

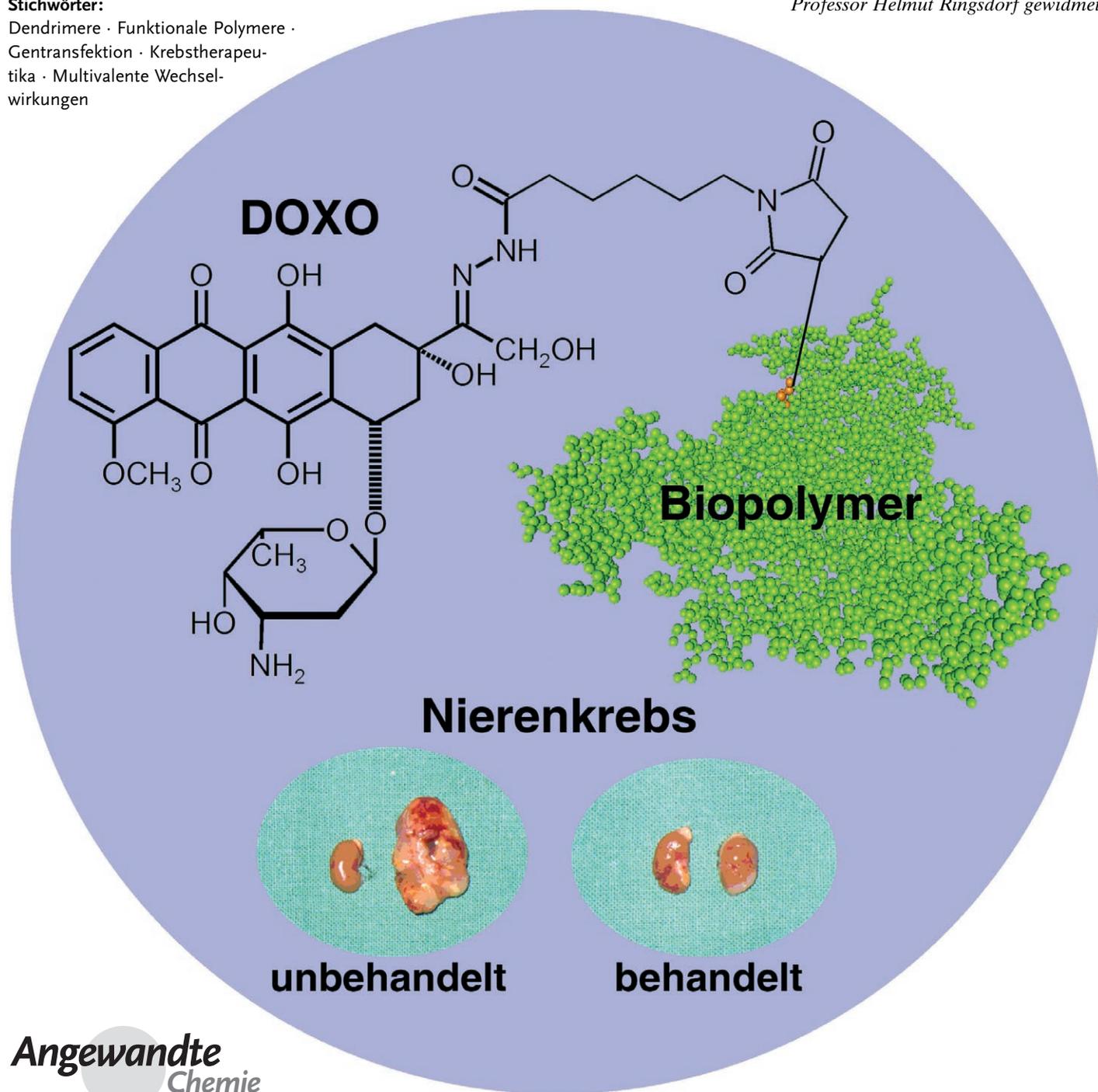
Polymere Therapeutika: Konzepte und Anwendungen

Rainer Haag* und Felix Kratz*

Stichwörter:

Dendrimere · Funktionale Polymere ·
Gentransfektion · Krebstherapeu-
tika · Multivalente Wechsel-
wirkungen

Professor Helmut Ringsdorf gewidmet



Polymere Therapeutika umfassen Polymer-Protein-Konjugate, Wirkstoff-Polymer-Konjugate und supramolekulare Wirkstofftransportsysteme. Zahlreiche Polymer-Protein-Konjugate mit verbesserter Stabilität und Pharmakokinetik wurden z. B. durch Anknüpfen einer Polyethylenglycolkomponente (PEGylierung) an Enzyme oder therapeutisch relevante Proteine entwickelt. Einige davon sind bereits als Medikamente zugelassen, z. B. die PEGylierte Form der Adenosin-Desaminase. Die Kupplung von niedermolekularen Cytostatika an hochmolekulare Polymere durch einen spaltbaren Linker ist eine effektive Methode zur Verbesserung des therapeutischen Index klinischer Wirkstoffe, und erste Kandidaten wurden bereits klinisch evaluiert, darunter N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid-Konjugate von Doxorubicin, Paclitaxel und Platin(II)-Komplexen. Zu einem weiteren Typ polymerer Therapeutika, den Wirkstofftransportsystemen, führte der Fortschritt bei definierten multivalenten und dendritischen Polymeren. Beispiele sind polyanionische Polymere als Inhibitoren der zellulären Bindung von Viren, polykationische Komplexe mit DNA oder RNA (Polyplexe) und dendritische Kern-Schale-Partikel zur Verkapselung von Wirkstoffen. In diesem Aufsatz geben wir einen Überblick über polymere Therapeutika mit einem Schwerpunkt auf Konzepten und Beispielen, die die besonderen Merkmale des jeweiligen Wirkstofftransportsystems charakterisieren.

1. Einleitung

Die Verbesserung des therapeutischen Index von Wirkstoffen^[1] ist ein vorrangiges Ziel der modernen Arzneimittelentwicklung für eine Vielzahl von Indikationen, etwa Tumorerkrankungen sowie entzündlichen und infektiösen Erkrankungen. Im Bereich der polymeren Therapeutika bieten makromolekulare Wirkstofftransportsysteme eine Basis zur Entwicklung von Medikamenten mit verbesserter Wirksamkeit bei geringeren Nebenwirkungen.^[2-5]

Bei den heutigen klinisch verwendeten Medikamenten handelt es sich zum überwiegenden Teil um Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht (typischerweise unter 500 g mol⁻¹), die eine kurze Halbwertszeit im Blutkreislauf und eine hohe Clearance aufweisen. Niedermolekulare Wirkstoffe wechselwirken gewöhnlich über zahlreiche, aber monovalente Bindungen mit einem bestimmten Rezeptor. Sie diffundieren schnell in gesundes Gewebe und verteilen sich gleichmäßig im Körper, weshalb nur relativ kleine Mengen des Wirkstoffs den Wirkort erreichen und die Therapie mit Nebenwirkungen verbunden ist. Diese Nachteile sind besonders ausgeprägt bei Medikamenten mit einem niedrigen therapeutischen Index^[1] wie Cytostatika, Antirheumatika oder Immunsuppressiva. Häufige Nebenwirkungen dieser Medikamente sind Nierentoxizität, Knochenmarkschädigung, Schäden des Nervensystems, Herztoxizität, Schleimhautentzündungen und gastrointestinale Toxizität. Solche Nebenwirkungen sind dosislimitierend und verhindern deshalb eine effektive Behandlung.

Aus dem Inhalt

| | |
|---|------|
| 1. Einleitung | 1219 |
| 2. Makromoleküle als Wirkstofftransportsysteme: biologische Rationale | 1221 |
| 3. Ansätze und Anwendungen: „In vivo veritas“ | 1223 |
| 4. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen | 1234 |

Um die Wirksamkeit von Medikamenten zu verbessern, wird der Einsatz makromolekularer Transportsysteme untersucht. Diese lassen sich allgemein als partikuläre Wirkstofftransportsysteme und als Polymer-Wirkstoff-Konjugate klassifizieren. Zu den partikulären Transportsystemen, bei denen die Wirkstoffe physikalisch durch Nanopartikel aufgenommen werden, gehören Emulsionen, Liposomen und nichtkovalente Polymer-

Träger-Systeme. Bei den Wirkstoff-Polymer-Konjugaten ist der Wirkstoff dagegen kovalent an Polymere gebunden, z. B. an Proteine, Polysaccharide oder synthetische Polymere.

Historisch betrachtet, erfuhren die Forschungen zur Kupplung von Wirkstoffen an makromolekulare Träger eine entscheidende Wende im Jahr 1975 mit der Entwicklung monoklonaler Antikörper durch Milstein und Köhler^[6] und durch Ringsdorfs Konzept eines allgemeinen Wirkstofftransportsystems auf der Basis von synthetischen Polymeren (Abbildung 1).^[3,7] Anfängliche Forschungsarbeiten konzentrierten sich auf den Ansatz, Antikörper-Wirkstoff-Konjugate selektiv an zellspezifische Antigene oder Rezeptoren zu binden. Dieser Ansatz verfolgte das therapeutische Konzept des Wirkstoff-Targetings, das auf Paul Ehrlichs Vision der „Zauberkugel“ gründete. Allerdings dauerte es viele Jahre, bis die Forschung über polymere Therapeutika in Schwung kam.^[4]

[*] Prof. Dr. R. Haag
Organische und Makromolekulare Chemie
Institut für Chemie und Biochemie
Freie Universität Berlin
Takustraße 3, 14195 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-838-53357
E-mail: haag@chemie.fu-berlin.de
Dr. F. Kratz
Forschungsgruppe Makromolekulare Prodrugs
Zentrum für Tumorbiologie
Breisacher Straße 117, 79106 Freiburg (Deutschland)
Fax: (+49) 761-2062905
E-mail: felix@tumorbio.uni-freiburg.de

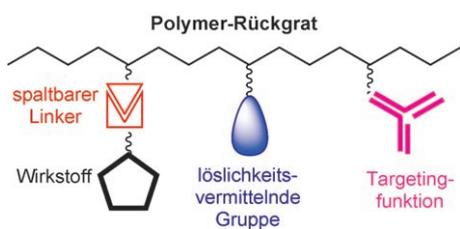


Abbildung 1. Ringsdorfs Modell für Wirkstofftransportsysteme auf der Basis synthetischer Polymere.

In Ringsdorfs ursprünglichem Modell (Abbildung 1) sind mehrere Wirkstoffmoleküle über einen Linker an ein Makromolekül gebunden. Der Linker kann eine Sollbruchstelle aufweisen, um die Freigabe des Wirkstoffes am Zielort zu ermöglichen. Das Polymerkonjugat kann weitere Komponenten enthalten, z.B. Antikörper- oder Zuckerfragmente, die auf krankheitsrelevante Antigene oder Rezeptoren zielen. Weiterhin können löslichkeitsvermittelnde Gruppen an das Polymerrückgrat gekuppelt werden, um die Wasserlöslichkeit und Bioverfügbarkeit zu modifizieren.

Die Makromoleküle zur Herstellung von Wirkstoff-Polymer-Konjugaten sollten idealerweise wasserlöslich, nicht toxisch und nicht immunogen sein und außerdem vom Organismus abgebaut und/oder eliminiert werden.^[8] Darüber hinaus sollte der makromolekulare Träger passende funktionelle Gruppen zur Kupplung der Wirkstoffe und Linker aufweisen. In ersten Studien wurden HPMa-Copolymere (HPMA = *N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid) als lineare Polymere zur therapeutischen Anwendung nach dem Ringsdorf-Modell untersucht.^[9–11] Heute kennt man ein breites Spektrum synthetischer Polymere mit vielfältigen Strukturen,

darunter A) monofunktional-lineare, B) polyfunktional-lineare, C) sternförmige und D) dendritische Architekturen (Abbildung 2).

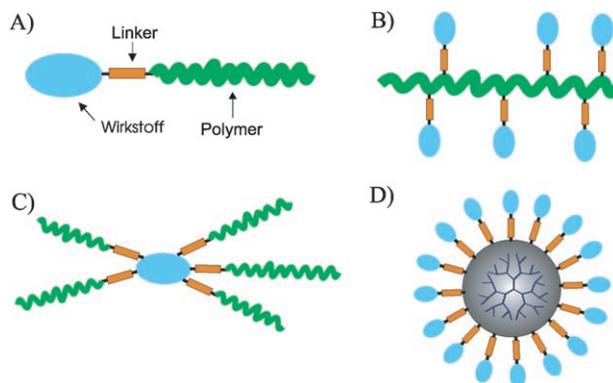
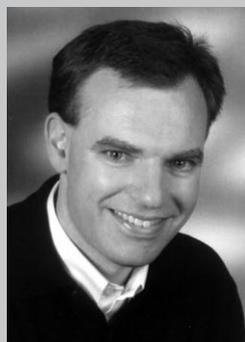


Abbildung 2. Ausgewählte Strukturtypen von Polymer-Wirkstoff-Konjugaten.

Wirkstoff-Polymer-Konjugate und andere polymere Transportsysteme fasst man unter dem Begriff polymere Therapeutika zusammen.^[4,5] Seit neuerer Zeit zählen hierzu auch supramolekulare Wirkstofftransportsysteme und andere definierte Systeme in Nanometergröße.^[12–14] Durch Anknüpfen einer Polyethylenglycolkomponente (PEGylierung) an Enzyme oder therapeutisch relevante Proteine wurden zahlreiche Polymer-Protein-Konjugate mit verbesserter Stabilität und Pharmakokinetik erhalten, von denen mittlerweile mehrere für eine Reihe von Indikationen zugelassen sind (Tabelle 1).^[4] Als eine weitere wirksame Methode zur Verbesserung des therapeutischen Index klinisch etablierter

Tabelle 1: Klinisch zugelassene Polymer-Protein-Konjugate.

| Handelsname | Protein | Polymer | Indikation | Firma |
|-----------------|--|--|------------------------------------|-----------------|
| Adagen | Adenosin-Desaminase | PEG (5 kDa) | schwere kombinierte Immundefizienz | Enzon |
| Oncaspar | Asparaginase | PEG (5 kDa) | akute lymphatische Leukämie | Enzon |
| Pegvisomant | GH-Antagonist | PEG (5 kDa) | exzessives Wachstum (Akromegalie) | Pfizer |
| PEG-Intron | Interferon $\alpha 2b$ | PEG (12 kDa) | Hepatitis C | Schering-Plough |
| Pegasys | Interferon $\alpha 2a$ | PEG (40 kDa) | Hepatitis C | Roche |
| Neulasta | granulocytenkoloniestimulierender Faktor | PEG (20 kDa) | Neutropenie | Amgen |
| SMANCS/Lipiodol | Neocarzinostatin | Copolymer aus Styrol und Maleinsäureanhydrid | hepatozelluläres Karzinom | Yamanouchi |



Rainer Haag promovierte 1995 bei A. de Meijere an der Universität Göttingen. Zwei Postdoc-Aufenthalte führten ihn zu S. V. Ley an die Universität Cambridge (England) und G. M. Whitesides an die Harvard University (USA). Anschließend habilitierte er 2002 in makromolekularer und organischer Chemie an der Universität Freiburg. Nach einer C3-Professur an der Universität Dortmund übernahm er den Lehrstuhl für Organische und Makromolekulare Chemie an der Freien Universität Berlin. Seine Forschungsinteressen betreffen dendritische Polymere als hochbelastbare Träger für die Synthese und Katalyse, makromolekulare Nanotransporter für DNA und Wirkstoffe sowie proteinabweisende Oberflächen.



Felix Kratz promovierte 1991 an der Universität Heidelberg in Chemie. Anschließend befasste er sich als Postdoc am Bioorganischen Institut der Universität Florenz mit der Entwicklung tumorspezifischer Trägersysteme von Ruthenium(III)-Komplexen. Seit 1994 ist er Leiter der Arbeitsgruppe Makromolekulare Prodrugs an der Klinik für Tumorbologie in Freiburg, wo er mit der Organisation und der Umsetzung von Forschungsergebnissen vom Labor in die Klinik betraut ist. Seine Forschungsgebiete umfassen Wirkstofftargeting, Wirkstofftransport in der Onkologie, Prodrugs, Rezeptortargeting und Chemie von Biokonjugaten.

Wirkstoffe erwies sich die Kupplung von Cytostatika an Polymere über einen spaltbaren Linker. Erste Polymer-Cytostatikum-Konjugate befinden sich seit einigen Jahren in der klinischen Prüfung.

Fortschritte auf dem Gebiet der strukturell definierten multivalenten und dendritischen Polymere^[15] ermöglichten die Herstellung von maßgeschneiderten selbstorganisierten Systemen als polymere Therapeutika. Hierzu gehören: a) polyanionische Polymere, die die Virus-Rezeptor-Wechselwirkung hemmen oder als Heparinanaloga eingesetzt werden; b) polykationische Polymere, die mit DNA oder RNA Polyplexe bilden; c) polymere Micellen mit kovalent gebundenen Wirkstoffen und dendritische Kern-Schale-Partikel zur Verkapselung von Wirkstoffen. In diesem Aufsatz geben wir einen Überblick über polymere Therapeutika mit einem Schwerpunkt auf therapeutischen Konzepten und Beispielen, die die besonderen Merkmale einzelner Wirkstofftransportsysteme charakterisieren. Weitere Beispiele finden sich in einer Reihe von Übersichtsartikeln, die in den letzten zehn Jahren zu diesem Thema erschienen sind.^[4,5,11,16–26] Nicht behandelt werden Polymere für galenische Anwendungen und Systeme mit langsamer Freisetzung, deren Wirkungsweisen auf dem Zerfall der Polymermatrix beruht.^[27]

2. Makromoleküle als Wirkstofftransportsysteme: biologische Rationale

2.1. Passives Wirkstoff-Targeting und spezifisches Gewebe-Targeting; der EPR-Effekt

Bedenkt man die seit langem bekannte Tatsache, dass Biopolymere eine wichtige Rolle als freie und membran-gebundene „Therapeutika“ spielen, so überrascht es, dass synthetische Polymere lange Zeit nur als Plasmaexpander diskutiert wurden, wie z. B. Pervilon und Polyvinylpyrrolidon während des Zweiten Weltkrieges.^[28]

Die passive Anreicherung von Makromolekülen und anderen Nanopartikeln in soliden Tumoren ist ein Phänomen, das als biologischer Angriffspunkt für tumorselektive Therapien offenbar lange Zeit übersehen wurde. Das Grundprinzip, Makromoleküle als Träger für den Transport von Cytostatika zu verwenden, auch wenn diese nicht auf ein Antigen oder einen Rezeptor auf der Oberfläche der Tumorzelle zielen, wurde in den bahnbrechenden Arbeiten von Maeda und Mitarbeitern^[29,30] sowie Jain et al.^[31,32] entwickelt. Die Ergebnisse dieser Studien ermöglichten einen detaillierten Einblick in die Pathophysiologie von Tumorgewebe, die durch Angiogenese, Hypervaskularisierung, defekten Gefäßaufbau und eingeschränkte oder fehlende Lymphdrainage gekennzeichnet ist.

Unterschiede in den biochemischen und physiologischen Eigenschaften zwischen Normal- und Tumorgewebe sind ausschlaggebend für die passive Anreicherung von Makromolekülen im Tumor. Dieses Phänomen, das in Abbildung 3 dargestellt ist, wird als erhöhte Permeabilität und Retention („enhanced permeability and retention“) oder EPR-Effekt bezeichnet.^[30,33]

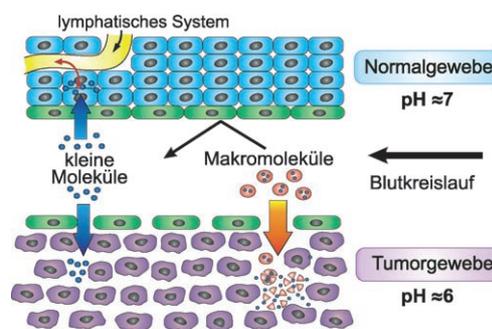


Abbildung 3. Schematische Darstellung der anatomischen und physiologischen Charakteristika von Normal- und Tumorgewebe in Bezug auf ihre vaskuläre Permeabilität und die Retention von kleinen und großen Molekülen (EPR-Effekt).

Im Allgemeinen diffundieren niedermolekulare Verbindungen durch die Endothelzellschicht der Blutkapillaren in gesundes Gewebe und Tumorgewebe. Makromoleküle hingegen können die Kapillarwände von gesundem Gewebe gewöhnlich nicht passieren. Ein Austritt von Makromolekülen in das Tumorgewebe findet in den Kapillaren statt, in denen der Blutfluss verringert ist und Nährstoffe in das Gewebe diffundieren. Im Unterschied zu den Kapillaren im gesunden Gewebe ist die Endothelzellschicht der Kapillaren im Tumorgewebe fenestriert und porös, sodass Makromoleküle und andere Nanopartikel in das maligne Gewebe gelangen. Da Tumorgewebe generell eine mangelhafte Lymphdrainage haben, werden Makromoleküle zurückgehalten und auf diesem Weg in soliden Tumoren angereichert.

Die Größe des Makromoleküls ist der entscheidende Faktor für die Aufnahme in den Tumor. Der EPR-Effekt wird bei Makromolekülen beobachtet, die ein Molekulargewicht über 20 kDa haben. Das heißt, es existiert eine Korrelation zwischen der Plasmahalbwertszeit, der renalen Clearance und der Anreicherung des Makromoleküls im Tumor. In den meisten Studien der letzten Jahre zu Polymer-Wirkstoff-Konjugaten wurden Makromoleküle mit Molekulargewichten im Bereich von 20 bis 200 kDa verwendet. Es wird allgemein angenommen, dass im gesunden Organismus die Nierenschwelle bei 30 bis 50 kDa liegt, um einen Verlust der Körperproteine in die Blase zu verhindern.^[34]

Etliche klinische Studien belegen, dass die physikochemische Beschaffenheit eines Biopolymers oder synthetischen Polymers einen starken Einfluss auf sein pharmakokinetisches Profil und den Grad der Tumoranreicherung hat.^[35,36] Die Bioverteilung und die Aufnahme des Polymers in den Tumor ist wesentlich durch sein Molekulargewicht, seine Ladung, Konformation, Hydrophobie und Immunogenität bestimmt. Präklinische Studien belegen außerdem, dass die Größe des Tumors die Aufnahmerate des Polymers in soliden Tumoren beeinflusst. Kleinere Tumorknoten akkumulieren eine größere Menge des Polymers als größere Knoten.^[37] Dies deutet auf die Möglichkeit hin, polymere Kontrastmittel zur Entdeckung kleiner Tumorknoten und Metastasen anwenden zu können.

Der Einfluss der verschiedenen Faktoren auf die EPR-vermittelte Aufnahme von Polymeren in soliden Tumoren ist noch nicht in allen Einzelheiten verstanden. Als allgemeine

Regel gilt, dass ein Molekulargewicht des Polymers oberhalb der Nierenschwelle (ca. 30 kDa) und eine neutrale Ladung des Polymers eine lange Plasmahalbwertszeit gewährleisten. Diese verlängerte Aufenthaltszeit im Plasma ist eine wichtige Voraussetzung für eine signifikante Anreicherung des zirkulierenden Polymers im Tumor.^[35,36] Ein ähnlicher Aufnahme-mechanismus zeigt sich auch in anderen pathogenen Geweben, etwa in entzündetem oder infiziertem Gewebe, und kann dort ebenfalls zu einer erhöhten Aufnahme von Makromolekülen führen.^[35,36]

Abgesehen von diesem einfachen, größenabhängigen Targeting haben sich zahlreiche Forschungsgruppen auch dem zellspezifischen Targeting durch Antikörper, Oligosaccharide und Peptide zugewandt.^[5,38]

2.2. Zelluläre Aufnahme des Polymers, ortsspezifische Wirkstoff-Freisetzung und Auswirkungen auf das Wirkstoff-Design

Im Allgemeinen werden Makromoleküle durch rezeptorvermittelte Endocytose, adsorptive Endocytose oder Flüssigphasen-Endocytose in die Zelle aufgenommen (Abbildung 4).^[39] Während der Endocytose kommt es zu einem deutlichen Abfall im pH-Wert vom physiologischen Wert im

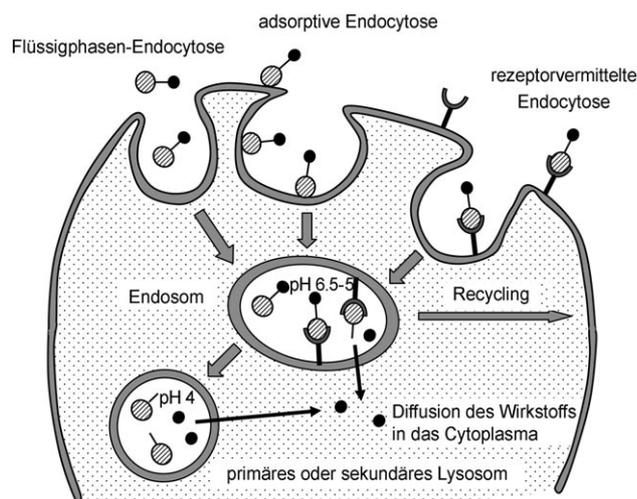


Abbildung 4. Zelluläre Aufnahme von Makromolekülen und Nanotransportern zum Wirkstofftransport durch unterschiedliche Endocytosemechanismen.

Extrazellulärraum (pH 7.2–7.4) auf pH 6.5–5 im Endosom und auf pH 4 in primären und sekundären Lysosomen. Eine große Zahl lysosomaler Enzyme, z.B. Phosphatasen, Nucleasen, Proteasen, Esterasen und Lipasen, wird im sauren Milieu dieser Vesikeln aktiviert.

Polymer-Wirkstoff-Konjugate oder -Komplexe sollten im Blutkreislauf ausreichend stabil sein, damit der Wirkstoff erst am Zielort freigesetzt wird. Im Prinzip kann der polymergebundene Wirkstoff im Körper durch unspezifische Hydrolyse, durch Enzyme, durch Reduktion oder pH-abhängig freigesetzt werden. Idealerweise wird die Spaltung des Polymer-Wirkstoff-Komplexes durch eine biochemische oder physiologische Eigenschaft ausgelöst, die für den jeweiligen Tumor

charakteristisch ist. Streng tumorspezifische Eigenschaften sind zwar selten anzutreffen, allerdings bieten sich durch die Überexpression bestimmter Enzyme, eine saure und hypoxische Umgebung in soliden Tumoren sowie die Endocytose von Makromolekülen mehrere Ansatzpunkte zur Entwicklung von Polymer-Wirkstoff-Konjugaten, die bevorzugt in einem bestimmten Tumor gespalten werden.

Anfangs konzentrierte sich die Entwicklung von Polymer-Wirkstoff-Konjugaten auf enzymatisch spaltbare Varianten, die die intrazelluläre Freisetzung des Wirkstoffs nach zellulärer Aufnahme ermöglichen. In jüngerer Zeit wurden auch Spaltungsmechanismen vorgestellt, die zu einer Freisetzungskaskade führen.^[40,41] Der Vorteil dieser Methode ist eine höhere lokale Wirkstoffkonzentration, die zu einer besseren Wirksamkeit führen könnte.^[42]

Sowohl die niedrigen pH-Werte in Endosomen und Lysosomen als auch die Anwesenheit lysosomaler Enzyme sind intrazelluläre Besonderheiten, die zur Freisetzung polymergebundener Wirkstoffe in Tumorzellen genutzt wurden. Weiterhin wurde berichtet, dass in Tiermodellen und beim menschlichen Patienten das Mikromilieu von Tumoren schwach sauer ist; durch nichtinvasive Techniken wurde hierbei nachgewiesen, dass der pH-Wert in Tumorgewebe meist 0.5–1.0 Einheiten niedriger liegt als in normalem Gewebe (vgl. Abbildung 3).^[43] Diese Differenz kann zur extrazellulären Freisetzung von Wirkstoffen genutzt werden, die durch säurelabile Linker an Polymere gebunden sind, insbesondere wenn das Polymer-Wirkstoff-Konjugat für längere Zeit im Tumor verweilt.

Schließlich können Wirkstoff-Polymer-Konjugate auch so entwickelt werden, dass sie den polymergebundenen Wirkstoff durch Hydrolyse unter physiologischen Bedingungen langsam freisetzen, wie etwa bei PEG-Wirkstoff-Konjugaten.^[44]

2.3. Polymerkonjugate zur Proteinstabilisierung

Die Kupplung von Polymeren an therapeutisch relevante Proteine kann einige Vorteile bieten: Die Konjugation kann die Immunogenität des Ursprungsproteins reduzieren, seine Stabilität erhöhen und seine biologische Halbwertszeit verlängern, sodass eine weniger häufige Medikamentengabe erforderlich wird. Das am häufigsten eingesetzte Polymer zur Entwicklung von Polymer-Protein-Konjugaten ist Polyethylenglycol (PEG). Bei der entsprechenden PEGylierung werden lineare oder verzweigte PEG-Komponenten an die Oberfläche des Proteins geknüpft.^[34,45] Eingeführt und verfeinert wurde die Methode durch die Firmen Shearwater Polymers und Enzon. Es wurden mehrere klinische und kommerziell erfolgreiche Produkte entwickelt, darunter PEGylierte Asparaginase, PEGylierte Adenosin-Desaminase, PEGylierte Interferone und PEGylierter granulocyt-koloniestimulierender Faktor (Abschnitt 3.1).^[45–48]

2.4. Multivalente Wechselwirkungen

In den letzten Jahren gab es bei der Entwicklung von multivalenten Wirkstoffen, die durch polymere Linker ver-

bunden sind, entscheidende Fortschritte (Abschnitt 3.5).^[49,50] Das große Potenzial dieser Systeme ist der hohe Entropiegewinn bei der Bildung des multivalenten Komplexes (Abbildung 5). Zum Beispiel kann die Bindungskonstante bei

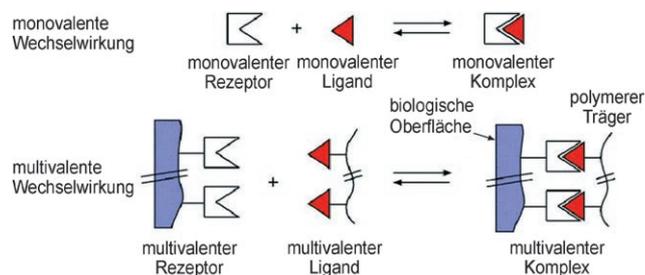


Abbildung 5. Vergleich zwischen monovalenten und multivalenten Wechselwirkungen.

bivalenten Wechselwirkungen um den Faktor 1000 höher sein als bei monovalenten Bindungen, und bei tri- und pentavalenten Wechselwirkungen werden Faktoren bis zu 10^8 erzielt. Dies bietet gänzlich neue Perspektiven für die Wirkstoffentwicklung, allerdings gibt es bislang nur wenige Wirkstoffkandidaten in klinischer Prüfung.

Ein wichtiger Ansatz zur Verwendung von multivalenten Wechselwirkungen ist die Mimikry von funktionalen Biomakromolekülen mit therapeutischer Relevanz. Verschiedene Ansätze, spezifische Proteine (z.B. Histone) oder Polysaccharide (z.B. Heparin) nachzuahmen, wurden bereits beschrieben (Abschnitt 3.5), wobei in diesen Fällen die Mimikry hauptsächlich die Oberflächenladung der Moleküle betrifft (Abbildung 6). Die Anwendungen reichen von DNA-Transfektionsmitteln (polykationische Systeme) bis hin zu koagulations-, entzündungshemmenden und Anti-HIV-Wirkstoffen (polyanionische Systeme).

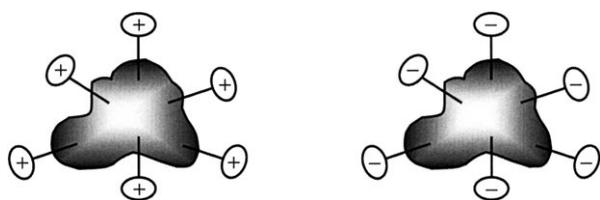


Abbildung 6. Mimikry der Oberflächenladung von polyionischen Biomakromolekülen durch synthetische Polymere als Ansatz für die Entwicklung von polymeren Therapeutika.

3. Ansätze und Anwendungen: „In vivo veritas“

Im Folgenden gehen wir näher auf die verschiedenen Polymertherapeutika ein, mit Schwerpunkt auf ihrem präklinischen und klinischen Potenzial.

3.1. Polymerkonjugate von therapeutisch relevanten Proteinen

Therapeutisch relevante Proteine wie Antikörper, Cytokine, Wachstumsfaktoren und Enzyme spielen eine zunehmend wichtige Rolle bei der Behandlung von viralen, malignen und Autoimmunerkrankungen. Häufig wird jedoch die Entwicklung und erfolgreiche Anwendung von therapeutischen Proteinen durch mehrere Faktoren erschwert, z.B. unzureichende Stabilität und Haltbarkeit, hohe Produktionskosten, immunogenes und allergisches Potenzial, schlechte Bioverfügbarkeit und Empfindlichkeit gegen Proteasen.

Eine elegante Methode, um die meisten dieser Schwierigkeiten zu umgehen, besteht darin, Polyethylenglycolketten an der Oberfläche des Proteins anzubringen. Die PEGylierung eines natürlichen Proteins erhöht dessen Molekulargewicht und resultiert in einer Verlängerung der Halbwertszeit in vivo, was eine seltenere Verabreichung des therapeutischen Proteins erlaubt. Zusätzlich maskieren die PEG-Ketten das Protein, wodurch es resistenter gegen Proteasen und weniger immunogen wird.

Eine Folge der PEGylierung von Proteinen ist im Allgemeinen eine Abnahme der biologischen Aktivität des Proteins. Dieser Aktivitätsverlust wird jedoch durch einen Anstieg der biologischen Halbwertszeit des PEGylierten Proteins ausgeglichen.^[34]

In den vergangenen Jahren haben sich zwei PEGylierungsverfahren etabliert: Bei der ersten Methode werden eine oder mehrere lineare PEG-Ketten mit einem Molekulargewicht zwischen 5 und 12 kDa an die Oberfläche des Proteins angehängt (PEGylierte Proteine der ersten Generation). Bei der zweiten Methode bindet man eine einfach verzweigte oder eine mehrfach verzweigte PEG-Kette an eine spezifische Aminosäure auf der Oberfläche des Proteins (PEGylierte Proteine der zweiten Generation). In den meisten Fällen werden aktivierte PEG-Carbonsäuren (z.B. aktiviert mit *N*-Hydroxysuccinimid) an die ϵ -Aminogruppen der Lysine oder die N-terminale Aminogruppe gebunden. Andere chemische Modifikationen mit Aldehyd-, Tresylat- oder Maleimid-Derivaten von PEGs sind ebenfalls in Gebrauch.

Der wesentliche Nachteil von PEGylierten Proteinen der ersten Generation ist die heterogene Zusammensetzung des pharmazeutischen Produkts, da in den meisten Fällen unterschiedliche lineare PEGs an das Protein binden. Trotzdem wurden einige Kandidaten der ersten Generation zugelassen. Die bekanntesten Vertreter sind Adagen (PEGylierte Adenosin-Desaminase) zur Behandlung von schweren kombinierten Immundefekten, Oncaspar (PEGylierte Asparaginase) zur Behandlung von akuter Leukämie und PEG-Intron (PEGyliertes Interferon $\alpha 2b$) zur Behandlung von Hepatitis C (Tabelle 1).

PEGylierte Proteine der zweiten Generation, bei denen eine verzweigte oder lineare PEG-Kette an eine spezifische Aminosäure an der Proteinoberfläche gebunden ist, haben den Vorteil, dass es sich um definierte Produkte mit nur minimal veränderter dreidimensionaler Konformation des Proteins handelt. Der mit einer linearen PEG-Kette von 20 kDa PEGylierte granulocytenkoloniestimulierende Faktor (G-

CSF) (Neulasta) erhielt 2002 als erstes PEGyliertes System der zweiten Generation die Marktzulassung (Tabelle 1). Neulasta stimuliert die Produktion von weißen Blutkörperchen nach einer Knochenmarksdepletion durch Chemotherapie. Die Behandlung ist bequemer als mit dem nativen Protein, dem humanen rekombinanten G-CSF (Neupogen), da nur eine Injektion Neulasta alle drei Wochen nötig ist, verglichen mit täglichen Injektionen von Neupogen über zwei Wochen.^[51]

Interferon $\alpha 2a$, das mit einem verzweigten PEG von 40 kDa derivatisiert wurde, ist ein PEGyliertes System der zweiten Generation und firmiert unter dem Namen Pegasys als Konkurrenzprodukt zu PEG-Intron, einem verwandten Konjugat der ersten Generation (Tabelle 1). Sowohl PEG-Intron als auch Pegasys haben in Kombination mit dem antiviralen Wirkstoff Ribavarin eine signifikant bessere Wirksamkeit bei der Behandlung von Hepatitis C als das native Interferon.^[46,52]

Weitere Beispiele PEGylierter Proteine mit Marktzulassung oder in fortgeschrittenen klinischen Studien sind Pegvisomant, eine PEGylierte Form des menschlichen Wachstumshormons,^[53] und ein PEGyliertes Rezeptor- und Antikörperfragment gegen Tumornekrosefaktor- α , einen Hauptmediator von Entzündungen (PEG-TNF-RI bzw. PEG-anti-TNF-Fab).^[54,55]

Neben PEGylierten Proteinen wurde auch ein Polymer-Protein-Konjugat bestehend aus dem tumorhemmenden Protein Neocarzinostatin in Verbindung mit einem Copolymer aus Styrol und einem Maleinsäureanhydridwirkstoff entwickelt (Tabelle 1). Der als SMANCS bezeichnete Wirkstoff ist in Japan zur Behandlung des Leberzellkarzinoms zugelassen.^[55]

3.2. Polymer-Wirkstoff-Konjugate mit spaltbaren Linkern

Die Entwicklung von Polymer-Wirkstoff-Konjugaten ist eine vielversprechende Strategie, um den therapeutischen Index^[1] von cytotoxischen Wirkstoffen zu verbessern, insbesondere für die antitumorale Chemotherapie. Einige Polymer-Wirkstoff-Konjugate werden derzeit in klinischen Studien in Phasen I–III untersucht (Tabelle 2).

Trotz einer derzeit intensiven Suche nach neuen Trägerpolymeren beschränken sich die bislang klinisch evaluierten

Polymer-Wirkstoff-Konjugate auf Systeme mit HPMA-, PEG- und Polyglutaminsäure-Trägern. Hinzu kommt Albumin, das als Trägerprotein von Cytostatika klinisch untersucht wird. Die Cytostatika, die in erster Linie zur Herstellung von Polymer-Wirkstoff-Konjugaten verwendet wurden, sind Doxorubicin, Camptothecin, Taxol, Methotrexat und Platin-komplexe.

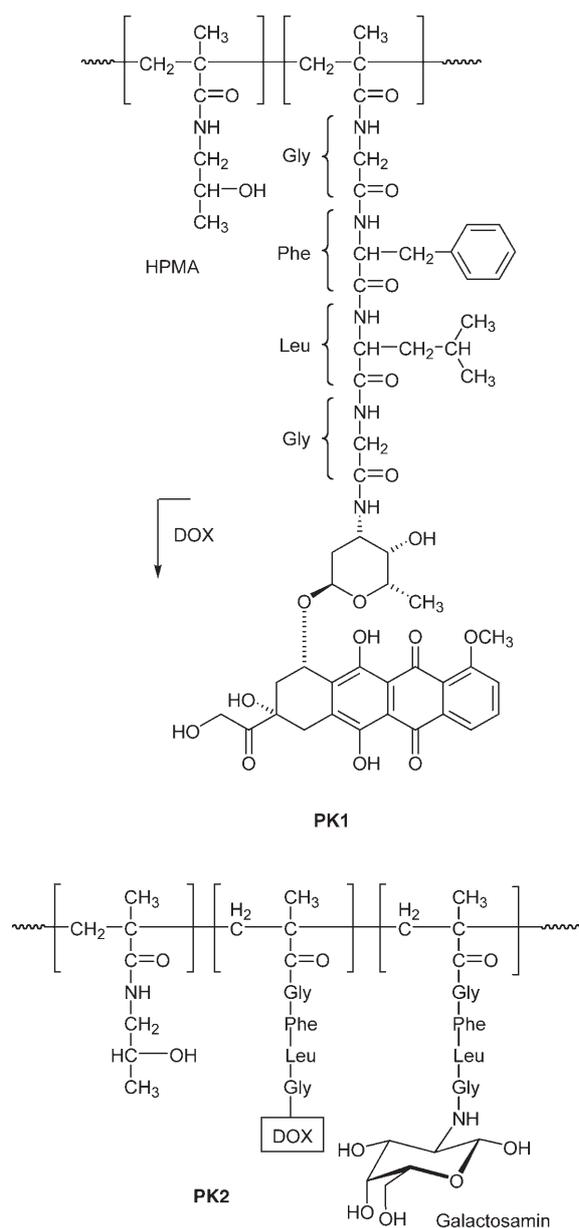
Mehrere Polymer-Wirkstoff-Konjugate mit dem HPMA-Copolymer wurden klinisch untersucht. Das erste klinisch evaluierte Polymer-Wirkstoff-Konjugat war das Doxorubicin-(HPMA-Copolymer)-Konjugat PK1 mit einem Molekulargewicht von ca. 28 kDa und einem Gehalt an Doxorubicin von ca. 8.5 Gew.-%.^[56] In PK1 ist Doxorubicin mit seinem Aminozucker über einen Tetrapeptid-Linker (Gly-Phe-Leu-Gly) an das Polymer gebunden (Schema 1). Diese Peptidsequenz wird durch lysosomale Enzyme der Tumorzellen gespalten. Präklinisch korrelierte der Expressionsgrad der lysosomalen Enzyme in Tumoren mit der antitumoralen Aktivität des Konjugats *in vivo*.^[57]

Nach einer Phase-I-Studie liegt die maximal tolerable Dosis (MTD) bei 320 mg m^{-2} Doxorubicin-Äquivalenten, was fünffach höher ist als die Standarddosierung von Doxorubicin.^[56] Die in dieser Studie beobachteten dosislimitierenden Faktoren waren Knochenmarkstoxizität und Schleimhautentzündungen; weitere Nebenwirkungen (z.B. Übelkeit, Durchfälle) waren moderat (CTC-Grad 1; CTC: allgemeine Toxizitätskriterien, common toxicity criteria). Eine bemerkenswerte Beobachtung war, dass selbst bei diesen hohen Dosen keine akute Kardiotoxizität auftrat. Zwei partielle Remissionen sowie zwei schwache Responses wurden bei vier Patienten mit Lungen-, Brust- und Kolontumoren beobachtet. Die empfohlene Dosis für Phase-II-Studien lag bei 280 mg m^{-2} alle drei Wochen. Phase-II-Studien bei Brustkrebs, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen und Kolonkarzinomen wurden Ende 1999 gestartet, und eine erste Zwischenauswertung ergab, dass Tumorrückbildungen in Einzelfällen beobachtet wurden.^[58]

PK2 ist eine zu PK1 verwandte Verbindung, die zusätzlich Galactosamin als Targeting-Gruppe enthält und hierdurch eine hohe Affinität zum Asialoglycoproteinrezeptor aufweist, der von Lebertumoren exprimiert wird (Schema 1). In einer Phase-I-Studie wurden 31 Patienten mit primären oder metastatischen Lebertumoren untersucht.^[59] Die MTD von PK2 lag bei 160 mg m^{-2} Doxorubicin-Äquivalenten, was etwa der

Tabelle 2: Wirkstoff-Polymer-Konjugate in klinischer Prüfung.

| Verbindung | Linker | MW [kDa] | Entwicklungsstand |
|--|-------------------------|---------------------------------|------------------------|
| PK1, Doxorubicin-(HPMA-Copolymer) | Gly-Phe-Leu-Gly | 30 | Phase II |
| PK2, galactosaminiertes Doxorubicin-(HPMA-Copolymer) | Gly-Phe-Leu-Gly | 30 | in Phase I abgebrochen |
| PNU-166945, Taxol-(HPMA-Copolymer) | Ester | 40 | Phase I beendet |
| MAG-CPT, Camptothecin-(HPMA-Copolymer) | Gly-6-Aminohexanoyl-Gly | 30 | Phase I beendet |
| AP5280, Diamminplatin(II)-(HPMA-Copolymer) | Gly-Phe-Leu-Gly | 25 | Phase I beendet |
| AP5286, Diamminocyclohexanplatin(II)-(HPMA-Copolymer) | Gly-Phe-Leu-Gly | 25 | Phase I |
| Prothecan, Camptothecin-PEG-Konjugat | Alaninester | 40 | Phase II |
| CT-2103, Taxol-Polyglutamat-Konjugat | Ester | 40 | Phase II/III |
| CT-2106, Camptothecin-Polyglutamat-Konjugat | Glycinester | 50 | Phase I |
| MTX-HSA, Methotrexat-Albumin-Konjugat | – | 67 | Phase II |
| DOXO-EMCH, 6-Maleinimodcaproylhydrazon-Derivat von Doxorubicin | säurelabiles Hydrazon | 67 (albumin-gebundenes Prodrug) | Phase I beendet |



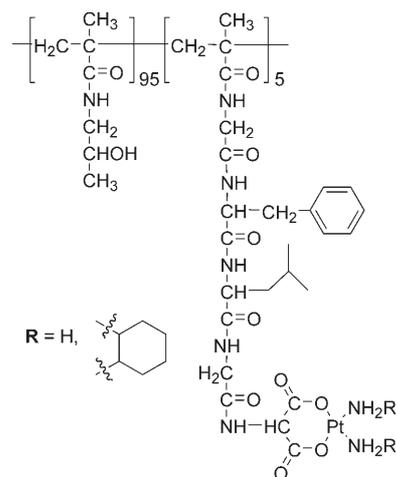
Schema 1. Chemische Strukturen der ersten klinisch erprobten polymeren Krebstherapeutika, PK1 (oben) und PK2 (unten)

Hälfte der MTD von PK1 entspricht, obwohl Molekulargewicht und Beladungsverhältnis der beiden Konjugate sehr ähnlich sind. Die dosislimitierende Toxizität von PK2 war starke Müdigkeit, Neutropenie und Schleimhautentzündungen. Eine Dosis von 120 mg m^{-2} Doxorubicin-Äquivalenten wurde für Phase-II-Studien empfohlen. Zwei partielle Remissionen und eine schwache Response wurden in dieser Studie beobachtet.

Zwei weitere HPMA-Konjugate mit Taxol bzw. Camptothecin wurden in Phase-I-Studien untersucht (Tabelle 2). PNU-166945 ist ein wasserlösliches Konjugat, in dem Taxol an seiner 2-OH-Position über einen Gly-Phe-Leu-Gly-Linker an das Polymerrückgrat gebunden ist. Camptothecin ist im Konjugat MAG-CPT an seiner 20-OH-Gruppe über einen

Gly-6-Aminohexanoyl-Gly-Linker an das HPMA-Copolymer gebunden. Präklinische Ergebnisse waren zwar vielversprechend, beide Konjugate hatten wegen ihres Toxizitätsprofils aber nur eingeschränkten Erfolg in der klinischen Prüfung.^[60,61]

Zwei HPMA-Wirkstoff-Konjugate, die erst kürzlich in Phase-I-Tests aufgenommen wurden, sind AP5280 und AP5286, in denen eine Diammin- oder eine Diamminocyclohexanplatin(II)-Gruppe an einen Dicarboxylatliganden gebunden ist. Dieser ist über den Cathepsin-B-sensitiven Tetrapeptidlinker Gly-Phe-Leu-Gly, der auch in PK1, PK2 und PNU-166945 vorhanden ist, an das Polymer gekuppelt (Schema 2).^[62,63] Interessanterweise bildet die Platin(II)-

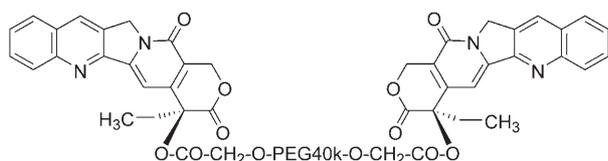


Schema 2. HPMA-Wirkstoff-Konjugate AP5280 und AP5286 mit einer Diammin- bzw. Diamminocyclohexanplatin(II)-Gruppe.

Gruppe während der Synthese anfangs ein O,O-Chelat, das sich dann in das stabilere N,O-Chelat umlagert. Die präklinische Evaluierung belegte eine hohe antitumorale Wirkung und für AP5280 eine signifikant erhöhte MTD verglichen mit den klinischen Standards (Cisplatin und Carboplatin). In einer Phase-I-Studie war die dosislimitierende Toxizität schweres Erbrechen (Grad 3) bei $4500 \text{ mg(Pt) m}^{-2}$ (Platin-Äquivalente); die Dosisempfehlung für die Phase-II-Studie war $3300 \text{ mg(Pt) m}^{-2}$. Bei fünf Patienten wurde eine Stabilisierung der Erkrankung festgestellt.^[64] Detaillierte Übersichten über klinische Studien zu Polymer-Wirkstoff-Konjugaten mit HPMA-Copolymeren wurden von Duncan und Rihova et al. publiziert.^[9,11]

Doxorubicin-Polylactid-Konjugate wurden vor kurzem von Sengupta et al. vorgestellt.^[65] Die Konjugate waren in ein bioabbaubares Polylactidnanopartikel ($\approx 150 \text{ nm}$) eingebettet, um, durch den EPR-Effekt, eine bessere Tumorselektivität zu erreichen.

Das erste Wirkstoffkonjugat mit Polyethylenglycol als Trägerpolymer, das klinisch untersucht wurde, war das Camptothecinkonjugat Prothecan (Schema 3). Das Konjugat, bei dem die 20-OH-Position von Camptothecin über einen Glycinlinker an PEG gebunden ist,^[66-68] weist mehrere Vorteile gegenüber freiem Camptothecin auf: a) Der EPR-Effekt vermittelt die Anreicherung in Tumoren (in präklinischen

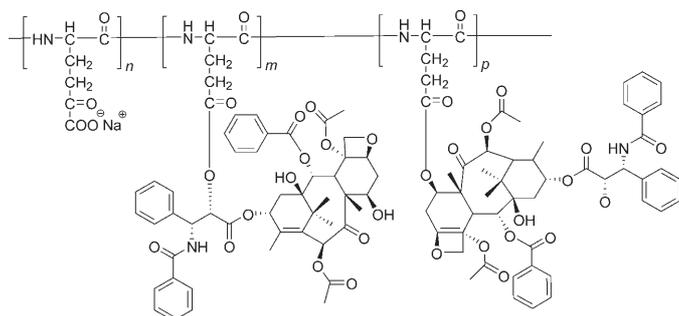


Schema 3. Prothecan, ein Camptothecin-Konjugat mit 40-kDa-PEG.

Modellen). b) Die Veresterung der 20-Hydroxygruppe von Camptothecin stabilisiert den Wirkstoff in seiner aktiven Lacton-Form (geschlossener E-Ring), die sonst unter physiologischen Bedingungen zur inaktiven Hydroxycarbonsäure hydrolysiert. c) Der Einbau eines Glycinlinkers gewährleistet eine kontrollierte Abgabe des Wirkstoffs. d) Die Verwendung von PEG führt zu einer wasserlöslichen Form von Camptothecin.

In präklinischen Studien hatte Prothecan im Tiermodell an humanen Tumoren eine bessere antitumorale Wirksamkeit als freies Camptothecin.^[66–68] Prothecan wird mittlerweile in Phase-II-Studien zur möglichen Behandlung von Magentumoren und gastroesophagealen Tumoren untersucht, nachdem eine Phase-I-Studie eine moderate nichthämatologische Toxizität bei einer MTD von 200 mg m⁻² Camptothecin-Äquivalenten aufzeigte.^[69]

PG-TXL (CT-2103), ein Poly(L-glutaminsäure)-Konjugat von Paclitaxel (Schema 4), ist gegenwärtig das erfolgreichste



Schema 4. PG-TXL (CT-2103), ein Poly(L-glutaminsäure)-Konjugat mit Taxol (Paclitaxel).

Wirkstoff-Polymer-Konjugat und befindet sich in Phase-III-Studien in Kombination mit Standardchemotherapie gegen Ovarialkarzinome und nicht-kleinzelligen Lungenkrebs.^[70] PG-TXL hat ein höheres Beladungsverhältnis (ca. 37 Gew.-% Paclitaxel) als andere Wirkstoff-Polymer-Konjugate, und das Paclitaxel bindet durch seine 2'-OH-Gruppe an das Polyglutaminsäure-Rückgrat. Phase-I- und Phase-II-Studien bei unterschiedlichen Tumoren zeigten vielversprechende Ansprechraten auch bei Patienten, die resistent gegen Therapie mit Taxanen waren.^[71,72] Die empfohlene Dosis für PG-TXL lag zwischen 175 und 235 mg m⁻² (Paclitaxel-Äquivalente), was ungefähr der doppelten Dosis einer üblichen Therapie mit Paclitaxel entspricht. Die dosislimitierende Toxizität des Konjugats war Neurotoxizität und Neutropenie. Eine bemerkenswerte Eigenschaft von PG-TXL ist der physiologi-

sche Abbau des Polyglutaminsäure-Rückgrats und die Freisetzung von Paclitaxel und Paclitaxel-Glutaminsäure-Derivaten *in vitro* und *in vivo*, die vermutlich zum Teil durch Cathepsin B vermittelt wird.^[73] Eine Phase-I-Studie mit einem analog konstruierten PG-Konjugat mit Camptothecin wurde kürzlich erfolgreich beendet.^[74]

Neben synthetischen Polymeren wird auch Albumin in klinischen Studien als Wirkstoffträger untersucht. Es wurde ein Methotrexat-Albumin-Konjugat (MTX-HSA) synthetisiert, indem das Methotrexat direkt an humanes Serumalbumin (HSA) gekuppelt wurde. Dieses Konjugat wies eine signifikante Anreicherung in Rattentumoren und eine hohe antitumorale Wirksamkeit in ausgewählten Nacktmausmodellen auf.^[75,76] Dosislimitierend war Mundschleimhautentzündung bei über 50 mg m⁻² MTX-HSA (MTX-Äquivalente) in einer Phase-I-Studie.^[77] Zwei Patienten mit Nierenzellkarzinom und ein Patient mit Mesotheliom sprachen auf die MTX-HSA-Therapie an (eine partielle Reaktion, zwei schwache Responen). Das Nierenzellkarzinom ist ein Tumor mit niedrigen Ansprechraten auf konventionelle Chemotherapie. Phase-II-Studien werden derzeit durchgeführt.

Neue Ansätze hatten zum Ziel, durch selektive Kupplung von intravenös verabreichten Wirkstoffvorstufen (Prodrugs) an zirkulierendes Albumin ein Wirkstoff-Albumin-Konjugat *in vivo* zu erzeugen.^[78–81] Dieses Prodrug-Konzept zeichnet sich durch zwei Merkmale aus: a) schnelle und selektive Bindung eines mit Maleimid funktionalisierten Prodrugs an die Cystein-34-Position des endogenen Albumins nach intravenöser Gabe und b) Freisetzung des albumingebundenen Wirkstoffes am Zielort durch den Einbau einer säurelabilen oder enzymatisch spaltbaren Bindung zwischen Wirkstoff und Träger.

Ein erster klinischer Kandidat ist das (6-Maleimidocaproyl)hydrazon-Derivat von Doxorubicin, DOXO-EMCH (Abbildung 7), das eine säurelabile Hydrazonbindung als Sollbruchstelle enthält. Mitte 2003 wurde eine Phase-I-Studie mit DOXO-EMCH gestartet, nachdem eine höhere Wirksamkeit und ein verbessertes Toxizitätsprofil verglichen mit freiem Doxorubicin, dem klinischen Standard, nachgewiesen worden war.^[79]

Als Beispiel sind die therapeutischen Effekte von Doxorubicin und DOXO-EMCH in einem Nierenzellkarzinommodell in Abbildung 8 gezeigt. Mäuse, die mit der maximal tolerablen Dosis von Doxorubicin (4 × 6 mg kg⁻¹) behandelt wurden, wiesen charakteristische Nierentumore auf (Körpergewichtsverlust –10%). Hingegen zeigte sich bei Mäusen, die mit DOXO-EMCH bei 4 × 12 mg kg⁻¹ Doxorubicin-Äquivalenten behandelt wurden, kein Körpergewichtsverlust, und bei fast allen Tieren wurde eine komplette Remission erzielt.

In der laufenden Phase-I-Studie mit DOXO-EMCH wurden 37 Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen mit einer intravenösen DOXO-EMCH-Infusion einmal alle drei Wochen in einer Dosierung von 20–340 mg m⁻² Doxorubicin-Äquivalenten behandelt. Die Behandlung mit DOXO-EMCH wurde bis zu einer Dosis von 200 mg m⁻² ohne Nebenwirkungen gut toleriert. Myelosuppression (Grad 1–2), Mucositis (Grad 1–2), Haarausfall (Grad 1–2), Übelkeit und Erbrechen (Grad 1), Mundtrockenheit

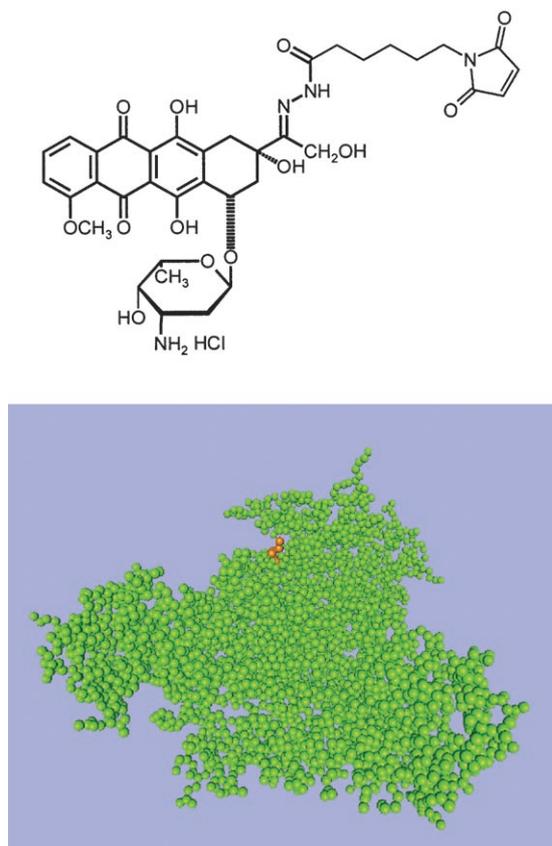


Abbildung 7. Struktur des DOXO-EMCH-Prodrugs, das derzeit in der klinischen Phase I untersucht wird (oben), und Struktur von humanem Serumalbumin (unten); die Bindungsstelle des Prodrugs, Cys 34, ist orange hervorgehoben.

(Grad 1) und Müdigkeit (Grad 1) wurden oberhalb einer Dosis von 260 mg m^{-2} beobachtet und waren durch Myelosuppression (Grad 2–3) sowie Mucositis (Grad 2–3) bei 340 mg m^{-2} dosislimitierend. Bei 29/37 auswertbaren Patienten kam es in 13 Fällen zu einer fortschreitenden Erkrankung, in 13 Fällen stabilisierte sich die Erkrankung und ein Brustkrebs- und ein Sarkom-Patient hatten eine partielle Remission; ein Patient mit kleinzelligem Bronchialkarzinom hatte eine vollständige Remission. Die empfohlene Dosis für Phase-II-Studien liegt nach aller Voraussicht bei 260 mg m^{-2} .

Obwohl sich die klinischen Daten für Wirkstoff-Polymer-Konjugate auf wenige hundert Patienten beschränken, sind einige allgemeine Trends erkennbar. Der Befund aus den präklinischen Studien, dass Wirkstoff-Polymer-Konjugate in höheren maximal tolerablen Dosen eingesetzt werden können als die ungebundenen Wirkstoffe, bestätigte sich in den klinischen Studien. Außerdem ist dem Polymer keine besondere Toxizität zuzuschreiben, und die dosislimitierenden Toxizitäten sind mit denen des freien Wirkstoffs vergleichbar. Die Bedeutung des Molekulargewichts und des spaltbaren Linkers der Wirkstoff-Polymer-Konjugate ist noch nicht geklärt. Die meisten der biologisch nichtabbaubaren Polymere haben Molekulargewichte nahe der Nierenschwelle (ca. 30 kDa, siehe Abschnitt 2.1), wodurch eine Anreicherung



Abbildung 8. Repräsentative photographische Aufnahmen von gesunden Nieren (jeweils links) und tumorbehandelten Nieren (jeweils rechts). Die Entnahme aus je drei Mäusen erfolgte 24 Tage nach Behandlungsbeginn. Gruppe a wurde mit $4 \times 12 \text{ mg kg}^{-1}$ Doxorubicin behandelt (Körpergewichtsänderung: -10%), Gruppe b mit $4 \times 12 \text{ mg kg}^{-1}$ Doxorubicin-Äquivalenten von DOXO-EMCH (Körpergewichtsänderung: $+1\%$).

in soliden Tumoren und eine gewisse renale Ausscheidung stattfindet. Einige Konjugate mit Albumin, Polyglutaminsäure und PEG haben allerdings Molekulargewichte um 40–80 kDa. Ob die Unterschiede im pharmakokinetischen Profil – bedingt durch das unterschiedliche Molekulargewicht – die Toxizität und die antitumorale Wirksamkeit beeinflussen, muss an einer größeren Patientenzahl evaluiert werden.

Ebenfalls Gegenstand weiterer Studien bleibt die im Wirkstoff-Polymer-Konjugat eingebaute Sollbruchstelle. Die Mehrheit der HPMa-Wirkstoff-Konjugate verwendet das Tetrapeptid Gly-Phe-Leu-Gly, das von lysosomalen Enzymen wie Cathepsin B gespalten wird. Präklinische Daten weisen darauf hin, dass die antitumorale Wirksamkeit dieser Konjugate mit der Expression von Cathepsin B im Tumor korreliert.^[57] ein Befund, der noch nicht ausreichend in klinischen Prüfungen berücksichtigt wurde. Detaillierte Kenntnisse zur Expression von tumorassoziierten Proteasen in den einzelnen Tumorentitäten wären bei der zukünftigen Entwicklung von enzymatisch spaltbaren Wirkstoff-Polymer-Konjugaten hilfreich. Ob die Wirkstoff-Polymer-Konjugate, die durch unspezifische Hydrolyse oder im sauren Milieu des Tumors gespalten werden, universeller in der Anwendung sind, muss in klinischen Studien untersucht werden. Erste vorklinische Studien mit Doxorubicin-HPMA-Konjugaten belegen, dass ein säurelabiler Linker wirksamer ist als ein durch Cathepsin B spaltbarer Linker.^[82]

3.3. Ein kombinierter Ansatz: das PDEPT-Konzept

Die polymerdirigierte Enzym-Prodrug-Therapie (PDEPT, polymer-directed enzyme prodrug therapy) ist eine neue zweistufige Antitumortherapie, die ein makromolekulares Prodrug und ein Polymer-Enzym-Konjugat so kombiniert, dass im Tumor ein cytotoxischer Wirkstoff freigesetzt wird.^[83] Im Rahmen der PDEPT wird zunächst das Polymer-Wirkstoff-Konjugat systemisch verabreicht und nach dessen Anreicherung im Tumor das Polymer-Enzym-Konjugat appliziert, das das Wirkstoff-Polymer-Konjugat spaltet (Abbildung 9). Gegenüber der antikörperdirigierten Enzym-Prodrug-Therapie (ADEPT) bietet PDEPT einige Vorteile: Die

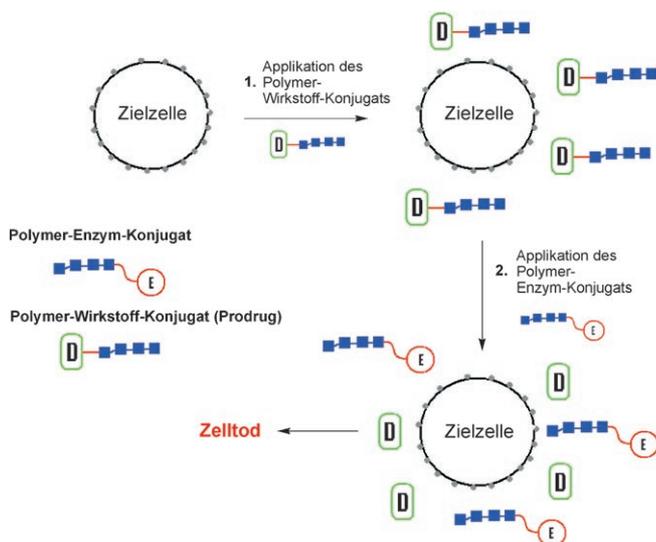


Abbildung 9. Das PDEPT-Konzept: Nach Verabreichung des Polymer-Wirkstoff-Konjugats und Gewebsaufnahme durch EPR wird das Polymer-Enzym-Konjugat zugesetzt, um den Wirkstoff im Tumorgewebe freizusetzen und den Zelltod zu induzieren.

relativ kurze Verweildauer des makromolekularen Prodrugs im Plasma ermöglicht die nachfolgende Applikation des Polymer-Enzym-Konjugats, ohne dass eine maßgebliche Aktivierung des Prodrugs im Blutkreislauf zu befürchten wäre. Des Weiteren ist die Immunogenität von Polymer-Enzym-Konjugaten reduziert.

Zwei PDEPT-Ansätze mit Doxorubicin wurden untersucht: Im einen Fall wurde das makromolekulare Prodrug PK1 (FCE28068; siehe Schema 7 in Abschnitt 3.6.1), das sich zurzeit in der klinischen Prüfung befindet, als ein Modellprodrug in Kombination mit einem (HPMA-Copolymer)-(Cathepsin-B)-Konjugat verwendet. In der polymergebundenen Form behält das (HPMA-Copolymer)-(Cathepsin-B)-Konjugat etwa 20 bis 25 % der ursprünglichen In-vitro-Aktivität von Cathepsin B bei. Nach intravenöser Applikation in tumortragende B16F10-Mäuse führte das Konjugat zu einer 4.2fach höheren Tumoranreicherung als das freie Enzym. Bei Verabreichung von Doxorubicin, PK1 oder der PDEPT-Kombination zur Behandlung von B16F10-Melanomen lag die antitumorale Wirksamkeit (in % T/C = Überlebenszeit der behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe) der

PDEPT-Kombination bei 168 %, verglichen mit 152 % für PK1 allein und 144 % für freies Doxorubicin.^[84]

Eine weitere PDEPT-Kombination besteht aus (HPMA-Copolymer)-(Methacryloyl-Gly.Gly-Cephalosporin)-Doxorubicin (HPMA-co-MA-GG-C-Dox) als makromolekulares Prodrug und einem (HPMA-Copolymer)-Konjugat, das bei Säugetieren nicht vorkommende Enzym β -Lactamase als aktivierende Komponente enthält (HPMA-co-MA-GG- β -L).^[85] HPMA-co-MA-GG-C-Dox hatte ein Molekulargewicht von ca. 31600 Da und einen Doxorubicin-Cephalosporin-Gehalt von 5.85 Gew.-%. Freie β -Lactamase hat ein Molekulargewicht von 45 kDa, das Molekulargewicht des Konjugats HPMA-co-MA-GG- β -L lag im Bereich von 75 bis 150 kDa. Gegenüber dem Cephalosporin-C- und HPMA-co-MA-GG-C-Dox-Substrat behielt das HPMA-co-MA-GG- β -L-Konjugat 70 % bzw. 80 % seiner Aktivität bei. Intravenöse Applikation von HPMA-co-MA-GG-C-Dox und, nach 5 h Wartezeit, von HPMA-co-MA-GG- β -L bei Mäusen mit subkutan implantierten B16F10-Melanomen führte zur Freisetzung von Doxorubicin im Tumor. Die Tumorgöße nahm signifikant ab (T/C = 132 %), und weder freies Doxorubicin noch HPMA-co-MA-GG-C-Dox allein hatten eine antitumorale Wirkung. Weiterhin zeigte die PDEPT-Kombination in den verabreichten Dosen keine Toxizität.^[85]

3.4. Polymerkonjugate mit antiangiogenen Wirkstoffen

Ein therapeutischer Ansatz, der sich vom direkten Angriff polymergebundener Cytostatika auf den Tumor unterscheidet, ist die Hemmung der für das Tumorstadium entscheidenden Angiogenese mit einem HPMA-Polymerkonjugat des Angiogenese-Inhibitors TNP-470.^[86,87] Der Ansatz erbrachte vielversprechende Ergebnisse in einem Mausmodell, und es wurde keine mit dem Wirkstoff verbundene Toxizität festgestellt.

3.5. Multivalente Therapeutika

Ein grundlegend anderer Zugang zu polymeren Therapeutika basiert auf den multiplen Wechselwirkungen von Liganden, die mit dem Polymer verbunden sind und gleichzeitig mit multiplen Rezeptorstellen in Proteinkomplexen oder multiplen Rezeptoren auf einer Oberfläche wechselwirken. Dieses Konzept ahmt biologische Wechselwirkungen wie zelluläre Erkennung und Signalübertragung nach, bei denen multivalente Vorgänge eine wichtige Rolle spielen. Trotz vieler interessanter Ansätze wurden bisher nur wenige klinische Entwicklungen verfolgt.

3.5.1. Multivalente Wirkstoffe (Toxine und Bakterien)

Eine Reihe multivalenter Inhibitoren wurde entwickelt, die auf Wirkstoffen mit niedrigem Molekulargewicht basieren und dimere oder multimerer Proteine angreifen, die mehrere identische Rezeptorstellen enthalten.^[49,50] Beispielsweise wurde über einen pentavalenten sternförmigen Kohlenhydratliganden berichtet, der exakt in die Bindungstasche der

fünf Untereinheiten des Shiga-ähnlichen Bakterientoxins passt, eines engen Verwandten des Cholera-toxins (Abbildung 10).^[88] Die Bindungsaffinität bei dieser pentavalenten Wechselwirkung ist um den Faktor 10^7 höher als beim mo-

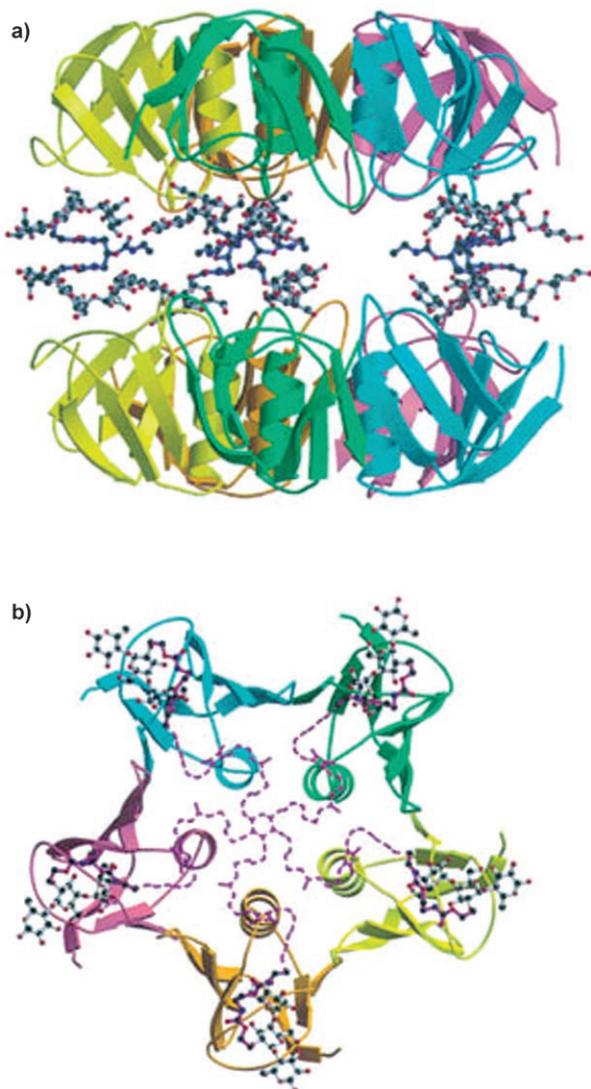


Abbildung 10. Pentavalente Bindung eines Polysaccharidinhibitors an das dimere Shiga-ähnliche Toxin: a) Seitenansicht, b) Ansicht von oben. (In modifizierter Form aus Lit. [88].)

novalenten Liganden. Das Beispiel zeigt deutlich, dass dendritische und sternförmige Moleküle geeignete Gerüste sind, um Liganden für multivalente Wechselwirkungen zu präsentieren.

Ein weiteres Beispiel ist die Bindung von Vancomycin-derivaten oder -oligomeren an das D-Ala-D-Ala-Motiv der bakteriellen Zellwand. Whitesides et al. berichteten über divalente und trivalente Vancomycin-derivate mit sehr hohen Bindungsaffinitäten. Der trivalente Modellkomplex Vancomycin-D-Ala-D-Ala hat mit einer Dissoziationskonstanten von $4 \times 10^{-17} \text{ M}$ eine höhere Affinität als der Avidin-Biotin-Komplex.^[89-91]

Das Konzept multivalenter Wechselwirkungen mit Vancomycin wurde von der pharmazeutischen Industrie für In-vivo- und klinische Studien aufgegriffen. Zum Beispiel berichteten Theravance (South San Francisco) über den Wirkstoff Telavancin, ein sehr schnell bakterizid wirkendes, injizierbares Antibiotikum, das auf einem Vancomycinderivat mit mehreren Wirkmechanismen basiert. Diese Entwicklung ist Teil eines Forschungsprogramms zu multivalenten Wirkstoffen, das sich der Erforschung von neuen Antibiotika gegen schwere Infektionen mit *Staphylococcus aureus* (einschließlich hochresistenter Stämme) und anderen Gram-positiven Bakterien widmet.^[92] Telavancin befindet sich zurzeit in klinischen Phase-III-Studien.

3.5.2. Multivalente Wechselwirkungen an Oberflächen – Inhibition der Virusanheftung

Die Inhibition der Virenanheftung an Zelloberflächen ist eine wichtige Strategie zur Verhinderung von Virusinfektionen wie Influenza und HIV-Infektion. Wie in Abbildung 11

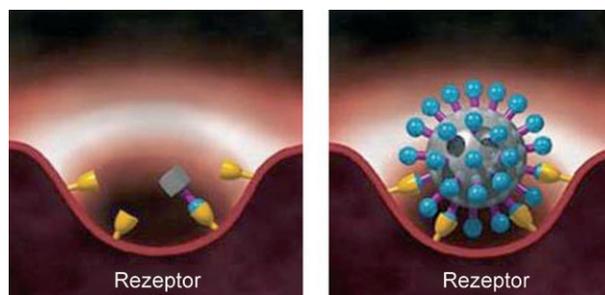


Abbildung 11. Monovalente Bindung eines Wirkstoffs (links) und multivalente Bindung eines Viruspartikels an eine Zelloberfläche (rechts). (Mit freundlicher Genehmigung von Starpharma.)

dargestellt ist, können herkömmliche monovalente Wirkstoffe die multiplen Adhäsionen des Virus an die Zelloberfläche nicht verhindern. Deshalb ist die Entwicklung von multivalenten Liganden (Abbildung 5), die an Membranproteine von Viren binden, ein wichtiges Forschungsziel.

Viele Strukturtypen von Polymeren, darunter lineare, sternförmige und dendritische Strukturen (Abbildung 2), wurden als Gerüste für multivalente Wirkstoffe in Betracht gezogen.^[49,50,93-95] Neben linearen Glycopolymere wurden verschiedene Dendrimere als multivalente Liganden für zuckerbindende Proteine (z. B. Lectine) mit multiplen Kohlenhydratanteilen an der Oberfläche („Zuckerhülle“) untersucht. Zum Beispiel zeigen L-Lysin-Dendrimere mit 2 bis 16 Sialinsäureresten verstärkte Bindungsaffinitäten im *Limax-flavus*-Lectinpräzipitationstest und Hämagglutinationstest von Erythrocyten.^[96] In diesen Systemen scheinen vier bis sechs Sialinsäurereste ideal für die antivirale Aktivität gegen Influenza-A-Viren zu sein. Dabei wurde eine 200fach höhere Bindungsaffinität zum trivalenten Hämagglutinin verglichen mit dem monovalenten Liganden erzielt. Eine Haupteinschränkung dieses Ansatzes besteht darin, dass Dendrimere (3–5 nm) viel kleiner sind als die Abstände der Rezeptor-

stellen auf der Virusoberfläche und somit nur an einen oder zwei trivalente Hämagglutininrezeptoren binden können (Abbildung 12). Ein lineares Acrylamidpolymer mit hohem Molekulargewicht (10^6 Da) zeigte in vitro einen bis zu

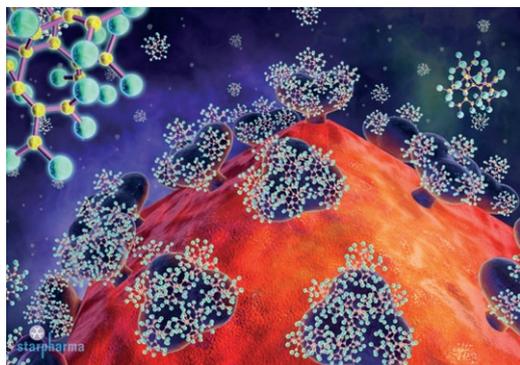


Abbildung 12. Größenverhältnis zwischen einem HIV-Partikel mit seinen trivalenten Oberflächenrezeptoren und dendritischen Wirkstoffkonjugaten. (Mit freundlicher Genehmigung von Starpharma.)

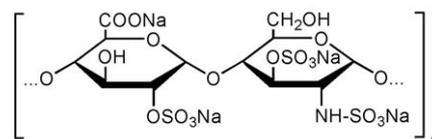
10^8 -fachen Anstieg der Bindungsaffinität und blockierte den Angriff des Influenzavirus auf die Zelloberfläche sehr viel effektiver.^[97,98] Allerdings ist dieses Polymer zu groß, um über die Nieren ausgeschieden zu werden, und ein schneller Bioabbau ist unwahrscheinlich. Abgesehen von seiner sehr hohen Bindungskonstanten kann es die Viruspartikel sterisch abschirmen, wenn es in Kombination mit anderen monovalenten Liganden verwendet wird.^[99]

Starpharma (Melbourne) befasst sich ebenfalls mit der Entwicklung von multivalenten Wirkstoffen. Ein Beispiel ist die mikrobiozide Substanz VivaGel, ein topisches Vaginalgel, das möglicherweise die Übertragung von HIV verhindern oder das Infektionsrisiko vermindern kann. VivaGel ist ein dendritisches Polyanion auf der Basis eines Polylysin-Kerns und wird gegenwärtig in klinischen Phase-II-Studien getestet. Verschiedene therapeutische Ansätze von Starpharma basieren auf multivalenten Dendrimeren, die die Bindungsaffinität zu multivalenten Rezeptoren oder Rezeptoren auf Zelloberflächen erhöhen können.^[100]

Ein weiterer Ansatz zur HIV-Prävention basierend auf multivalenten Wechselwirkungen wurde von Shaunak et al. beschrieben.^[101] Dextrin-2-sulfat blockiert sehr effektiv die HIV-Infektion, indem es an die Zelloberflächen bindet. Die Wirksamkeit dieser multivalenten Wechselwirkung wurde in klinischen Phase-II-Studien nachgewiesen.

3.5.3. Polyanionische Polymere: Heparinanaloga

Heparin, ein Glycosaminoglycan (Schema 5), ist seit fast siebzig Jahren der Wirkstoff der Wahl zur Vorbeugung und Behandlung von thromboembolischen Beschwerden. Es besteht ein großes Interesse an Alternativen sowohl für unfraktioniertes Heparin (UFH) als auch für Heparine mit niedrigerem Molekulargewicht (low-molecular weight heparins; LMWH), da Heparin einige Nachteile aufweist: Erstens muss es aus Säugetierorganen isoliert werden, was zu Kon-



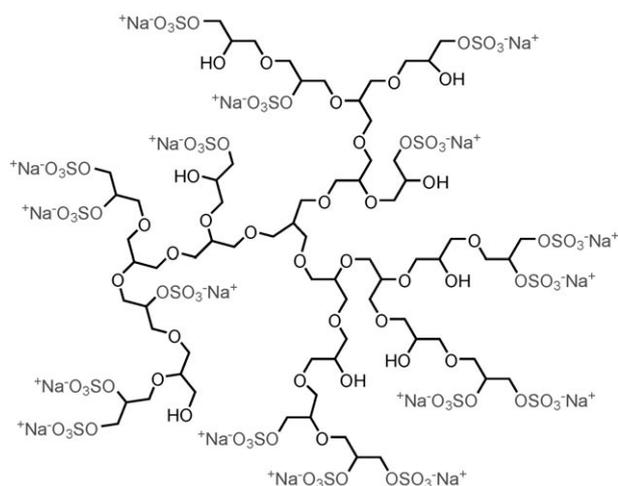
Schema 5. Struktur einer Heparinuntereinheit.

tamination mit Pathogenen wie Viren oder Prionen führen kann, zweitens kommt es durch den steigenden Verbrauch an Heparin, besonders von LMWH, zu einer zunehmenden Knappheit des Rohmaterials, und drittens ist Heparin eine polydisperse Mischung von Molekülen unterschiedlicher Kettenlänge und chemischer Struktur.^[102] Etliche Parameter, wie die verwendete Tierart zur Gewinnung des Heparins, die Isolationsmethode oder der Reinigungsgrad des Produktes, beeinflussen die Zusammensetzung, sodass Heparinpräparate eine große chemische und damit auch pharmakologische Variationsbreite haben.

Zusätzlich zu ihrer antithrombotischen Aktivität zeichnen sich Heparin und andere natürliche sulfatierte Polysaccharide durch eine Reihe weiterer Wirkmechanismen aus, darunter Komplementinhibition,^[103] antiinflammatorische,^[104,105] antiangiogene,^[106] antimetastatische,^[107] antiarteriosklerotische,^[108] antiproliferative,^[109] antiadhäsive^[110] und antivirale Effekte.^[111] Diese zusätzlichen Wirkmechanismen können in manchen Fällen zum therapeutischen Nutzen von Heparin beitragen.^[107]

Aus den genannten Gründen sind Heparinanaloga mit gleichem oder sogar verbessertem pharmakologischem Profil, aber ohne die Nachteile des Tierproduktes von großem Interesse. Neben partialsynthetischen sulfatierten linearen Polysacchariden^[112,113] gelten auch vollsynthetische sulfatierte lineare Polymere,^[114] die frei von Kohlenhydraten sind, als vielversprechende Heparin-Mimetika.^[115] Kürzlich wurde ein neuer Typ eines polysulfatierten Heparinanalogs basierend auf verzweigten Polysacchariden beschrieben, der eine viel höhere koagulationshemmende Aktivität als entsprechende lineare Spezies zeigt.^[116] Angesichts nur weniger natürlicher Quellen sind verzweigte Polysaccharide jedoch relativ schwer zugänglich, weshalb ein einfacher und effizienter Weg zu hochverzweigten polysulfatierten Heparinanaloga basierend auf dendritischen Polyglycerinen entwickelt wurde (Schema 6).^[117] Diese Polyglycerinsulfate verlängern die aktivierte partielle Thromboplastinzeit ebenso wie die Thrombinzeit und inhibieren sowohl die klassische als auch die alternative Komplementaktivierung effektiver als Heparin selbst. Anders als bei sulfatierten Polysacchariden hängen ihre Aktivitäten nicht direkt vom Molekulargewicht ab, was mit der globulären 3D-Struktur der dendritischen Polyglycerinsulfate zusammenhängen könnte. Da Gerinnung, Komplementaktivierung und Entzündung zur Pathophysiologie zahlreicher Erkrankungen gehören, sind Polyglycerinsulfate mit Antikoagulations- und Antikomplementaktivität vielversprechende Kandidaten für die Wirkstoffentwicklung.

Kürzlich wurden immunmodulatorische und antiangiogene Eigenschaften von Glucosamin-modifizierten Polyamidoamin(PAMAM)-Dendrimeren beschrieben. Wenn dendrimeres Glucosamin und dendrimeres Glucosamin-6-



Schema 6. Dendritisches Polyglycerinsulfat als entzündungshemmendes Heparinanalogen.

sulfat zusammen in einem validierten und klinisch relevanten Kaninchenmodell zur Bildung von Narbengewebe nach Glaukom-Filtrations-Operation angewendet wurden, so verbesserte sich der Langzeiterfolg der Operation von 30% auf 80%.^[118]

3.5.4. Polykationische Polymere als DNA/RNA-Transfektionsmittel

Angesichts der Probleme, die mit der viralen Gentransfektion einhergehen (z. B. Immunantwort und begrenzte Selektivität), befasst man sich intensiv mit der Suche nach nichtviralen Alternativen.^[119] Im Laufe der letzten zehn Jahre wurden viele Methoden untersucht, die auf der Verwendung von kationischen Amphiphilen, Polymeren und Blockcopolymeren sowie anderen pH-schaltbaren Polymeren beruhen.^[120–125] Die kolloidale Oberfläche und die chemischen Eigenschaften von DNA- und RNA-Komplexen mit Polykationen steuern das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Genabgabe an die Zelle. Allerdings müssen zusätzliche Hürden auf der zellulären Ebene überwunden werden (Abbildung 13): Die Komplexe müssen durch die Zellmembran in die Zelle gelangen, dem Abbau in endosomalen oder lysosomalen Kompartimenten im Cytoplasma entgehen und in den Zellkern eindringen. Die physikochemischen Charakteristika der Polyplexe (Größe, Ladung, Hydrophobie, Pufferkapazität) spielen für den effizienten Transport und die biologische Aktivität von Genwirkstoffen eine wichtige Rolle.^[126]

Die Protonenschwamm-Hypothese postuliert eine verstärkte Transfektion durch kationische Polymer-DNA-Komplexe (Polyplexe), die protonenpuffernde Polyamine durch verstärkte endosomale Chlorid-Akkumulation enthalten und zu osmotischer Schwellung und Lyse des Endosoms führen (Abbildung 13).^[127] Für therapeutische Anwendungen ist aber ein früher endosomaler Freisetzungsmechanismus gegenüber einer lysosomalen Fusion vorzuziehen, um eine Freisetzung lysosomaler Enzyme in das Cytosol zu verhindern.^[128]

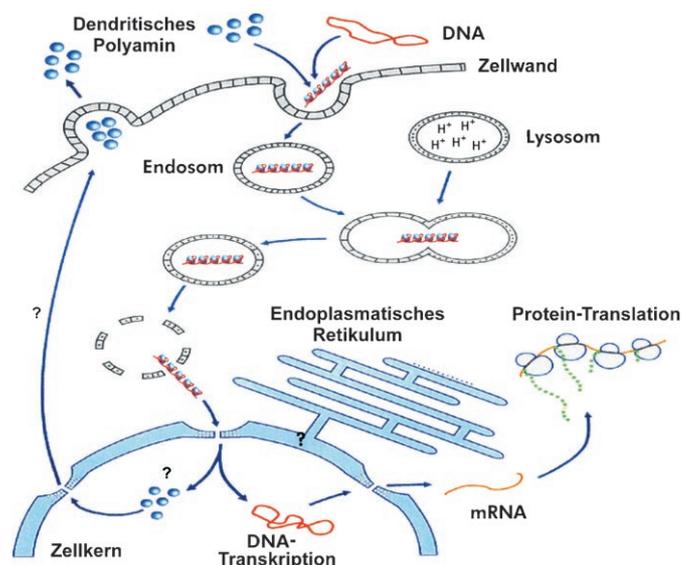


Abbildung 13. Intrazelluläre Aufnahme von therapeutischer DNA oder RNA durch polykationische Polymere, insbesondere dendritische Polyamine.

Die zum In-vitro-Genentransport meistgenutzten kationischen Polymere sind Polyethylenimin (PEI), Poly(L-lysin) und Chitosane. Eine weitere Spezies sind Polyamin-Dendrimere,^[120, 129, 130] die die globuläre Form des natürlichen Proteinkomplexes imitieren. Allerdings erfordern dendritische Strukturen im Größenbereich des Histonkomplexes (ca. 8 nm)^[131] einen sehr hohen Syntheseaufwand (12–18 Stufen).^[132] Auch die Beobachtung, dass ein teilweise zerstörtes (hydrolysiertes) dendritisches Rückgrat sogar eine höhere Transfektionsgeschwindigkeit zeigte,^[129, 133] unterstreicht die Bedeutung leicht verfügbarer Alternativen.

Ein einfacher Ansatz zur Synthese von dendritischen Polyaminen mit unterschiedlichem Molekulargewicht und einstellbarer Flexibilität (Verzweigungsgrad) wurde kürzlich beschrieben.^[134] Beide Parameter beeinflussen die Effektivität der Transfektion und die Cytotoxizität. Durch zweistufige Funktionalisierung von hyperververzweigtem PEI konnten partiell oder voll verzweigte Pseudodendrimere erzeugt werden (Analoge von Polypropylenimin(PPI)- und Polyamidoamin-(PAMAM)-Dendrimern). Die höchsten DNA-Transfektionseffizienzen wurden bei Molekulargewichten zwischen $M_n = 5000$ und 10000 g mol^{-1} der nicht funktionalisierten PEI-Kerne beobachtet, was ungefähr der Größe der natürlichen Histone entspricht (8 nm). Maximale Transfektionseffizienz wurde bei einem 58-prozentigen Verzweigungsgrad des PPI-Analogons und einem Molekulargewicht des PEI-Kerns von $M_n = 10000 \text{ g mol}^{-1}$ im β -Gal-Assay für verschiedene Zelllinien festgestellt.

PEGylierte Polyethylenimine^[135] wurden kürzlich zum Transport von siRNA in tumortragenden Mäusen verwendet.^[136] Die Experimente zeigten das Potenzial polykationischer Träger für therapeutische Anwendungen in vivo auf. Jedoch muss die Toxizität dieser Systeme noch weiter reduziert werden.

3.6. Supramolekulare Polymer-Wirkstoff-Komplexe

Ein großes Hindernis bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe ist die geringe Löslichkeit vieler Substanzen im wässrigen Milieu des Körpers. Oftmals wird die therapeutische Wirkung durch eine zu geringe Dosis am Wirkort beeinträchtigt, was dazu führt, dass Wirkstoffkandidaten entweder nicht klinisch einsetzbar sind oder nur in großen Volumina wässrig-ethanolischer Lösungen, in Verbindung mit Tensiden oder als chemisch modifizierte Wirkstoffvorstufen verabreicht werden können. Solche Modifikationen führen jedoch häufig zu geringeren Wirksamkeiten oder haben sogar gegenläufige Effekte.

Viele Ansätze zum Transport hydrophober Wirkstoffe beruhen auf der Verwendung von polymeren Trägersystemen wie Blockcopolymeren und dendritischen Polymeren.^[4,13]

3.6.1. Blockcopolymermicellen

Im Allgemeinen sind polymere Micellen (Abbildung 14) stabiler als Micellen aus kleinen Tensidmolekülen. Dank ihrer langsameren Dissoziation können sie verkapselte Wirkstoffe

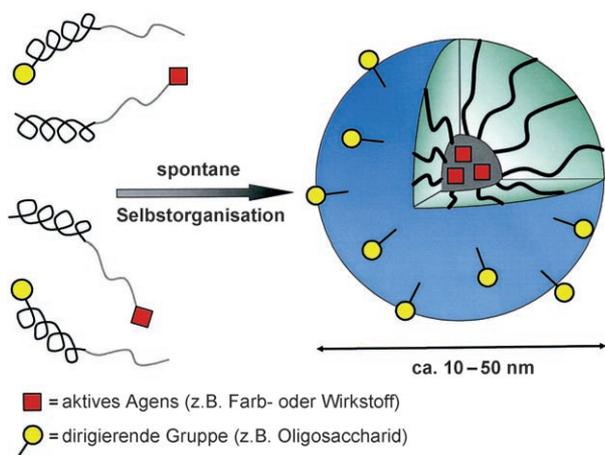


Abbildung 14. Aufbau von Blockcopolymermicellen durch spontane Selbstorganisation in Wasser. Charakteristisch ist eine ausgeprägte Kern-Schale-Architektur, die über die einzelnen Polymerblöcke gesteuert werden kann. Beispiele für solche Micellen sind PEO-*b*-PPO, PEO-*b*-PCL und PEO-*b*-PASP.

über einen längeren Zeitraum stabilisieren und transportieren.^[137,138] Die Blockcopolymermicellen bilden sich in Wasser spontan durch Selbstorganisation, sobald die Konzentration der amphiphilen Blockcopolymere die kritische micellare Konzentration (CMC) übersteigt.^[139] Die treibende Kraft kann zum einen eine hydrophobe Wechselwirkung des inneren Blocks sein, z. B. bei einem unpolaren Poly(caprolacton)-Block (PLC), zum anderen eine ionische Wechselwirkung, z. B. bei einem Poly(aspartat)-Block (PASP) im Komplex mit einem negativ geladenen Polymer wie DNA (Bildung einer polyionischen Micelle).^[140] Der äußere Block ist in vielen Fällen ein polarer Poly(ethylenoxid)-Block (PEO), der die Schale des Nanotransporters bildet und damit den Kern durch sterische Stabilisierung schützt. Es konnte gezeigt werden,

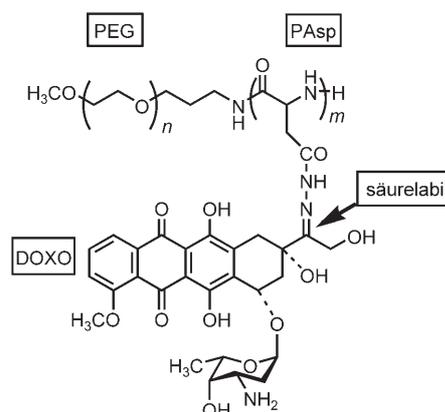
dass PEO die Adsorption von Proteinen verhindert^[141,142] und somit eine biokompatible polymere Nanotransporterschale bildet.

Die Größe der Blockcopolymermicellen wird durch thermodynamische Parameter bestimmt, eine gewisse Steuerung ist auch durch Variation der Blocklänge möglich.^[143] Übliche Durchmesser liegen bei 20–50 nm bei einer relativ engen Größenverteilung. In ihrer Größe ähneln sie damit Viren, Lipoproteinen und anderen natürlichen Transportsystemen.^[137] Ein großes Hindernis für derartige Nanotransporter ist die unspezifische Aufnahme durch das reticuloendotheliale System (RES). Größe und Oberflächeneigenschaften von Blockcopolymer-Nanotransportern müssen daher sorgfältig eingestellt werden, damit lange Zirkulationszeiten im Blut gewährleistet sind und die verkapselten Wirkstoffe ihren Wirkungsort erreichen können.^[144]

Über die Polarität und Funktionalität jedes Blocks kann die Bildung von Kern-Schale-Architekturen gesteuert werden. Endständige Funktionalitäten am äußeren Block (Schale) beeinflussen die Biokompatibilität, und gegebenenfalls können dirigierende Gruppen angebracht werden. Der innere Block dient zur Komplexierung oder kovalenten Bindung an aktive Wirkstoffmoleküle (siehe Abbildung 14). Das Konzept der Kern-Schale-Architektur wird häufig zur Solubilisierung unpolarer Wirkstoffe mit geringer Löslichkeit in Wasser verwendet; Beispiele für Blockcopolymere sind die Pluronic: PEO-*b*-PPO und PEO-*b*-PPO-*b*-PEO.^[26]

Durch Anbringen einer Blockcopolymerschale um ein dendritisches Porphyrin wurden ebenfalls supramolekulare Aggregate hergestellt.^[145] Diese „aufgepumpten“ Micellen (ca. 100 nm) sind durch den verstärkten EPR-Effekt möglicherweise deutlich spezifischer für Tumorgewebe als bisherige Kern-Schale-Micellen.

Kataoka et al. beschrieben kürzlich einen pH-sensitiven supramolekularen Nanotransporter für Doxorubicin, der auf biokompatiblen Blockcopolymermicellen basiert.^[146] Das System unterscheidet sich grundlegend von den bisherigen Polymer-Wirkstoff-Konjugaten, bei denen die Cytostatika kovalent an einzelne Makromolekülketten gebunden sind. Das Doxorubicin wurde über einen säurelabilen Hydrazonlinker an ein PEO-*b*-PASP-Copolymer gekuppelt (Schema 7).



Schema 7. Doxorubicin-Blockcopolymer-Konjugat, das durch spontane Selbstorganisation in Wasser eine Micelle bildet. Die säurelabile Hydrazonbindung wird bei pH < 6 gespalten, und Doxorubicin wird freigesetzt.

Nach der spontanen Selbstorganisation der wirkstoffbeladenen supramolekularen Nanotransporter (siehe Abbildung 14) kommt es laut kinetischer Analysen zur effektiven Spaltung der Hydrazonbindungen bei $\text{pH} \leq 5$ unter Freisetzung von Doxorubicin. Unter den physiologischen Bedingungen im Zellkulturmedium ($\text{pH} \approx 7$) war die Freisetzung vernachlässigbar gering.

Die mit Doxorubicin beladenen Nanotransporter waren *in vitro* cytotoxisch gegen eine kleinzellige humane Lungenkrebszelllinie (SBC-3) und wurden zeitabhängig durch Endocytose in die Zellen aufgenommen. Erste Kandidaten von Antitumorwirkstoffen auf der Basis von Polymermicellen sind in Japan für klinische Prüfungen in Vorbereitung.^[147]

3.6.2. Nanotransporter auf Basis von dendritischen Polymeren

Physikalische Aggregate aus amphiphilen micellaren Strukturen werden häufig als Wirkstofftransportsysteme genutzt,^[5] können aber wegen ihres nichtkovalenten Aufbaus instabil sein, vor allem unter dem Einfluss von Scherkräften und anderen äußeren Einflüssen wie hoher Verdünnung,^[143] hoher Temperatur und hohem Druck, z. B. während der Sterilisation. Ein alternativer Ansatz ist die kovalente Verknüpfung dendritischer Makromoleküle mit einer entsprechenden Schale. Dabei entstehen stabile micellenartige Strukturen, die sich zur nichtkovalenten Verkapselung von Gastmolekülen verwenden lassen (Abbildung 15).^[148, 149, 162]

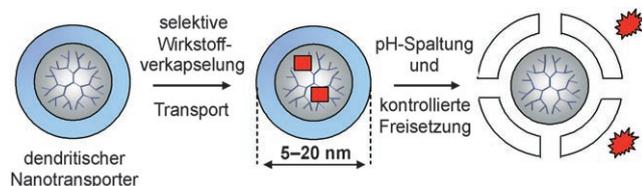


Abbildung 15. Unimolekularer dendritischer Nanotransporter für die Verkapselung und den Transport von biologisch aktiven Verbindungen (z. B. DNA, RNA, Farb- und Wirkstoffen). Die verkapselten Moleküle werden gezielt in saurem Milieu z. B. des Tumorgewebes freigesetzt, wobei die säurelabilen Linker der Kern-Schale-Struktur kontrolliert gespalten werden.

Die Größe dieser dendritischen Nanotransporter kann zwischen 5 und 20 nm exakt festgelegt werden. Die Verkapselung von Gastmolekülen beruht auf nichtkovalenten Wechselwirkungen (z. B. ionischen Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken und Van-der-Waals-Wechselwirkungen). Sie kann so konzipiert werden, dass sich unterschiedliche Wirkstoffe transportieren lassen, während Wirkstoff-Polymer-Konjugate individuell und in aufwändigen mehrstufigen Synthesen hergestellt werden müssen.

Dendritische Polymere mit ihrem genau definierten unimolekularen Aufbau können im Kern (zur Erhöhung der Hydrophobie) oder in der Schale (zur Erhöhung der Hydrophilie) weiter chemisch modifiziert werden. Diese dendritischen Nanotransporter werden derzeit intensiv für die Solubilisierung und den Transport von Wirkstoffen untersucht.^[15] Beispielsweise wurde in ersten Arbeiten gezeigt, dass der

schwer wasserlösliche Antitumorwirkstoff Taxol durch Komplexierung in Glycerindendrimeren^[150] der 3. bis 5. Generation in Wasser gelöst werden kann.^[151] PEGylierung von dendritischen PEI-, PPI- und PAMAM-Architekturen führte ebenfalls zu wasserlöslichen Nanotransportern, die kleine organische Moleküle einschließlich Cytostatika solubilisieren.^[152-156]

Die Verkapselung und der Transport von Gastmolekülen in dendritischen Architekturen wurde von mehreren Arbeitsgruppen untersucht,^[13, 148] dennoch ist bis heute sehr wenig über die aktive Abgabe der verkapselten Gastmoleküle durch pH-induzierte Spaltung der Schale im physiologischen pH-Bereich bekannt (Abbildung 15). In vielen Fällen wurde die pH-abhängige Freisetzung aus dendritischen Kern-Schale-Architekturen nur unter drastischen Bedingungen^[157] oder durch Protonierung von Poly(propylenamin)-Dendrimeren^[158] und deren Derivaten erreicht.^[159]

Kürzlich haben wir über ein einfaches und allgemeines Konzept zur Herstellung von Kern-Schale-Architekturen aus einfach zugänglichen hyperververzweigten Polymeren berichtet.^[160] Mehrere pH-sensitive Nanotransporter wurden auf der Basis von kommerziellen dendritischen Kernstrukturen hergestellt (Polyglycerin und Polyethylenimin), indem eine pH-sensitive Schale beispielsweise über Iminbindungen angebracht wurde (Abbildung 16). In einigen Fällen wiesen die Nanotransporter sehr hohe Transportkapazitäten auf, was ein weiteres wichtiges Kriterium für einen effizienten Wirkstofftransport ist. Unterschiedliche Gastmoleküle wie polare

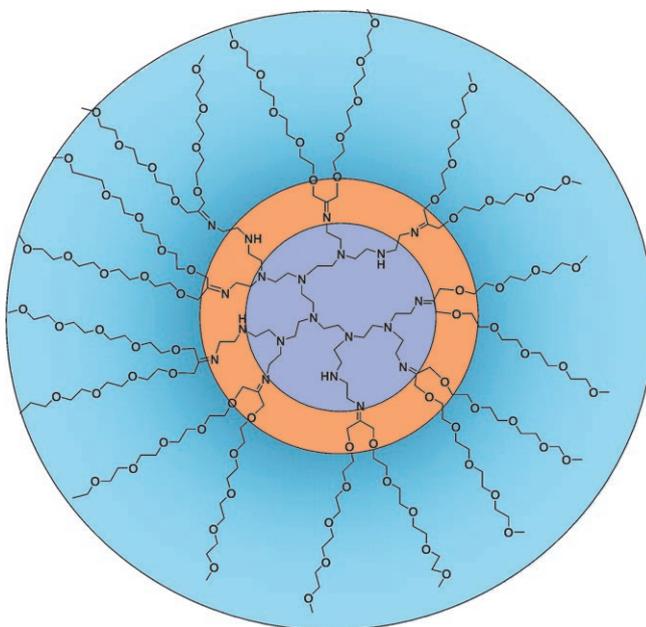


Abbildung 16. Dendritische Kern-Schale-Architektur auf der Basis von kommerziell erhältlichem hyperververzweigtem PEI mit säurelabilem Linker (orange) und biokompatibler PEG-Schale (blau). Die dendritische Architektur bildet stabile supramolekulare Komplexe mit Gastmolekülen wie Farb- und Wirkstoffen oder Oligonucleotiden. Die Iminbindung wird bei pH 6 rasch unter Freisetzung der verkapselten Gastmoleküle gespalten. Die abgebildete Struktur zeigt ein idealisiertes Fragment des wesentlich größeren dendritischen Polyaminkerns.

Farbstoffe, Oligonucleotide und Cytostatika wurden in den dendritischen Kern-Schale-Architekturen verkapselt.

Die dendritischen Polyamin-Kernstrukturen mit Imin-verknüpfter Schale (Abbildung 16) zeigten das erforderliche Freisetzungprofil im Tumorgewebe: schnelle Freisetzung bei pH 5–6 und nur langsame Freisetzung bei pH 7.4.^[156] Diese supramolekularen Systeme werden derzeit von uns auf ihre Eigenschaften beim Transport von Cytostatika untersucht.

4. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Die Entwicklung polymerer Therapeutika ist ein spannendes Forschungsgebiet, das vielversprechende Möglichkeiten bietet, die Toxizität und Wirksamkeit von Wirkstoffen zu verbessern. Die PEGylierung therapeutisch relevanter Proteine ist mittlerweile eine etablierte Methode, und wenn man bedenkt, dass sich einige Hundert proteinbasierte Therapeutika in der klinischen oder präklinischen Entwicklung befinden, ist davon auszugehen, dass neue PEGylierte Proteine in den nächsten Jahren die Marktzulassung erhalten werden.

Ausgangspunkt der Entwicklung von tumorhemmenden Polymer-Wirkstoff-Konjugaten ist der EPR-Effekt, der zu einer passiven Anreicherung von Makromolekülen in soliden Tumoren führt; zahlreiche makromolekulare Prodrugs hatten in präklinischen Modellen eine stärkere antitumorale Wirkung als ihre Stammsubstanzen. Mehrere Kandidaten befinden sich in der klinischen Prüfung, und in den meisten Fällen wurde ein gutes Toxizitätsprofil nachgewiesen. Um das Konzept der Wirkstoff-Polymer-Konjugate zu validieren, werden vergleichende Studien zu den etablierten klinischen Protokollen sowie Forschungen zum EPR-Effekt beim Menschen und zur klinischen Bedeutung von tumorassoziierten Proteasen notwendig sein.

Weitere Konzepte, wie multivalente Wechselwirkungen sowie die Mimikry von funktionalen Biomolekülen durch synthetische Analoga, sind vielversprechend, über Effekte in vivo ist bislang aber nur wenig bekannt.

Insgesamt bieten sich mit der Bionanotechnologie völlig neue Perspektiven bei der Entwicklung polymerer Therapeutika. Mit Nanotransportern, die in der Lage wären, auf physiologische oder biochemische Eigenschaften von infektiösen oder bösartigen Erkrankungen anzusprechen, sollte es möglich sein, große Mengen eines Wirkstoffs direkt an den Krankheitsort zu transportieren und dort gezielt freizusetzen.

Für die Zukunft werden weitere biologisch abbaubare Polymere mit hohem Molekulargewicht und hoher Präzision ($M_n > 30000 \text{ g mol}^{-1}$, Polydispersität < 1.5) sowie neue modulare Zugänge zu „intelligenten“ polymeren Nanotransportern benötigt. Bei der Auswahl der polymeren Therapeutika sollten Wirksamkeit, Toxizität und Pharmakokinetik eines Kandidaten möglichst in einer frühen Phase geprüft werden, letztendlich werden aber nur In-vivo-Studien über das Schicksal eines potenziellen Wirkstoffs entscheiden.

Als Ansporn für aktive Forscher und diejenigen, die es werden wollen, sei in diesem Sinne Helmut Ringsdorf zur Zukunft der makromolekularen Chemie zitiert:^[161]

„Die Zeit ist sicherlich nicht mehr fern, dass Pharmaka nicht nur zell- und gewebespezifisch angreifen müssen, sondern darüber hinaus ein spezifisches Verhalten im Cytoplasma der Zelle zeigen müssen.“

Wir danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (Nanonachwuchswettbewerb), der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Deutschen Krebshilfe, der Wilhelm-Sander-Stiftung und dem Fonds der Chemischen Industrie für die finanzielle Unterstützung sowie Dr. Pamela Winchester und Michal Radowski für ihre große Hilfe bei der Erstellung des Manuskriptes. Helmut Ringsdorf und Ruth Duncan sei für die vielen hilfreichen und fruchtbaren Diskussionen während der Vorbereitung des Manuskriptes gedankt.

Eingegangen am 17. Juni 2005

Online veröffentlicht am 30. Januar 2006

Übersetzt von Dr. Stefanie Hultsch

- [1] Der therapeutische Index eines Wirkstoffes ist als Verhältnis der toxischen Dosis zur therapeutischen Dosis definiert.
- [2] Der Begriff „polymere Therapeutika“ wurde von Helmut Ringsdorf und Ruth Duncan geprägt. Ein allgemeinerer Ausdruck, der bisweilen verwendet wird, ist „Nanomedizin“.
- [3] L. Gros, H. Ringsdorf, H. Schupp, *Angew. Chem.* **1981**, *93*, 311–331; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1981**, *20*, 305–325.
- [4] R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 347–360.
- [5] R. Duncan in *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, Vol. 14 (Hrsg.: R. A. Meyers), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**, S. 163–204.
- [6] G. Kohler, C. Milstein, *Nature* **1975**, *256*, 495–497.
- [7] H. Ringsdorf, *J. Polym. Sci. Polym. Symp.* **1975**, *51*, 135–153.
- [8] A. Godwin, K. Bolina, M. Clochard, E. Dinand, S. Rankin, S. Simic, S. Brocchini, *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, *53*, 1175–1184.
- [9] B. Rihova, K. Kubackova, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2003**, *4*, 311–322.
- [10] J. Kopecek, P. Kopeckova, T. Minko, Z.-R. Lu, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 61–81.
- [11] R. Duncan in *Polymeric Drug Delivery Systems* (Hrsg.: G. S. Kwon), Marcel Dekker, New York, **2005**, S. 1–92.
- [12] M. Yokoyama, *Supramol. Des. Biol. Appl.* **2002**, 245–267.
- [13] R. Haag, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 280–284; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 278–282.
- [14] J. K. Vasir, M. K. Reddy, V. D. Labhasetwar, *Curr. Nanosci.* **2005**, *1*, 47–64.
- [15] R. Duncan, L. Izzo, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 2215–2237.
- [16] M. Thanou, R. Duncan, *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2003**, *4*, 701–709.
- [17] K. Ulbrich, V. Subr, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 1023–1050.
- [18] L. Brannon-Peppas, J. O. Blanchette, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 1649–1659.
- [19] A. El-Aneel, *J. Controlled Release* **2004**, *94*, 1–14.
- [20] T. Sawa, S. K. Sahoo, H. Maeda, *PBM Ser.* **2003**, *1*, 233–261.
- [21] Y. Luo, G. D. Prestwich, *Curr. Cancer Drug Targets* **2002**, *2*, 209–226.
- [22] P. S. Huang, A. Oliff, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2001**, *11*, 104–110.
- [23] G. M. Dubowchik, M. A. Walker, *Pharmacol. Ther.* **1999**, *83*, 67–123.
- [24] F. Kratz, A. Warnecke, P. C. A. Rodrigues, K. Riebeseel in *Polymeric Biomaterials*, 2. Aufl. (Hrsg.: S. Dumitriu), Marcel Dekker, New York, **2001**, S. 851–894.

- [25] F. Kratz, U. Beyer, M. T. Schütte, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1999**, *16*, 245–288.
- [26] A. V. Kabanov, T. Okano, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2003**, *519*, 1–27.
- [27] K. E. Uhrich, S. M. Cannizzaro, R. S. Langer, K. M. Shakesheff, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 3181–3198.
- [28] A. Gresser, *Dtsch. Med. Wochenschr.* **1963**, *88*, 2217.
- [29] Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387–6392.
- [30] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, *J. Controlled Release* **2000**, *65*, 271–284.
- [31] R. K. Jain, *Cancer Res.* **1987**, *47*, 3039–3051.
- [32] R. K. Jain, *Cancer Metastasis Rev.* **1987**, *6*, 559–593.
- [33] H. Maeda, Y. Matsumura, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1989**, *6*, 193–210.
- [34] P. Caliceti, F. M. Veronese, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 1261–1277.
- [35] K. Greish, J. Fang, T. Inutsuka, A. Nagamitsu, H. Maeda, *Clin. Pharmacokinet.* **2003**, *42*, 1089–1105.
- [36] H. Maeda, T. Sawa, T. Konno, *J. Controlled Release* **2001**, *74*, 47–61.
- [37] R. Satchi-Fainaro, *J. Drug Targeting* **2002**, *10*, 529–533.
- [38] R. Langer, *Nature* **1998**, *392*, 5–10.
- [39] S. Mukherjee, R. N. Ghosh, F. R. Maxfield, *Physiol. Rev.* **1997**, *77*, 759–803.
- [40] R. J. Amir, N. Pessah, M. Shamis, D. Shabat, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4632–4637; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4494–4499.
- [41] K. Haba, M. Popkov, M. Shamis, R. A. Lerner, C. F. Barbas III, D. Shabat, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 726–730; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 716–720.
- [42] M. Shamis, H. N. Lode, D. Shabat, *Chem. Commun.* **2004**, *21*.
- [43] I. F. Tannock, D. Rotin, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4373–4384.
- [44] R. B. Greenwald, C. D. Conover, Y. H. Choe, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2000**, *17*, 101–161.
- [45] J. M. Harris, R. B. Chess, *Nature Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 214–221.
- [46] S. C. Pedder, *Semin. Liver Dis.* **2003**, *23*, 19–22.
- [47] T. K. Choueiri, T. E. Hutson, R. M. Bukowski, *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2003**, *3*, 823–829.
- [48] G. Molineux, *Anticancer Drugs* **2003**, *14*, 259–264.
- [49] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908–2935; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754–2794.
- [50] S.-K. Choi, *Synthetic Multivalent Molecules*, Wiley-Interscience, Hoboken, **2004**.
- [51] J. Crawford, *Semin. Oncol.* **2003**, *30*, 24–30.
- [52] W. Vogel, *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2003**, *1*, 423–431.
- [53] V. Goffin, P. Touraine, *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2004**, *5*, 463–468.
- [54] R. Fernandez-Botran, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2000**, *9*, 497–514.
- [55] E. H. Choy, B. Hazleman, M. Smith, K. Moss, L. Lisi, D. G. Scott, J. Patel, M. Sopwith, D. A. Isenberg, *Rheumatology* **2002**, *41*, 1133–1137.
- [56] P. A. Vasey, S. B. Kaye, R. Morrison, C. Twelves, P. Wilson, R. Duncan, A. H. Thomson, L. S. Murray, T. E. Hilditch, T. Murray, S. Burtles, D. Fraier, E. Frigerio, J. Cassidy, *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 83–94.
- [57] P. M. Loadman, M. C. Bibby, J. A. Double, W. M. Al-Shakhaa, R. Duncan, *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 3682–3688.
- [58] V. Bilim, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2003**, *5*, 326–330.
- [59] L. W. Seymour, D. R. Ferry, D. Anderson, S. Hesslewood, P. J. Julyan, R. Poyner, J. Doran, A. M. Young, S. Burtles, D. J. Kerr, *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 1668–1676.
- [60] J. M. Meerum Terwogt, W. W. ten Bokkel Huinink, J. H. Schellens, M. Schot, I. A. Mandjes, M. G. Zurlo, M. Rocchetti, H. Rosing, F. J. Koopman, J. H. Beijnen, *Anticancer Drugs* **2001**, *12*, 315–323.
- [61] N. E. Schoemaker, C. van Kesteren, H. Rosing, S. Jansen, M. Swart, J. Lieverst, D. Fraier, M. Breda, C. Pellizzoni, R. Spinelli, M. Grazia Porro, J. H. Beijnen, J. H. Schellens, W. W. ten Bokkel Huinink, *Br. J. Cancer* **2002**, *87*, 608–614.
- [62] E. Gianasi, M. Wasil, E. G. Evagorou, A. Keddlle, G. Wilson, R. Duncan, *Eur. J. Cancer* **1999**, *35*, 994–1002.
- [63] E. Gianasi, R. G. Buckley, J. Latigo, M. Wasil, R. Duncan, *J. Drug Targeting* **2002**, *10*, 549–556.
- [64] J. M. Rademaker-Lakhai, D. van den Bongard, D. Pluim, J. H. Beijnen, J. H. Schellens, *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 3717–3727.
- [65] S. Sengupta, D. Eavarone, I. Capila, G. Zhao, N. Watson, T. Kiziltepe, R. Sasisekharan, *Nature* **2005**, *436*, 568–572.
- [66] R. B. Greenwald, A. Pendri, C. D. Conover, C. Lee, Y. H. Choe, C. Gilbert, A. Martinez, Y. Xia, D. Wu, M. Hsue, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 551–562.
- [67] D. Fraier, E. Frigerio, G. Brianceschi, M. Casati, A. Benecchi, C. James, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *19*, 505–514.
- [68] J. W. Singer, R. Bhatt, J. Tulinsky, K. R. Buhler, E. Heasley, P. Klein, P. de Vries, *J. Controlled Release* **2001**, *74*, 243–247.
- [69] E. K. Rowinsky, J. Rizzo, L. Ochoa, C. H. Takimoto, B. Forouzeh, G. Schwartz, L. A. Hammond, A. Patnaik, J. Kwiatek, A. Goetz, L. Denis, J. McGuire, A. W. Tolcher, *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 148–157.
- [70] Weitere Informationen unter <http://www.cticseattle.com>.
- [71] P. Sabbatini, C. Aghajanian, D. Dizon, S. Anderson, J. Dupont, J. V. Brown, W. A. Peters, A. Jacobs, A. Mehdi, S. Rivkin, A. J. Eisenfeld, D. Spriggs, *J. Clin. Oncol.* **2004**, *22*, 4523–4531.
- [72] J. W. Singer, B. Baker, P. De Vries, A. Kumar, S. Shaffer, E. Vawter, M. Bolton, P. Garzone, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2003**, *519*, 81–99.
- [73] E. Auzenne, N. J. Donato, C. Li, E. Leroux, R. E. Price, D. Farquhar, J. Klostergaard, *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 573–581.
- [74] S. Sayid, J. Dupont, M. McNamara, J. H. Doroshow, P. S. D. Spriggs, E. Eastham, S. Stromatt, C. H. Takimoto, *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 16.
- [75] A. Wunder, G. Stehle, H. Sinn, H. H. Schrenk, D. Hoff-Biederbeck, F. Bader, E. A. Friedrich, P. Peschke, W. Maier-Borst, D. L. Heene, *Int. J. Oncol.* **1997**, *11*, 497–507.
- [76] A. M. Burger, G. Hartung, G. Stehle, H. Sinn, H. H. Fiebig, *Int. J. Cancer* **2001**, *92*, 718–724.
- [77] G. Hartung, G. Stehle, H. Sinn, A. Wunder, H. H. Schrenk, H. S. L. Kränzle, H. H. Fiebig, W. Maier-Borst, D. L. Heene, W. Queißer, *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 753–759.
- [78] F. Kratz, R. Mueller-Driver, I. Hofmann, J. Dreves, C. Unger, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1253–1256.
- [79] F. Kratz, A. Warnecke, K. Scheuermann, C. Stockmar, J. Schwab, P. Lazar, P. Drückes, N. Esser, J. Dreves, D. Rognan, C. Bissantz, C. Hinderling, G. Folkers, I. Fichtner, C. Unger, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5523–5533.
- [80] A. M. Mansour, J. Dreves, N. Esser, F. M. Hamada, O. A. Badary, C. Unger, I. Fichtner, F. Kratz, *Cancer Res.* **2003**, *63*, 4062–4066.
- [81] A. Warnecke, F. Kratz, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 377–387.
- [82] B. Rihova, T. Etrych, M. Pechar, M. Jelinkova, M. Stastny, O. Hovorka, M. Kovar, K. Ulbrich, *J. Controlled Release* **2001**, *74*, 225–232.
- [83] R. Duncan, S. Gac-Breton, R. Keane, R. Musila, Y. N. Sat, R. Satchi, F. Searle, *J. Controlled Release* **2001**, *74*, 135–146.
- [84] R. Satchi, T. A. Connors, R. Duncan, *Br. J. Cancer* **2001**, *85*, 1070–1076.
- [85] R. Satchi-Fainaro, H. Hailu, J. W. Davies, C. Summerford, R. Duncan, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 797–804.
- [86] R. Satchi-Fainaro, M. Puder, J. W. Davies, H. T. Tran, D. A. Sampson, A. K. Greene, G. Corfas, J. Folkman, *Nat. Med.* **2004**, *10*, 255–261.

- [87] R. Satchi-Fainaro, M. Puder, J. W. Davies, H. T. Tran, D. A. Sampson, A. K. Greene, G. Corfas, J. Folkman, *Cancer Cell* **2005**, *7*, 251–261.
- [88] P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, D. Bundle, *Nature* **2000**, *403*, 669–672.
- [89] J. H. Rao, L. Yan, J. Lahiri, G. M. Whitesides, R. M. Weis, H. S. Warren, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 353–359.
- [90] J. H. Rao, J. Lahiri, L. Isaacs, R. M. Weis, G. M. Whitesides, *Science* **1998**, *280*, 708–711.
- [91] J. H. Rao, J. Lahiri, R. M. Weis, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2698–2710.
- [92] A. King, I. Phillips, K. Kaniga, *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *53*, 797–803.
- [93] R. Roy, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 692–702.
- [94] N. Röckendorf, T. Lindhorst, *Top. Curr. Chem.* **2001**, *217*, 98–135.
- [95] R. Roy, *Glycotecnol.* **2003**, *15*, 291–310.
- [96] D. Zanini, R. Roy, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2088–2095.
- [97] M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4179–4190.
- [98] S. K. Choi, M. Mammen, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4103–4111.
- [99] S. K. Choi, M. Mammen, G. M. Whitesides, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 97–104.
- [100] Weitere Informationen unter <http://www.starpharma.com>.
- [101] S. Shaunak, N. J. Gooderham, R. J. Edwards, N. Payvandi, C. M. Javan, N. Baggett, J. MacDermot, J. N. Weber, D. S. Davies, *Br. J. Pharmacol.* **1994**, *113*, 151–158.
- [102] J. Hirsh, T. E. Warkentin, S. G. Shaughnessy, S. S. Anand, J. L. Halperin, R. Raschke, C. Granger, E. M. Ohman, J. E. Dalen, *Chest* **2001**, *119*, 64S–94S.
- [103] M. Petitou, P. Ducchaussouy, J.-M. Herbert, G. Duc, M. El Hajji, J.-F. Brannellec, F. Donat, J. Necciari, R. Cariou, J. Bouthier, E. Garrigou, *Semin. Thromb. Hemostasis* **2002**, *28*, 393–402.
- [104] R. Hopfner, *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2002**, *3*, 246–251.
- [105] J. M. Weiler, R. E. Edens, R. J. Linhardt, D. P. Kapelanski, *J. Immunol.* **1992**, *148*, 3210–3215.
- [106] J. L. Winkelhake, *Glycoconjugate J.* **1991**, *8*, 381–386.
- [107] K.-E. Arfors, K. Ley, *J. Lab. Clin. Med.* **1993**, *121*, 201–202.
- [108] R. J. Linhardt, T. Toida in *Carbohydrates in Drug Design* (Hrsg.: Z. J. Wiczak, K. A. Nieforth), Marcel Dekker, New York, **1997**, S. 277–341.
- [109] L. R. Zacharski, D. L. Ornstein, *Thromb. Haemostasis* **1998**, *80*, 10–23.
- [110] H. Engelberg, *Semin. Thromb. Hemostasis* **1991**, *17*, 5–8.
- [111] H. G. Garg, B. T. Thompson, C. A. Hales, *Am. J. Physiol.* **2000**, *279*, L779–L789.
- [112] E. DeClercq in *Carbohydrates and Carbohydrate Polymers* (Hrsg.: M. Yalpani), ATL, Shrewsbury, **1993**, S. 87–100.
- [113] M. Petitou, C. A. A. van Boeckel, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3180–3196; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3118–3133.
- [114] L. C. Hsu, *Perfusion* **2001**, *16*, 417–428.
- [115] G. Franz, D. Pauper, S. Alban, *Proc. Phytochem. Soc. Eur.* **2000**, *44*, 47–58.
- [116] S. Alban, G. Franz, *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 354–361.
- [117] H. Türk, R. Haag, S. Alban, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 162–167.
- [118] S. Shaunak, S. Thomas, E. Gianasi, A. Godwin, E. Jones, I. Teo, K. Mireskandari, P. Luthert, R. Duncan, S. Patterson, P. Khaw, S. Brocchini, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 977–984.
- [119] J. A. Wolff, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 768–769.
- [120] J. Haensler, F. C. Szoka, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 372–379.
- [121] O. Boussif, F. Lezoulach, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Schermann, B. Demeneix, J.-P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7297–7301; J.-P. Behr, *Chimia* **1997**, *51*, 34–36.
- [122] J. F. Kukowska-Latello, A. U. Bielinska, J. Johnson, R. Spindler, D. A. Tomalia, J. R. Bake, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 4897–4902.
- [123] S. Richardson, H. V. Kolbe, R. Duncan, *Int. J. Pharm.* **1999**, *178*, 231–243.
- [124] D. Joester, M. Losson, R. Pugin, W. Heinzelmann, H. P. Merkle, F. Diederich, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1524–1528; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1486–1490.
- [125] N. Murthy, J. Campbell, N. Fausto, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 412–419.
- [126] D. Fischer, *Biomater. Delivery Targeting Proteins Nucleic Acids* **2005**, 295–321.
- [127] N. D. Sonawane, J. F. C. Szoka, A. S. Verkman, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 44826–44831.
- [128] J.-P. Behr, *Chimia* **1997**, *51*, 27–30.
- [129] M. X. Tang, C. T. Redemann, F. C. Szoka, *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 703–714.
- [130] A. U. Bielinska, C. Chen, J. Johnson, J. R. Baker, Jr., *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 843–850.
- [131] K. Luger, A. W. Made, R. K. Richmond, D. F. Sargent, T. J. Richmond, *Nature* **1997**, *389*, 251–260.
- [132] D. A. Tomalia, A. M. Naylor, W. A. Goddard III, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 119–156; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 138–175.
- [133] J. Dennig, E. Duncan, *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90*, 339–347.
- [134] M. Krämer, J.-F. Stumbé, G. Grimm, U. Krüger, B. Kaufmann, M. Weber, R. Haag, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1081–1087.
- [135] C. Brus, H. Petersen, A. Aigner, F. Czubayko, T. Kissel, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 677–684.
- [136] R. M. Schiffelers, A. Ansari, J. Xu, Q. Zhou, Q. Tang, G. Storm, G. Molema, P. Y. Lu, P. V. Scaria, M. C. Woodle, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e149.
- [137] K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *47*, 113–131.
- [138] G. Hoerpel, Dissertation, Universität Mainz, **1983**.
- [139] G. S. Kwon, M. Naito, K. Kataoka, M. Yokoyama, Y. Sakurai, T. Okano, *Colloids Surf. B* **1994**, *2*, 429–434.
- [140] Y. Kakizawa, K. Kataoka, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 203–222.
- [141] L. Deng, M. Mrksich, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5136–5137.
- [142] I. Szeleifer, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **1997**, *2*, 337–344.
- [143] M.-C. Jones, M. Ranger, J.-C. Leroux, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 774–781.
- [144] K. Kataoka, G. S. Kwon, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, *J. Controlled Release* **1993**, *24*, 119–132.
- [145] W.-D. Jang, N. Nishiyama, G.-D. Zhang, A. Harada, D.-L. Jiang, S. Kawachi, Y. Morimoto, M. Kikuchi, H. Koyama, T. Aida, K. Kataoka, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 423–427; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 419–422.
- [146] Y. Bae, S. Fukushima, A. Harada, K. Kataoka, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4788–4791; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4640–4643.
- [147] T. Nakanishi, S. Fukushima, K. Okamoto, M. Suzuki, Y. Matsumura, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoka, *J. Controlled Release* **2001**, *74*, 295–302.
- [148] M. W. P. L. Baars, E. W. Meijer, *Top. Curr. Chem.* **2000**, *210*, 131–182.
- [149] L. W. Seymour, Y. Miyamoto, H. Maeda, M. Brereton, J. Strohmalm, K. Ulbrich, R. Duncan, *Eur. J. Cancer* **1995**, *31*, 766–770.
- [150] R. Haag, A. Sunder, J.-F. Stumbé, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2954–2955.
- [151] T. Ooya, K. P. J. Lee, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1221–1229.
- [152] M. W. P. L. Baars, R. Kleppinger, M. H. J. Koch, S.-L. Yeu, E. W. Meijer, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1341–1344; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1285–1288.

- [153] C. Kojima, K. Kono, K. Maruyama, T. Takagishi, *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 910–917.
- [154] C. Kojima, Y. Haba, T. Fukui, K. Kono, T. Takagishi, *Macromolecules* **2003**, *36*, 2183–2186.
- [155] M. A. Oar, J. M. Serin, W. R. Dichtel, J. M. J. Fréchet, T. Y. Ohulchanskyy, P. N. Prasad, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 2267–2275.
- [156] S. Xu, M. Krämer, R. Haag, *J. Drug Targeting* **2006**, im Druck.
- [157] J. F. G. A. Jansen, E. W. Meijer, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4417–4418.
- [158] G. Pistolis, A. Malliaris, D. Tsiourvas, C. M. Paleos, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1440–1444.
- [159] Z. Sideratou, D. Tsiourvas, C. M. Paleos, *Langmuir* **2000**, *16*, 1766–1769.
- [160] M. Krämer, J.-F. Stumbé, H. Türk, S. Krause, A. Komp, L. Delineau, S. Prokhorova, H. Kautz, R. Haag, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4426–4431; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4252–4256.
- [161] H. Ringsdorf, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1082–1095; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1064–1076.
- [162] Anmerkung bei der Korrektur: Ein kürzlich erschienenes Themenheft ist biomedizinischen Anwendungen von Dendrimern gewidmet (*Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 2101–2286).



WILEY InterScience®
DISCOVER SOMETHING GREAT

Access some of the finest full text journals, reference works, books, and databases from around the globe. It's just what you need to make some important discoveries of your own.

- ▶ ABOUT US
- ▶ VIEW DEMO
- ▶ CONTACT US
- ▶ HELP

Access your saved titles, articles, queries and alerts in My Profile.

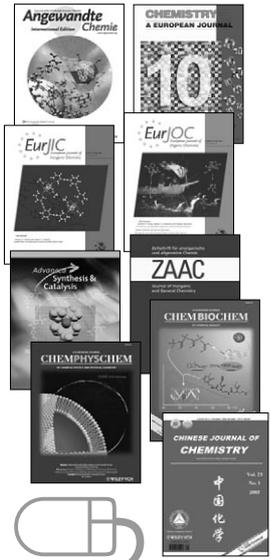
USER NAME: PASSWORD:

Remember Me

[Register Now](#) | [Athens Login](#)
[Forgot My Password](#)

Manage your access easily with “MY PROFILE”

Simply register. Registration is fast and free to all internet users.



Easy Access

- Save Titles, Articles & Queries for quick access
- Set up roaming access to access content outside of your institutions network
- Get free online sample copies
- Get free online trial subscriptions
- View a complete list of your subscriptions and accessible products

Enhanced Tools

- Receive E-Mail Alerts when new content is available
- Purchase Article Select Tokens online
- Purchase individual articles online with Pay-Per-View



WILEY InterScience®
DISCOVER SOMETHING GREAT

www.interscience.wiley.com