Baukasten der Natur

Peter R. Wich

Mit synthetischen Tools können Chemiker Biomakromoleküle so modifizieren, dass deren Materialeigenschaften neue Anwendungsgebiete erschließen, etwa in der Biomedizin.

◆ Biopolymere lassen sich entsprechend ihrer einzelnen Bausteine in drei Hauptklassen einteilen: RNA/DNA, Polypeptide/Proteine und Polysaccharide. Ähnlich wie ihre synthetischen Analoga bestehen sie aus sich wiederholenden Monomereinheiten:

- Die Verknüpfung einzelner Nukleotide führt zu einzel- oder doppelsträngigen Nukleinsäuren, also zu RNA und DNA;
- linear verknüpfte Aminosäuren reihen sich zu definierten Polypeptiden und Proteinen;
- Monosaccharide, die durch glycosidische Bindungen verbunden sind, ergeben lineare und verzweigte Polysaccharide.

Biopolymere sind nicht nur für Biologen, sondern auch für Chemiker und Materialwissenschaftler eine interessante Substanzklasse. Die Gründe dafür liegen in ihren Eigenschaften: Biopolymere sind biokompatibel, bioabbaubar, weisen niedrige Immunogenität auf und sind im Fall von Proteinen und Nukleinsäuren genau definiert aufgebaut. Anwendung finden sie nicht nur als biologisch abbaubare Werkstoffe und Verpackungen, sondern insbesondere in der biomedizinischen Forschung und in der regenerativen Medizin, etwa als Organ- und Gewebeersatz beim Tissue Engineering.

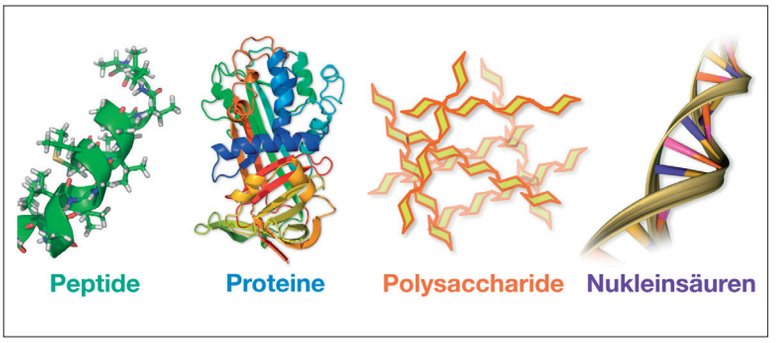


Abb. 1. Beispiele für Biopolymere, Makromoleküle natürlichen Ursprunges, aufgebaut aus definierten Wiederholungseinheiten (Aminosäuren, Zuckern bzw. Nukleotiden).

Parallel zu rein synthetischen Polymeren eroberten sich Biopolymere in den letzten Jahren auch einen Platz als Bausteine für biomedizinisch interessante Nanosysteme. Speziell beim Wirkstofftransport und in der Gentherapie entstanden durch die chemische Modifikation von Biopolymeren attraktive Systeme für therapeutische Anwendungen.

Chemische Modifikation von Biopolymeren

◆ Eine (Bio)Konjugationsmethode zu finden, ist der entscheidende Schritt in der Funktionalisierung von Biopolymeren. Anders als bei klassischen organischen Synthesemethoden sind der chemische Werkzeugkasten und die funktionellen Gruppen begrenzt, die für eine Modifikation zu Verfügung stehen (Abbildung 2).[1)]

Wichtige Kriterien bei der chemischen Modifikation von Biopolymeren sind:

- Selektivität der kovalenten Bindungen: Oft soll das Biopolymer ortsspezifisch modifiziert werden.
- Reaktivität der Bindungspartner: Gewünscht sind meist schnelle Reaktionen bei Raumtemperatur oder tiefer.
- Reaktionen müssen oft unter wässrigen oder gepufferten Bedingungen durchgeführt werden; je nach Stabilität der Biopolymere lassen sich vereinzelt auch polare Lösungsmittel wie DMSO oder Acetonitril verwenden.
- Kontrolle der Stabilität: Wenn gewünscht kann die Bindung reversibel sein, zum Beispiel spaltbar unter sauren oder reduktiven Bedingungen.

◆ QUERGELESEN

- ›› Biopolymere sind biologisch hergestellte Makromoleküle mit kettenartigen Wiederholungseinheiten. Zu ihnen zählen Peptide, Proteine, Polysaccharide sowie Nukleinsäuren.
- ›› Bioorthogonale Synthesemethoden modifizieren Biopolymere chemisch hochgradig spezifisch, ohne die ursprünglichen Funktionen und Eigenschaften zu beeinflussen.
- ›› Moderne Nanopartikelsysteme sind multifunktionale Alleskönner, die den natürlichen Vorbildern (etwa Proteinen, Viren) immer ähnlicher werden.

In allen Fällen ist abzuwägen, ob und in welchem Umfang die ursprüngliche Funktion und Aktivität des Biopolymers verloren geht, und ob dies akzeptabel ist. Beispielsweise könnten Proteine ihre dreidimensionale Struktur einbüßen oder Zucker und Nukleinsäuren ihre Löslichkeit verändern.

Mit orthogonalen Anknüpfungsstrategien gelangen in den vergangenen 20 Jahren große Fortschritte in der chemischen Modifizierung von Biopolymeren. Insbesondere Klick-Chemie-Strategien haben die zur Verfügung stehenden natürlichen Funktionalitäten stark erweitert. Durch die Weiterentwicklung der beliebten kupferkatalysierten 1,3-dipolaren Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) sind mittlerweile auch chemische Ligationstechniken entstanden, die hoch aktiv und selektiv Reaktionen in lebenden Organismen erlauben.[2)] Derartige bioorthogonale Reaktionen wie die Staudinger-Ligation oder die spannungskatalysierte Azidcycloaddition verzichten auf das toxische Kupfer und spielen heute eine wichtige Rolle in der Biopolymermodifikation. Dieses Konzept der kontrollierten chemischen Kopplung zweier funktioneller Gruppen – unabhängig von der Gegenwart anderer chemischer Funktionalitäten – erlaubt es zum Beispiel, schonend und hoch spezifisch die Oberfläche von biopolymerbasierten Nanopartikeln zu funktionalisieren.

Ausgangsmaterial für Nanopartikel

◆ Um Krebs, Schmerz- und Infektionskrankheiten zu behandeln, werden effiziente Transporter gesucht, die Wirkstoffe gezielt zu krankhaften Zellen und Geweben befördern. Dabei ist es das Ziel, die Zirkulationszeit des Arzneistoffs im Körper zu erhöhen, ihn vor Abbau zu schützen und seine Bioverfügbarkeit zu steigern. Bioabbaubare, natürlich vorkommende Biopolymere haben dabei Vorteile gegenüber synthetischen Polymeren, da ihre geringe Toxizität und Immunogenität sie meist verträglicher macht. Die Verwendung als Ausgangsmaterial für Nanopartikelsysteme gewinnt hier zunehmend an Bedeutung.

Die Entwicklung nanopartikulärer Therapeutika lässt sich bis in die 1970er Jahre zurückverfolgen. Erste liposomale und polymerkonjugierte Wirkstoffformulierungen beschrieben Gregoriadis und Ringsdorf.[3)] Die Weiter- und Neuentwicklung von Nanopartikelsystemen brachte mehrere Produkte auf den Markt, darunter Doxil. Bei diesem Krebsmedikament transportieren PEGylierte Liposome den Wirkstoff Doxorubicin.[4)]

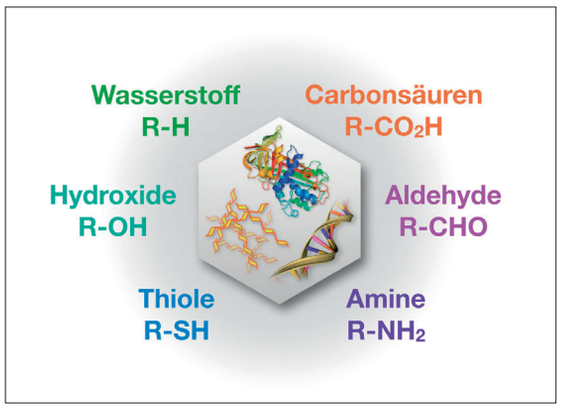


Abb. 2. Gängige funktionelle Gruppen auf Biopolymeren, die zur chemischen Modifikation genutzt werden können.

Neue analytische und synthetische Methoden lieferten dabei in den vergangenen zwei Jahrzehnten bedeutende Fortschritte für das Verständnis der grundlegenden Eigenschaften von nanopartikulären Materialien. Mit verschiedenen Biomaterialien gelang es, Nanosysteme herzustellen, die wie ihre natürlichen Vorbilder (Proteine, Enzyme oder Viren) zwischen 10 bis 100 nm groß sind (Abbildung 3).

Die DNA-Nanotechnik ist der jüngste unter den biotechnischen Ansätzen, um künstliche Nanostrukturen aus Biopolymeren herzustellen.[5)] Sie nutzt die spezifische Bindung zwischen komplementären Basen, um zwei- und dreidimensio-

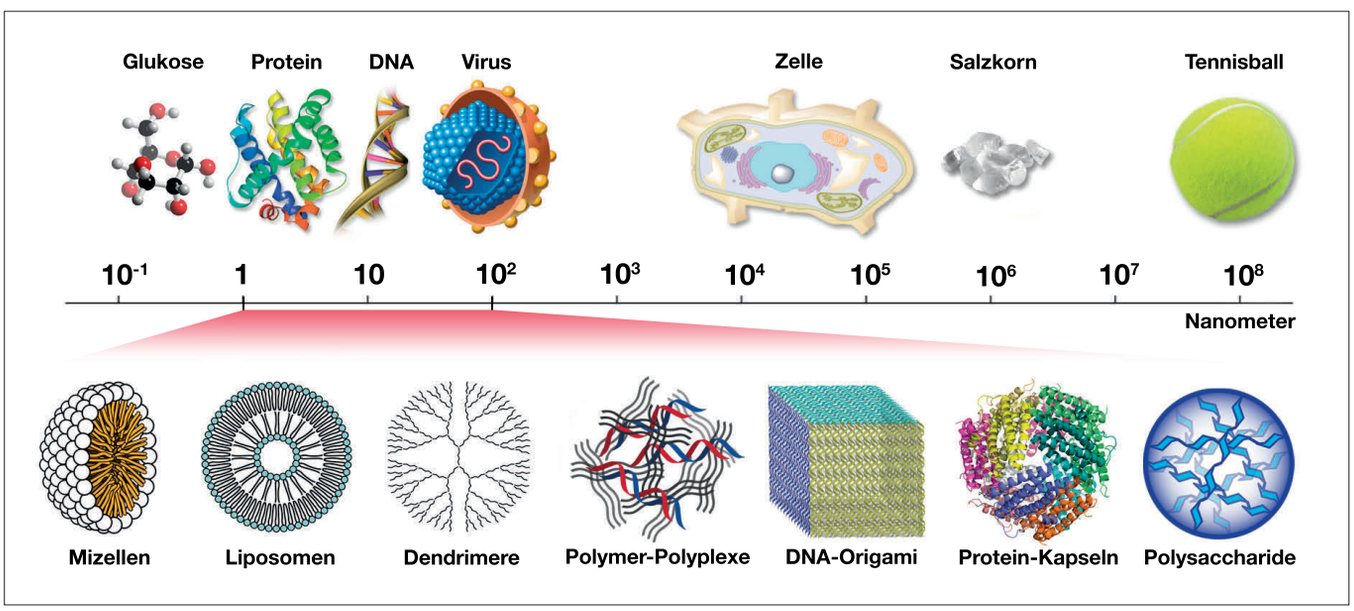


Abb. 3. Beispiele, wie Chemiker und Biotechnologen natürliche Nanostrukturen wie Proteine und Viren mit künstlichen Nanopartikeln nachahmen.

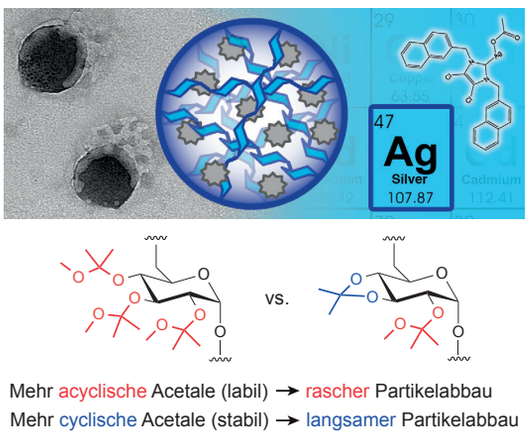


Abb. 4. Zuckerbasierte Nanopartikel lassen sich für den Transport von normalerweise schwer löslichen Wirkstoffen einsetzen, etwa für antimikrobielle Silbercarbene (oben);[14] Die Freisetzung des Wirkstoffs ist zeitlich einstellbar und wird über die Zahl acyclischer und cyclischer Acetale des Partikelmaterials gesteuert (unten).

nale, selbstorganisierte Strukturen zu erzeugen. Zwar sind Aufwand und Kosten noch hoch, doch selbst komplexe Nanostrukturen wie Boxen und Käfige lassen sich konstruieren und für den Transport von Wirkstoffen einsetzen.[6]

Ebenso als Baumaterial für künstliche Nanosysteme dienen Proteine. Das Polypeptidrückgrat bietet dabei eine Reihe an verschiedenen Methoden zur Funktionalisierung. Nanosysteme auf Proteinbasis sind so vielversprechende Kandidaten für den Transport von Medikamenten und genetischem Material. Proteine wie Albumin, Kollagen oder Spinnenseide[7] halfen bereits zur Herstellung therapeutischer Nanopartikel.[8] Oft werden dabei die nativen Proteinstrukturen entweder quervernetzt oder durch Ausfällen oder Denaturieren aufgelöst. Das Peptidgerüst dient dann als genau definiertes Polymer, etwa für die Herstellung von Mizellen zum Transport von Krebsmedikamenten.[9]

Die Konstruktion von virenähnlichen künstlichen Proteinkäfigen ist eine weitere Anwendung von Proteinen als Biomaterial. In Denovo-Designprozessen sind Proteinkapseln in variabler Form und Größe herstellbar.[10] Die bisherigen Ergebnisse sind noch weit entfernt von der Komplexität molekularer Maschinen oder der Effizienz von Viren. Sie zeigen aber das Potenzial proteinbasierter Nanostrukturen.

Zuckerbasierte Nanopartikel

◆ Polysaccharide übernehmen in der Natur hauptsächlich Speicher- und Strukturfunktionen. Sie sind zum Beispiel Bestandteile der bakteriellen Glykokalyx und der extrazellulären Membran von eukaryotischen Zellen. Trotz der auf den ersten Blick ähnlichen Monosaccharidgrundbausteine unterscheiden sich die Eigenschaften einzelner Polysaccharide deutlich. Sie lassen sich nach ihrer natürlichen Ladung in kationische (Chitosan), anionische (Alginat, Heparin, Hyaluronsäure) und nichtionische (Pullulan, Dextran) Biopolymere einteilen. Das Zuckergrundgerüst bietet dabei viele chemische Funktionalitäten wie Alkohole, Aldehyde, Amine und Carboxylate, die Ausgangspunkte zur chemischen Modifikation sein können.

So vielfältig wie die chemische Modifizierbarkeit sind auch die bisherigen Ansätze, polysaccharidbasierte Nanopartikel herzustellen. Ein häufig angewandtes Prinzip beruht auf der Partikelformation durch die Komplexierung gegensätzlich geladener Bausteine. Positiv und negativ geladene Polysaccharide bilden dabei selbstorganisierte Partikelsysteme, die Wirkstoffe einschließen. Auch die direkte Polyplexbildung von negativ geladener DNA/RNA und kationischen Polysacchariden hat sich als effektiv zur Transfektion erwiesen.

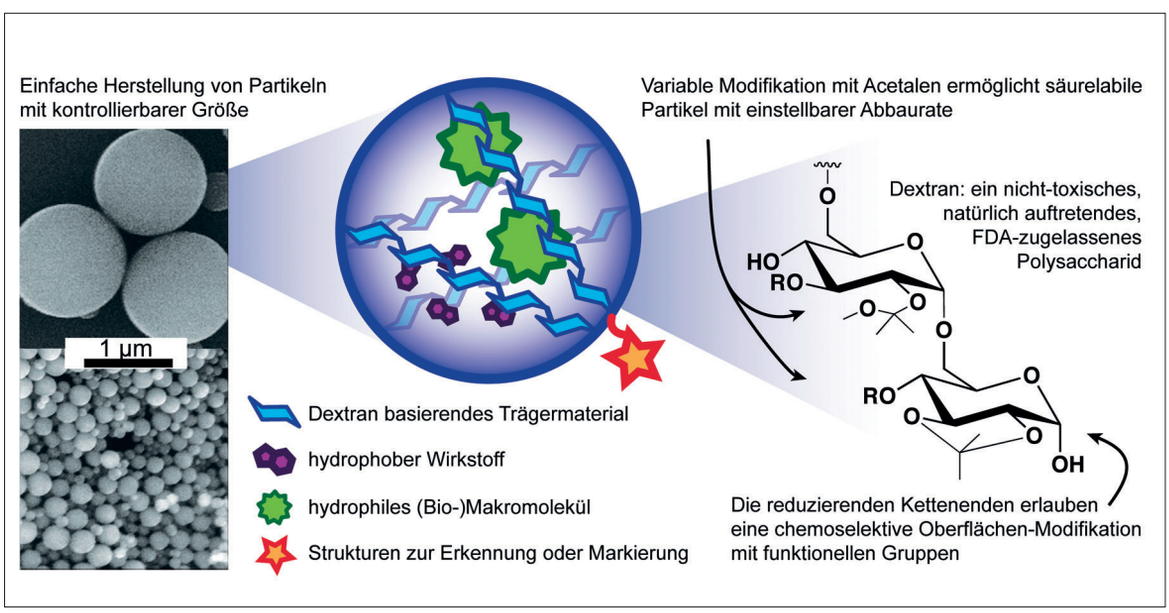


Abb. 5. Acetalmodifizierte Polysaccharide wie Dextran sind durch verschiedene Emulsionstechniken für die Herstellung von säurelabilen Partikelsystemen einsetzbar. Die Partikel können als multifunktionale Transportplattform maßgeschneidert für die jeweilige therapeutische Anwendung eingesetzt werden.

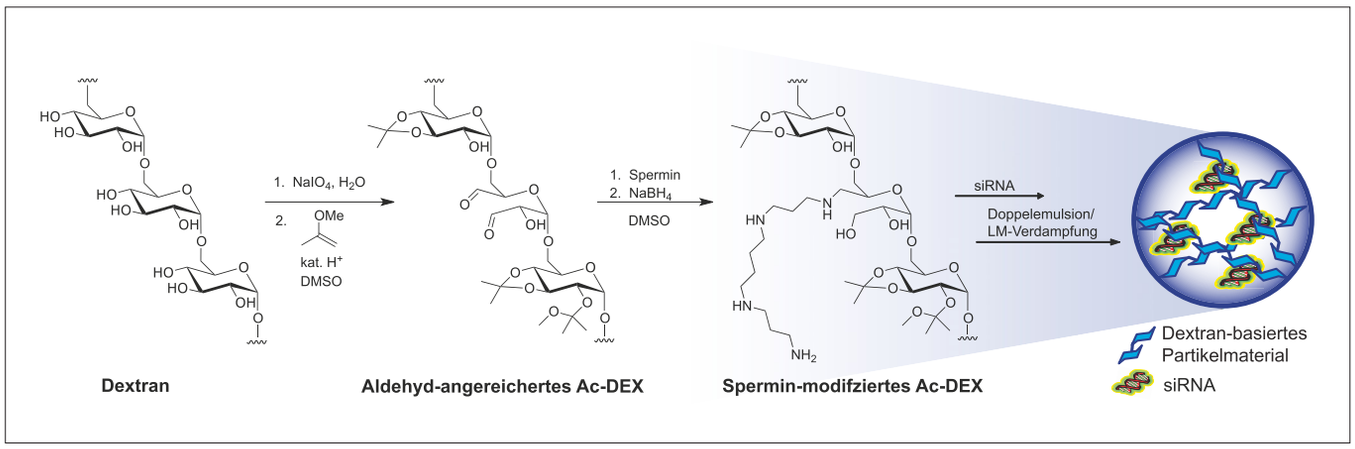
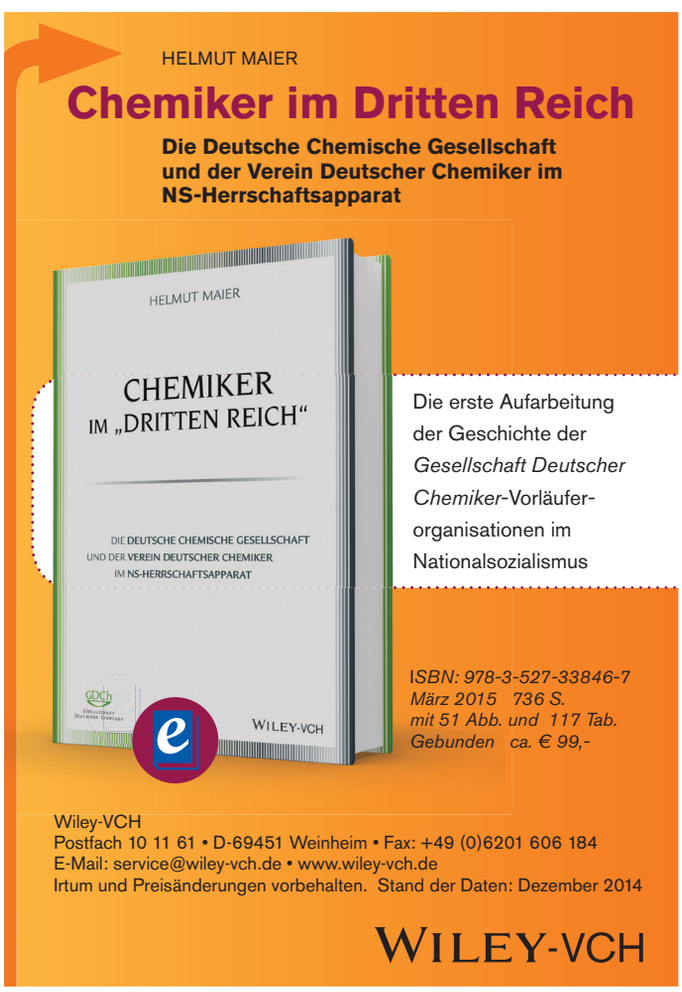


Abb. 6. Der Einbau eines Amins in das Polysaccharidmaterial erhöht die Beladung des Partikels mit siRNA. Die zusätzlichen elektrostatischen Wechselwirkungen verhindern ein langsames Herausdiffundieren der Nukleinsäuren.

Eine alternative Methode, Nanopartikel herzustellen, ist das Einführen von hydrophoben Segmenten in das hydrophile Polysaccharid-Grundgerüst. Die chemisch modifizierten Ketten können dann nach Dialyse oder in Fällungsverfahren selbstorganisierende Strukturen wie Mizellen oder Partikel bilden.[11)]

Die meist kovalente Quervernetzung einzelner Zuckerketten ist die dritte Alternative, um Partikel herzustellen. Das geschickte Einbauen säurelabiler oder enzymatisch abbaubarer Sollbruchstellen erhöht die Bioabbaubarkeit der Partikel. Zusätzlich ist eine stimuliresponsive Freisetzung des transportierten Wirkstoffs möglich. Über Quervernetzung durch Grenzflächenpolymerisation in einem Miniemulsions-Verfahren sind auch hohle Nanokapseln herstellbar.[12)]

Ein weiteres vielversprechendes Material für therapeutisch interessante Nanopartikel ist acetalisiertes Dextran.[13)] Das pH-sensitive Material umschließt in einem dichten Netz sowohl hydrophobe als auch hydrophile Wirkstoffe. Dextran, ein bakteriell hergestelltes Homopolysaccharid der Glukose, ist aufgrund seiner Verfügbarkeit, Biokompatibilität, Bioabbaubarkeit und der einfachen chemischen Modifizierbarkeit ein attraktives Polymer für Biomaterialien. Um es in Nanopartikel zu verarbeiten, lässt sich Dextran durch eine Modifikation der Zucker-Hydroxylgruppen in einer Reaktion mit 2-Methoxypropen in ein hydrophobes Material umwandeln. Die hohe Dichte der nun eingeführten cyclischen und acyclischen Acetale macht das neue acetalisierte Dextran (Ac-DEX) löslich in organischen Lösungsmitteln wie Dichlormethan, Ethylacetat oder Aceton. Die Maskierung der Hydroxylgruppen erlaubt zum einen die Löslichkeitsänderung, die nötig ist, um das Polymer mit Emulsionstechniken in Trägerteilchen zu verarbeiten, zum anderen ermöglicht sie eine einstellbare pH-Empfindlichkeit der Partikel. Unter



leicht sauren Bedingungen hydrolysieren die anhängenden Acetalgruppen, und das Trägermaterial wandelt sich wieder in seine natürliche, wasserlösliche Dextranform zurück.

Die Besonderheit des Systems liegt darin, dass die Hydrolyserate des Partikels durch den Gehalt an Acetalen einstellbar ist. Trägt der Zucker hauptsächlich acyclische Acetale, so entsteht ein sich rasch auflösendes Material. Bei einem hohen Gehalt an thermodynamisch stabileren cyclischen Acetalen erhält man hingegen ein Material mit einem langsameren Auflöseverhalten (Abbildung 4). Das Verhältnis beider Gruppen lässt sich durch unterschiedliche Reaktionszeiten während der Acetalisierung der Polysaccharide kontrollieren. Dadurch kann je nach gewünschter Anwendung das passende Ausgangsmaterial für die Partikelherstellung ausgewählt und dadurch der transportierte Wirkstoff zeitlich einstellbar freigesetzt werden. Halbwertszeiten von wenigen Minuten bis mehreren Stunden sind möglich.[13)]

Die zur Hydrolyse benötigten leicht sauren Bedingungen finden sich zum Beispiel in entzündeten Geweben mit niedrigem pH-Wert, in Tumoren und lysosomalen Zellkompartimenten. Mit verschiedenen Emulsionstechniken lassen sich Nano- sowie Mikropartikel (70 nm bis 10 µm) herstellen. Sie können sowohl hydrophobe, niedermolekulare Wirkstoffe wie antimikrobielle Silbercarbene[14)] als auch größere, hydrophile Biomoleküle wie Proteine und Plasmid-DNA einschließen und sie erfolgreich in Zielzellen transportieren (Abbildungen 4 und 5, S. 130).

Mit einem speziell für siRNA-Transport optimierten Ac-DEX-System gelang es, in den Protein-Haushalt von Krebszellen (HeLa) einzugreifen und dies mit einem Luciferase-Reporter-System nachzuweisen.[15)] Dazu wurde das Ausgangsmaterial zusätzlich mit dem Amin Spermin modifiziert, um die Beladung mit siRNA zu erhöhen (Abbildung 6, S. 131). Die Mischung aus primären und sekundären Aminen erlaubt nicht nur eine hohe Nukleinsäurenbindung, sondern ist zusätzlich aufgrund der guten Pufferkapazität von Vorteil für die endosomale Freisetzung der RNA ins Cytosol der Zelle. Der besonders effiziente Einschluss von Nukleinsäuren kommt zustande durch die ionischen Wechselwirkungen zwischen dem Polymer und den negativ geladenen Gerüststrukturen der RNA und DNA. Anders als bei reinen Polyplex-Transportsystemen beruht der Transport aber hauptsächlich auf dem physikalischen Umschließen des genetischen Materials im Innern des Partikels. Die zusätzlichen kationischen Ladungen dienen hier primär als molekularer Klebstoff, der das langsame Herausdiffundieren der siRNA verhindert.

Ausblick

◆ Das Potenzial von Biopolymeren als natürliche Bausteine für Nanopartikelsysteme ist bei weitem noch nicht ausgeschöpft. Wird die einfache chemische Modifizierbarkeit und die hohe Biokompatibilität genutzt, lassen sich Materialeigenschaften erhalten, die mit künstlichen Polymeren nicht oder nur mit hohem synthetischen Aufwand erzielt werden können. Es sollte das Ziel sein, nicht nur natürliche Vorbilder wie Viren nachzuahmen, sondern über den Wirkstofftransport hinaus neue biomimetische Systeme für bisher unerschlossene therapeutische Anwendungen zu entwickeln.

Literatur

1) *K. E. Sapsford, W. R. Algar, L. Berti, K. B. Gemmill, B. J. Casey, E. Oh, M. H. Stewart, I. L. Medintz*, Chem. Rev. *2013*, 113, *1904–2074.*
2) *E. M. Sletten, C. R. Bertozzi*, Acc. Chem. Res. *2011*, 44, *666–676.*
3) *R. A. Petros, J. M. Desimone*, Nat. Rev. Drug Discovery *2010*, 9, *615–627.*
4) *Y. Barenholz*, J. Controlled Release *2012*, 160, *117–134.*
5) *V. Linko, H. Dietz*, Curr. Opin. Biotech. *2013*, 24, *555–561.*
6) *E. S. Andersen, M. Dong, M. M. Nielsen et al.*, Nature *2009*, 459, *73–76.*
7) *A. Lammel, M. Schwab, M. Hofer, G. Winter, T. Scheibel*, Biomaterials *2011*, 32, *2233–2240.*
8) *A. O. Elzoghby, W. M. Samy, N. A. Elgindy*, J. Controlled Release *2012*, 161, *38–49.*
9) *S. L. Kuan, Y. Wu, T. Weil*, Macromol. Rapid Comm. *2013*, 34, *380–392.*
10) *Y.-T. Lai, K.-L. Tsai, M. R. Sawaya, F. J. Asturias, T. O. Yeates*, J. Am. Chem. Soc. *2013*, 135, *7738–7743.*
11) *S. Hornig, H. Bunjes, T. Heinze*, J. Colloid Interface Sci. *2009*, 338, *56–62.*
12) *G. Baier, A. Musyanovych, M. Dass, S. Theisinger, K. Landfester*, Biomacromolecules *2010*, 11, *960–968.*
13) *K. E. Broaders, J. A. Cohen, T. T. Beaudette, E. M. Bachelder, J. M. J. Fréchet*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA *2009*, *106*, *5497–5502.*
14) *C. Ornelas-Megiatto, P. N. Shah, P. R. Wich et al.*, Mol. Pharm. *2012*, 9, *3012–3022.*
15) *J. L. Cohen, S. Schubert, P. R. Wich, L. Cui, J. A. Cohen, J. L. Mynar, J. M. J. Fréchet*, Bioconjugate Chem. *2011*, 22, *1056–1065.*

Peter Wich ist seit dem Jahr 2012 Juniorprofessor für medizinische/pharmazeutische Chemie an der Universität Mainz. Seinem Chemiestudium in Würzburg und der Promotion bei Carsten Schmuck im Jahr 2009 folgte ein Postdoc-Aufenthalt bei Jean M. J. Fréchet an der UC Berkeley. Sein Hauptarbeitsgebiet liegt in der Entwicklung dynamischer Biomaterialien in Form multifunktioneller und nanoskaliger Polymerplattformen für den Transport von niedermolekularen Wirkstoffen, Proteinen und Nukleinsäuren. wich@uni-mainz.de – www.wichlab.com