykorzystanie glikodendrymerów jako nośników jest w tym przypadku szczególnie uzasadnione: komórki białczkowe wykazują zwykle nadekspresję powierzchniowych receptorów lektynowych o wysokim powinowactwie do ligandów cukrowych, umożliwiając specyficzną endocytozę i ograniczając działania niepożądane leków.

Głównym celem niniejszej pracy była charakterystyka kompleksów nukleotydów adenozynowych z dendrymerami polipropylenoiminowymi generacji 4 (PPI G4) oraz ocena możliwości zastosowania ich w terapii przeciwnowotworowej.

Pierwszy etap badań obejmował zastosowanie izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego i miareczkowania z pomiarem potencjału zeta do oznaczenia

stechiometrii i parametrów termodynamicznych oddziaływań między dendrymerami PPI (w formie niezmodyfikowanej lub częściowo zmodyfikowanej resztami maltozy lub maltotriozy) i 5'-trójfosforanem adenozy (ATP), zastosowanym jako modelowy nukleotyd adenozy. Wykazano, że dendrymery PPI mogą skutecznie oddziaływać z nukleotydami i tworzyć stabilne kompleksy poprzez oddziaływania elektrostatyczne między zjonizowanymi grupami fosforanowymi trójfosforanu i aminowymi dendrymeru. Proces kompleksowania jest spontaniczny, napędzany entalpią i zależy od składu i pH buforu. Wyznaczone optymalne stosunki liczby cząsteczek nukleotydu do dendrymeru w kompleksie zastosowano w dalszych badaniach.

Kolejne doświadczenia z zastosowaniem kompleksu dendrymeru PPI o powierzchni zmodyfikowanej maltozą (PPI-Mal OS G4) i trójfosforanu fludarabiny (Ara-FATP), przeprowadzone na ludzkich liniach komórek białaczkowych hodowanych w warunkach *in vitro* (CCRF, THP-1, U937) wykazały, że Ara-FATP ma ograniczoną aktywność cytotoksyczną w stosunku do badanych komórek w porównaniu do formy nukleozydowej leku (Ara-FA), natomiast kompleksowanie z glikodendrymerem znacznie zwiększa jego toksyczność. Ponadto wykazano, że transport za pośrednictwem białka hENT1 jest etapem ograniczającym toksyczność Ara-FA, podczas gdy kompleksowanie z PPI-Mal OS G4 pozwala Ara-FATP zabijać komórki nawet w obecności inhibitora hENT1. Wskazuje to, że zastosowanie glikodendrymerów jako nośników leków może pozwolić na pokonanie lekooporności związanej ze zmniejszoną aktywnością transporterów błonowych. W końcowym etapie tej części badań udowodniono, że tworzenie kompleksu nie zmienia specyficznego wewnątrzkomórkowego mechanizmu działania Ara-FATP, związanego z hamowaniem syntezy DNA i RNA oraz indukowaniem apoptozy na drodze wewnątrzpochodnej.

Ponieważ doświadczenia te nie dostarczyły bezpośredniego dowodu na niezależny od hENT1 dokomórkowy transport nukleotydu przez dendrymer, w kolejnym etapie badań opracowano metodę syntezy znakowanego izotopowo trójfosforanu fludarabiny. Pozwoliło to ostatecznie udowodnić zdolność kompleksu nukleotyd-glikodendrymer do wewnątrzkomórkowego dostarczenia leku bez udziału błonowych transporterów nukleozydów.

Biorąc pod uwagę tak obiecujące wyniki, w dalszym toku badań zastosowano klofarabinę (CAFdA), lek z grupy analogów adenozytowych drugiej generacji, w celu

weryfikacji hipotezy, że dendrymery PPI mogą służyć jako uniwersalne nośniki terapeutycznych nukleotydów. Wykorzystując technikę powierzchniowego rezonansu plazmonowego i modelowanie molekularne w celu scharakteryzowania właściwości kompleksów lek-dendrymer, wykazano, że trójfosforan klofarabiny (CAFdATP) charakteryzuje się znacząco różnymi oddziaływaniami z dendrymerami PPI w porównaniu z Ara-FATP, co prowadzi do odmiennego efektu terapeutycznego kompleksu (zmniejszonej, a nie zwiększonej aktywności cytotoksycznej). Na tej podstawie postawiono hipotezę, że silniejsze oddziaływania CAFdATP z dendrymerami PPI i jego zdolność do maskowania dodatniego ładunku powierzchniowego tych polimerów mogą ograniczyć potencjał kompleksów do przenikania przez błonę komórkową i wewnątrzkomórkowego uwalniania leku.

W końcowym etapie badań zastosowano pomiary potencjału zeta, ultrafiltrację i frakcjonowanie przepływowe w asymetrycznym polu sił przepływu w celu określenia powierzchniowego potencjału elektrostatycznego i stabilności kompleksów nukleotyd-dendrymer. Zgodnie z oczekiwaniami, CAFdATP wykazał znacznie silniejszą tendencję do maskowania dodatniego ładunku powierzchniowego dendrymerów PPI niż Ara-FATP i do tworzenia stabilniejszych kompleksów niezależnie od warunków środowiskowych. Wyniki te wskazują na prawdziwość hipotezy dotyczącej potencjalnie zmniejszonego wychwytu komórkowego i wewnątrzkomórkowego uwalniania CAFdATP z kompleksu, co może ograniczyć potencjał dostarczania tego leku przez dendrymery PPI.

Podsumowując, przeprowadzone badania wskazują na możliwość zastosowania dendrymerów PPI jako nośników dla adenozynowych leków nukleotydowych w celu zwiększenia ich stężenia wewnątrzkomórkowego oraz aktywności przeciwnowotworowej. Należy jednak podkreślić fakt, że stabilność i właściwości kompleksów nukleotyd-dendrymer silnie zależą od warunków środowiskowych, a także od struktury chemicznej leku, co należy wziąć pod uwagę podczas projektowania doświadczeń zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*.

Streszczenie w języku angielskim

Adenosine analogue drugs constitute a class of antimetabolites with a wide range of applications in the therapy of leukemias and lymphomas. However, for their cytotoxic activity, these compounds require facilitated transfer through the cell membrane by specialized nucleoside transporters and activation by intracellular kinases leading to formation of active triphosphate forms. This complex metabolism may lead to diminished therapeutic outcome and emergence of drug resistance due to downregulation of transporter expression or decreased activity of intracellular kinases. For the circumvention of these obstacles and enhancement of efficacy of anticancer chemotherapy with adenosine analogues, the direct intracellular delivery of active triphosphates by nanocarrier systems has been proposed.

Numerous studies confirmed that highly-branched dendrimers of well-defined structure are superior to other nanoparticles with regard to drug delivery. Dendrimers provide high loading capacity, as well as improved solubility and biodistribution of drugs. Their nanometric size and globular shape favour cell entry and prolong blood circulation time.

While cationic dendrimers form stable non-covalent complexes with anionic drugs, their inherent toxicity hampers their direct clinical application. Thus, surface covalent modifications, including glycosylation, have been introduced in order to reduce positive charge of the dendrimers. Since adenosine analogues are most often used as antileukemics, the use of glycodendrimers is especially justified: leukemic cells usually overexpress surface lectin receptors with high affinity for carbohydrate ligands, enabling receptor-mediated endocytosis and decreasing the detrimental side effects on healthy tissues.

The present work aimed at characterisation of complexes of adenosine nucleotides and poly(propyleneimine) dendrimers of the 4th generation (PPI G4), and the assessment of their applicability in anticancer therapy.

In the first stage of research, isothermal titration calorimetry and zeta potential titration have been applied for the determination of stoichiometry and thermodynamic parameters of interactions between PPI dendrimers (unmodified or partially surface-modified with maltose or maltotriose) and adenosine-5'-triphosphate (ATP) as a model adenosine nucleotide. It has been shown that PPI dendrimers possess the ability to

efficiently interact with nucleoside triphosphates and to form stable complexes via electrostatic interactions between the ionized phosphate and amino groups on the nucleotide and the dendrimer, respectively. The complexation process is spontaneous, enthalpy-driven and depends on buffer composition and pH. The determined optimal nucleotide-dendrimer ratios have been used in subsequent studies.

Further experiments in *in vitro*-cultured leukemic cell lines (CCRF, THP-1, U937) using complexes of maltose-modified PPI dendrimer (PPI-Mal OS G4) and fludarabine triphosphate (Ara-FATP) have shown that Ara-FATP has limited cytotoxicity towards investigated cells compared to the nucleoside form (Ara-FA), but the complexation with glycodendrimer significantly increases its activity. Moreover, it has been shown that the transport via hENT1 transporter is a limiting step for the toxicity of Ara-FA, while complexation with PPI-Mal OS G4 allows Ara-FATP to kill cells even in the presence of hENT1 inhibitor. Thus, the use of glycodendrimers for drug delivery may allow to circumvent the cellular resistance associated with decreased transporter activity. Finally, it has been demonstrated that complex formation does not change the specific intracellular action of Ara-FATP, preserving its ability to inhibit nucleic acid synthesis and induce apoptosis via the intrinsic pathway.

Since these experiments do not provide a direct proof of the hENT1-independent intracellular transport of the nucleotide by the dendrimer, in the next stage of research a novel synthesis technique for radioactively-labelled fludarabine triphosphate has been devised, allowing to demonstrate the ability of nucleotide-glycodendrimer complex to deliver the drug into the cells without the involvement of membrane nucleoside transporters.

Considering these promising results, in the further course of studies, clofarabine (CAFdA), an adenosine analogue drug of the second generation, has been applied to verify the hypothesis that PPI dendrimers may serve as universal carriers for therapeutic nucleotides. Using surface plasmon resonance and molecular modelling to elucidate the properties of drug-dendrimer complexes, it has been shown that clofarabine triphosphate (CAFdATP) exhibits significantly different molecular interactions with PPI dendrimers in comparison to Ara-FATP, leading to different therapeutic outcome of the complex (decreased rather than increased cytotoxicity). It has been hypothesized that stronger interactions of CAFdATP with PPI dendrimers and its ability to mask surface positive

charge of these macromolecules may decrease the capacity of the complexes to cross cell membrane and release the drug.

In the final stage of studies, zeta potential measurements, ultrafiltration, and asymmetric flow field-flow fractionation have been applied for the determination of surface electrostatic potential and stability of nucleotide-dendrimer formulations. Indeed, CAFdATP has shown a significantly higher tendency to mask positive surface charge of PPI dendrimers than Ara-FATP, and to form stronger complexes regardless of environmental conditions. These results support the hypothesis of potentially reduced cellular uptake and intracellular release of CAFdATP from the complex, which may decrease the delivery potential of PPI macromolecules in case of this drug.

In conclusion, the performed studies indicate the potential of the application of PPI dendrimers as carriers for adenosine nucleotide drugs in order to enhance their intracellular concentration, leading to improved therapeutic outcome. However, it is crucial to note that the stability and properties of nucleotide-dendrimer complexes strongly depend on the environmental conditions and the chemical structure of the drug, which should be taken into account during the design of both *in vitro* and *in vivo* studies.



Michał Gorzkiewicz