

# Bioaktive Nanovehikel aus Proteinpolymeren\*\*

Elisabeth Garanger\* und Sébastien Lecommandoux\*

Bioaktive Nanopartikel · Elastinartige Polypeptide ·

Polymermaterialien · Proteinpolymere ·

Selbstorganisation

Die nanomedizinische Forschung ebnet den Weg für den Einsatz nanoskopischer Wirkstoffträger und ist darin begriffen, eine wirkliche Alternative zur traditionellen medizinischen Chemie mit verträglicheren und wirksameren Medikamenten zu werden. Die Verfügbarkeit theranostischer Nanopartikel, die es dem Kliniker erlauben, Krankheitsherde sichtbar zu machen, sie lokal zu behandeln und ihren Verlauf zu verfolgen, versprechen immense Möglichkeiten im Bereich der gezielten und personalisierten Medizin. Die wenigen Nanowirkstoffträger, die bereits klinische Zulassung erlangt haben und auf dem Markt sind, wurden aus biologisch inerten Molekulargerüsten aufgebaut (Phospholipide, Polymere, Tarnproteine) und haben eine Verbesserung pharmakologischer Eigenschaften (Verweilzeit, Verteilung und Abbau im Körper) ermöglicht. Von der nächsten Generation an Nanowirkstoffträgern wird nun erwartet, dass sie ein aktives Trägergerüst haben, das in der Lage ist, mit spezifischen Geweben, Mikroumgebungen, Zellen und subzellulären Komponenten zu interagieren, auf lokale Umgebungsreize zu reagieren, ihre therapeutische Fracht in räumlich und zeitlich steuerbaren Prozessen freizusetzen und diagnostische Signale in Echtzeit auszusenden.

Zum Erreichen dieses Ziels erweisen sich Nanovehikel aus selbstorganisierten Copolymeren als extrem attraktiv. Selbstorganisierte Polymernanopartikel können durch Anbindung biologisch relevanter, rezeptorspezifischer Liganden (Saccharide, Peptide, ganze Antikörper oder Fragmente, Aptamere, niedermolekulare Spezies) gezielt mit gewünschten Eigenschaften ausgestattet werden. Zum jetzigen Zeitpunkt sind zwei ligandmodifizierte Polymernanopartikelsysteme (BIND-014 und CALAA-01) in die klinische Testphase I gelangt.<sup>[1]</sup> Allerdings sind Strategien zur Oberflächenfunktionalisierung selbstorganisierter Partikel (Abbildung 1A) mit gewissen Fallstricken behaftet, sobald es um die

klinische Umsetzung geht. Skalierbarkeit und Reproduzierbarkeit erweisen sich als schwierig, wenn mehrere Funktionalitäten unabhängig voneinander eingeführt werden sollen. Natürlich ist es nicht hinnehmbar, für die Entwicklung besserter Wirkstofftransportsysteme eine geringere strukturelle Präzision des Trägermaterials in Kauf zu nehmen. Ein Ansatz zur Lösung dieses Problems sind Materialien, die den „Code“ sowohl zur Selbstorganisation als auch zur Einführung biologischer Funktionalitäten schon in sich tragen – ganz ähnlich wie natürliche Moleküle, die biologische Selbstorganisationen bilden. Besonders interessant sind Makromoleküle, die die vorteilhaften Eigenschaften von Blockcopolymeren (orthogonale Löslichkeit der Blöcke, Fähigkeit zur Selbstorganisation, Elastizität) mit denen von Peptiden und Protein-domänen (Sekundärstruktur, biologische Aktivität, Zielort-spezifität, Diversität, Biokompatibilität) in sich vereinen.

Zu diesem Zweck wurden synthetische amphiphile Polymer-Peptid- und Polymer-Protein-Konjugate entwickelt. Polymer-Peptid-Chimären erhält man durch kovalente Anbindung biologisch relevanter Peptidfragmente an synthetische Polymerketten (Abbildung 1B). Der amphiphile Charakter des Polymers sorgt für die Fähigkeit zur Selbstorganisation, während die Peptidsequenz den resultierenden selbstorganisierten micellaren oder vesikulären Strukturen ihre biologische Aktivität verleiht. Außerordentlich komplexe synthetische Architekturen wurden auf diese Weise entworfen.<sup>[2]</sup> Bedenkt man jedoch die extreme Diversität, die durch Verknüpfen der zwanzig natürlichen proteinogenen Aminosäurebausteine theoretisch erreicht werden kann, so erscheinen die selbstorganisierten Nanopartikel aus Polymer-Peptid-Konjugaten, die bis dato beschrieben wurden, als vergleichsweise primitiv.<sup>[3]</sup> Tatsächlich handelt es sich bei den meisten Peptidblöcken um Polyaminoäuren und nicht um echte biomimetische Peptide. Darüber hinaus gewähren konventionelle Polymerisationsprozesse nur eine begrenzte Kontrolle über die makromolekulare Architektur (Primärstruktur, Länge).

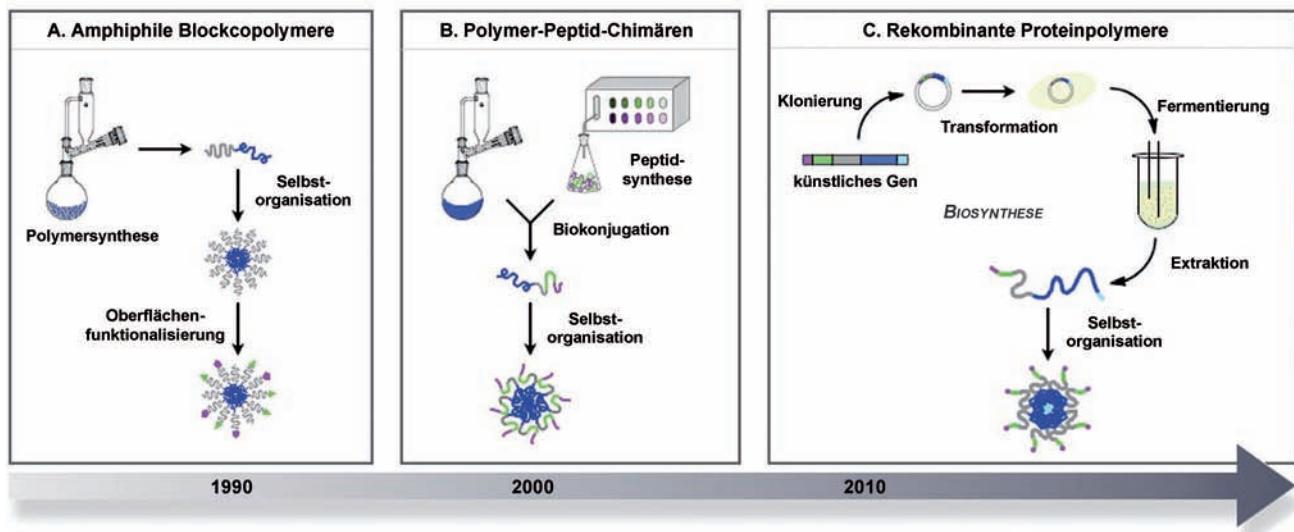
Um diese Beschränkungen zu überwinden, haben Materialwissenschaftler im letzten Jahrzehnt Techniken des Protein-Engineerings aufgegriffen, um durch rekombinante Methoden proteinartige Polymere *de novo* herzustellen. Diese hauptsächlich aus sich wiederholenden Peptidsequenzen aufgebauten Makromoleküle sind von ihren Erfindern als „Proteinpolymere“, „rekombinante Polymere“ und „Rekombinamere“ bezeichnet worden.<sup>[4]</sup> Im Prinzip wird so vorgegangen, dass man ein künstliches Gen entwirft, das für das

[\*] Dr. E. Garanger

Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques (UMR5629)  
Institut Européen de Chimie et Biologie  
2 rue Robert Escarpit, 33607 Pessac (Frankreich)  
E-Mail: garanger@enscbp.fr

Prof. Dr. S. Lecommandoux  
Université de Bordeaux, CNRS, LCPO, UMR5629  
16 avenue Pey Berland, 33607 Pessac Cedex (Frankreich)  
E-Mail: lecommandoux@enscbp.fr

[\*\*] Wir danken dem GIS-AMA- und dem ESF P2M-Projekt für finanzielle Unterstützung.



**Abbildung 1.** Strategien zum Aufbau von Nanovehikeln auf der Grundlage bioaktiver Polymere: von synthetischen Blockcopolymeren zu biosynthetischen Proteinpolymeren.

vollständige Makromolekül codiert, einschließlich struktureller Polymersequenzen und spezifischer Peptidmotive, die die gewünschten biologischen Aktivitäten (rezeptorbindende, stimuliresponsive, physikalisch vernetzbare und enzymatisch abbaubare Motive) an strategischen Stellen des Proteinpolymergerüstes platzieren (Abbildung 1C). Das maßgeschneiderte Gen wird dann in einen Expressionsvektor kloniert, transformiert und in einem geeigneten heterologen Wirt exprimiert. Zu den signifikanten Vorteilen der Methode gehören: 1) eine potentiell riesige Freiheit und Kreativität beim Materialdesign dank unendlicher Kombinationen von Aminosäurebausteinen; 2) die Monodispersität und ausgezeichnete Kontrolle über die Sequenz (Primärstruktur) und Länge (im Gegensatz zu chemisch synthetisierten Polymermaterien); 3) die Möglichkeit zur Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen, was mit polydispersen Polymeren extrem schwierig ist; 4) die erreichbare Moleküllänge im Vergleich zu traditionellen Fest- oder Flüssigphasenpeptidsynthesen; 5) die Skalierbarkeit auf große und/oder kontinuierliche Reaktoren mit perfekter Reproduzierbarkeit.

Die meisten rekombinanten Polymere, die bislang spezifisch für die Entwicklung von Wirkstoffnanovehikeln beschrieben wurden, beruhen auf der Pentapeptideinheit [-VPGXG-], die aus der hydrophoben Domäne des Elastins abgeleitet ist. Elastinartige Polypeptide (EAPs) weisen eine untere kritische Lösungstemperatur ( $T_c$ ) auf, die einen doppelten Nutzen hat: Erstens ist  $T_c$  ein Mittel zur Steuerung des Selbstorganisationsprozesses, und zweitens vereinfacht das Auftreten einer  $T_c$  die Isolierung und Aufreinigung des Proteinprodukts aus dem Lysat. Seit der Beschreibung des ersten Diblock-ELP bestehend aus konsekutiven hydrophilen und lipophilen Blöcken, die zu nanometergroßen Micellen organisiert waren,<sup>[5]</sup> wurden erhebliche Fortschritte erzielt. Umfassende Studien zum Entwurf von ELP-Blockcopolymeren haben kritische Parameter aufgezeigt (Verhältnis von hydrophilen zu hydrophoben Blöcken, Copolymergröße, Verteilung der polaren und apolaren Regionen entlang der

Polymerkette, Vernetzung), um zu stabilen monodispersen Kern-Schale-Nanopartikeln zu gelangen.<sup>[6]</sup> Das Ansprechen auf Temperaturänderungen wurde als ein Merkmal identifiziert, um eine spezifische Erkennung der Zielstruktur und die Anreicherung von ELPs *in vivo* auszulösen. Eine Anreicherung von ELPs in Tumoren kann durch lokale thermische Kreisläufe herbeigeführt werden. Dabei kommt es in der Aufheizphase zur lokalen Aggregation der ELPs, während nach Rückkehr zu normaler Körpertemperatur die Aggregate unter massiver Extravasation wieder gelöst werden.<sup>[7]</sup> Mehrere Versuche, biologisch aktive Peptidmotive auf der Oberfläche von ELP-Nanopartikeln zu präsentieren, erwiesen sich bereits als erfolgreich. So beschrieben Chilkoti und Mitarbeiter ein rekombinantes Diblock-ELP mit einer  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin erkennenden linearen GRGDS-Startsequenz, das oberhalb  $T_c$  von einem unimeren, niederaviden Zustand in einen multivalenten Liganden mit hoher Avidität übergeht.<sup>[8]</sup> Raucher und Mitarbeiter untersuchten mehrere ELPs mit fusionierten Membrantranslokationssequenzen am N-Terminus, um das Eindringen therapeutischer Peptide in Zellen zu erleichtern.<sup>[9]</sup> Ein Fusionsprodukt wurde in *E. coli* erzeugt, bestehend aus einem elastinbasierten Rekombinamer mit Penetratin-Terminus und einem Peptid zur Inhibition des Proto-Onkogens c-Myc. Die zelluläre Aufnahme und anti-proliferative Effekte wurden durch externe lokale Hyperthermie, die den Phasenübergang des ELP auslöste, verstärkt. In Anwendungen von ELPs als Wirkstoffträger wurden hochmolekulare, hydrophile ELPs auch an den C-Termini mit hydrophoben Doxorubicinderivaten konjugiert, was zur Selbstorganisation zu Partikeln mit wirkstofffreiem Kern umgeben von einer löslichen Proteinhülle führte. In vivo zeigte die Wirkstoff-Nanopartikel-Formulierung eine vierfach höhere maximal verträgliche Dosis (MTD) als Doxorubicin und induzierte eine fast vollständige Tumorregression nach Verabreichung einer einzelnen systemischen Dosis.<sup>[10]</sup> Neben den ELPs wurden in jüngster Zeit auch andere Polymere wie Seide und Resilin, welche den Trägern neue Ei-

genschaften verleihen, für Anwendungen im Wirkstofftransport beschrieben.<sup>[11]</sup>

Auf dem Weg zu hochfunktionellen Wirkstoffnanovehikeln lässt sich voraussehen, dass Proteinpolymermaterialien, die die funktionelle Komplexität nativer Proteine besser nachzubilden vermögen, gut geeignet sind, die bisher so geschätzten synthetischen Polymere zu ersetzen. Ihre Biokompatibilität und biologische Abbaubarkeit zu natürlichen Metaboliten (Aminosäuren) sind offenkundige Vorteile für biomedizinische Anwendungen. Ein möglicher Nachteil solcher Proteinstrukturen, der in die Überlegungen mit einbezogen werden muss, besteht jedoch darin, dass die oligomeren Abbauprodukte unerwünschte biologische Wirkungen haben könnten. Da rekombinante Proteinpolymere keine komplexen posttranslationalen Modifikationen erfordern, lässt sich ihre Produktion in *E. coli* im großen Maßstab kostengünstiger betreiben als die Herstellung der meisten gegenwärtig im Einsatz befindlichen rekombinanten Proteine (Antikörper), die auf Säugetierzellkulturen angewiesen sind. Die perfekte Reproduzierbarkeit der Materialstruktur, die man mit dem hier beschriebenen Prozess erzielt, ist ebenfalls ein entscheidender Parameter für zukünftige klinische und industrielle Entwicklungen.

Eingegangen am 2. November 2011

Online veröffentlicht am 15. Februar 2012

- 
- [1] J. Shi, Z. Xiao, N. Kamaly, O. C. Farokhzad, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1123–1134.

- [2] A. Carlsen, S. Lecommandoux, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2009**, *14*, 329–339.
- [3] R. Jones, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 699–700.
- [4] a) J. C. M. van Hest, D. A. Tirrell, *Chem. Commun.* **2001**, 1897–1904; b) J. C. Rodríguez-Cabello, L. Martín, M. Alonso, F. J. Arias, A. M. Testera, *Polymer* **2009**, *50*, 5159–5169; c) O. S. Rabotyagova, P. Cebe, D. L. Kaplan, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 269–289.
- [5] T. A. T. Lee, A. Cooper, R. P. Apkarian, V. P. Conticello, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 1105–1110.
- [6] a) A. Ribeiro, F. J. Arias, J. Reguera, M. Alonso, J. C. Rodriguez-Cabello, *Biophys. J.* **2009**, *97*, 312–320; b) M. R. Dreher, A. J. Simnick, K. Fischer, R. J. Smith, A. Patel, M. Schmidt, A. Chilkoti, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 687–694; c) W. Kim, J. Thevenot, E. Ibarboure, S. Lecommandoux, E. L. Chaikof, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 4353–4356; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4257–4260; d) W. Kim, J. Xiao, E. L. Chaikof, *Langmuir* **2011**, *27*, 14329–14334.
- [7] M. R. Dreher, W. Liu, C. R. Michelich, M. W. Dewhirst, A. Chilkoti, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 4418–4424.
- [8] A. J. Simnick, C. A. Valencia, R. Liu, A. Chilkoti, *ACS Nano* **2010**, *4*, 2217–2227.
- [9] G. L. Bidwell III, D. Raucher, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2010**, *62*, 1486–1496.
- [10] A. MacKay, M. Chen, J. R. McDaniel, W. Liu, A. J. Simnick, A. Chilkoti, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 993–999.
- [11] a) R. Anumolu, J. A. Gustafson, J. J. Magda, J. Cappello, H. Ghandehari, L. F. Pease III, *ACS Nano* **2011**, *5*, 5374–5382; b) K. Numata, M. R. Reagan, R. H. Goldstein, M. Rosenblatt, D. L. Kaplan, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1605–1610; c) N. K. Dutta, M. Y. Truong, S. Mayavan, N. R. Choudhury, C. M. Elvin, M. Kim, R. Knott, K. M. Nairn, A. J. Hill, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4520–4523; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4428–4431.