

Mit Peptiden dekorierte Dendrimere und ihre biotechnologische Nutzung

Jingjing Wan und Paul F. Alewood*

Dendrimere · Konjugationschemie · Multivalenz ·
Peptide · Wirkstofftransport

Peptid-dekorierte Dendrimere (PDDs) bilden eine Klasse kugelförmiger, regulärer, verzweigter Polymere, die an ihren Oberflächen kovalent durch Peptide modifiziert sind. PDDs sind als Proteinmimetika, neuartige Biomaterialien sowie für ein breites Spektrum biomedizinischer Anwendungen zum Einsatz gekommen. Seit ihrer Konzeption und Entwicklung in den späten 1980er Jahren ist Poly-L-lysin die bevorzugte Kernstruktur für PDDs. Jüngst haben zahlreiche Innovationen in der Polymer- und Ligationschemie das Feld neu belebt. Dies hat dazu geführt, dass heute wohldefinierte Dendrimere mit vielfältigeren Strukturen und Funktionen vorliegen. Dieser Kurzaufsatz beleuchtet die Entwicklung von PDDs als Produkte einer signifikant verbesserten Ligationschemie unter Einbeziehung strukturell wohldefinierter Peptide sowie erste Anwendungen von PDDs in den Bereichen Bildgebung und Wirkstoffentwicklung.

1. Einleitung

Dendrimere sind als polymere Makromoleküle mit einem geschichteten Aufbau definiert, der eine Plattform zur chemischen Oberflächenmodifikation bietet.^[1] Eine typische dendritische Struktur besteht aus drei Komponenten: dem Kern, den kovalent mit diesem verknüpften Verzweigungen und den funktionellen Gruppen an der Oberfläche, die maßgeblich die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Dendrimers bestimmen. Als Folge der stark verzweigten Molekülarchitektur und der Vielzahl an verfügbaren Oberflächenfunktionalitäten haben Systeme auf Dendrimerbasis vielfältige Anwendungen gefunden, z. B. in der Katalyse,^[2] Biomedizin^[3] und Materialwissenschaft.^[4] Zum Aufbau dendritischer Strukturen sind verschiedenste Bausteine verwendet worden, etwa Amidoamine für Polyamidoamin-(PAMAM)-Dendrimere,^[5] Propylenimin für Polypropylenimin(PPI)-Dendrimere,^[6] L-Lysin für Poly-L-lysin(PLL)-Dendrimere^[7] und Polyglycerin für Polyglycerin(PG)-Dendrimere (Abbildung 1).^[8] Vielfältige Ligandentypen, darunter Antikörperfragmente^[9] und Kohlenhydratanaloga,^[10] sind als

funktionelle Oberflächengruppen mit Dendrimergerüsten konjugiert worden. In diesem Kurzaufsatz konzentrieren wir uns auf mit Peptiden dekorierte Dendrimere (PDDs), die aus einem Polymerkern (wie den in Ab-

bildung 1 abgebildeten) bestehen, der mehrere kovalent an die Oberfläche gebundene Kopien von funktionellen Peptiden trägt. Die Vorzüge der PDDs beruhen auf der Möglichkeit einer genauen Kontrolle über ihre Molekülgröße und die Zahl der angeknüpften Peptide – eine unmittelbare Folge präzisen chemischen Designs.^[11]

PDDs werden am häufigsten für das Design von Biomaterialien, den Wirkstoff-/Gentransport und Impfstoffformulierungen eingesetzt.^[12] Durch Kombination der Eigenschaften von Dendrimeren mit denen bioaktiver Peptide können PDDs bedeutende synergistische Effekte erzielen, z. B.:^[13]

- 1) eine polyvalente Struktur, die die biologische Aktivität der angeknüpften Peptide verstärkt;
- 2) die Amplifikation der Peptidwirkung durch simultane Wechselwirkungen mit mehreren Rezeptoren;
- 3) eine proteinartige Struktur, die die Wirkungsweise einer Reihe biologischer Moleküle nachahmt;
- 4) Biokompatibilität und biologische Abbaubarkeit;
- 5) Widerstandsfähigkeit gegen Proteolyse und verzögerte Ausscheidung über die Nieren, was die typischerweise kurze Wirkdauer von Peptidtherapeutika verbessern könnte.

In diesem Kurzaufsatz beschreiben wir eine Auswahl chemischer Syntheserouten, die sich verschiedene Formen der chemischen Konjugation zunutze machen (Abschnitt 2),

[*] Dr. J. Wan, Prof. Dr. P. F. Alewood
Institute of Molecular Bioscience
The University of Queensland
306 Carmody Road, St Lucia QLD 4072 (Australien)
E-Mail: p.alewood@imb.uq.edu.au

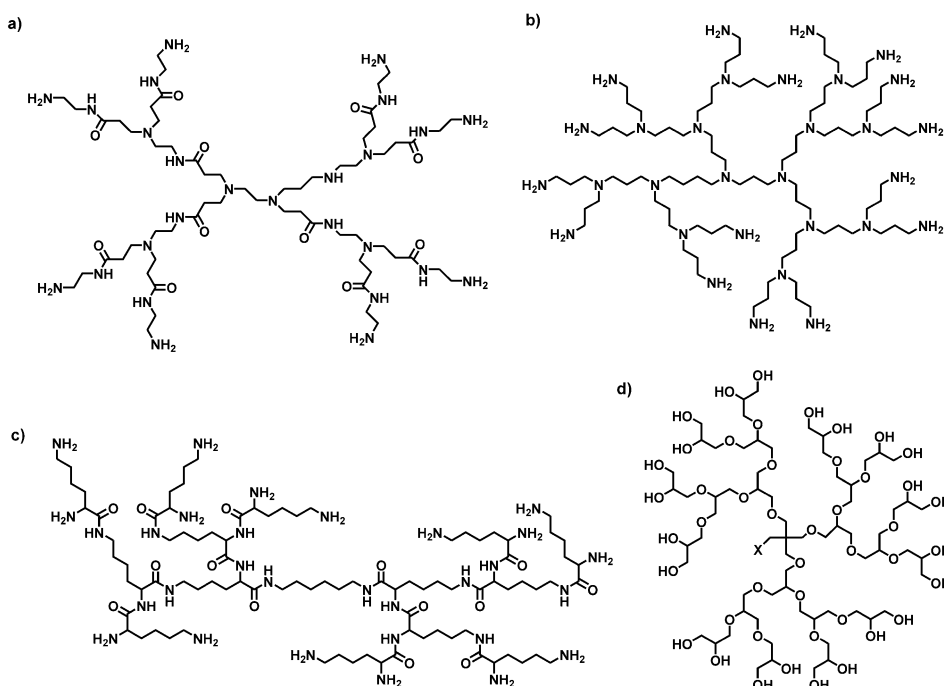


Abbildung 1. a) Ein PAMAM-Dendrimer mit Amidoamin als Baustein, b) ein PPI-Dendrimer mit Propylenimin als Baustein, c) ein PLL-Dendrimer mit der Aminosäure L-Lysin als Baustein, d) ein PG-Dendrimer mit Polyglycerin als Baustein.

und beschreiben anschließend einige aufkommende biologisch-medizinische Anwendungen für PDDs (Abschnitt 3).

2. PDD-Synthesen

2.1. Divergente konjugative Chemie

In den vergangenen drei Jahrzehnten sind Syntheserouten zu PDDs ausgiebig untersucht worden. Die PDD-Synthese kann entweder schrittweise (divergent) oder durch Ligation vorab gereinigter Peptidsegmente (konvergent) an den Dendrimerkern erfolgen. Über die divergente Route erhaltene Peptiddendrimere nutzen gemeinhin Polyamino­säuren (wie Poly-L-lysin) als Verzweigungen. Die an die Oberfläche angeknüpften Peptidsequenzen werden schrittweise auf dem Dendrimerkern aufgebaut, und zwar entweder durch Festphasenpeptidsynthese (SPPS) oder in Lösung. In der Pio-

nierarbeit von Tam aus dem Jahr 1988 wird ein Gerüst aus multiplen Antigen-Peptiden (MAP) auf der Grundlage von SPPS und PLL als neuartiger Ansatz zur Herstellung von Peptidimmunogenen beschrieben.^[14] Beim ursprünglichen Ansatz bestand das MAP-Gerüst aus einem Kern aus Lagen von Lysylresten mit einer Oberflächenschicht von Peptidketten, die mit dem Kern verknüpft waren. Die Effizienz dieses Ansatzes resultierte aus einem festphasenchemischen Konzept mit *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)-Kupplung (Abbildung 2). Dieser „divergente“ Ansatz ist zwar einfach, erzielt aber bei Dendrimeren mit hoher Peptidbeladung nur schwer eine quantitative Kupplung.^[15] Konvergente Routen können dagegen kleinere Probleme bei der Kupplung umgehen, indem das Kerndendron und die Peptidsegmente vor der Konjugation aufgereinigt werden. So führt die konvergente Route zur Bildung homogenerer Endprodukte und bietet damit eine vielversprechende Alternative für das Design von PDDs.



Jingjing Wan erhielt 2007 den B.S. und 2010 den Master in Chemie von der Fudan University (China). 2011 wechselte sie als Doktorandin in die Forschungsgruppe von Paul Alewood am Institute for Molecular Bioscience der University of Queensland. Ihre derzeitigen Forschungsinteressen gelten der Synthese von kovalenten Peptiddendrimeren sowie ihrer strukturellen Charakterisierung und Anwendung als Wirkstoffkandidaten.



Paul Alewood (B.Sc. (Hons) UNSW, Ph.D. Calgary) ist Gruppenleiter am Institute for Molecular Bioscience der University of Queensland (Australien) und NHMRC Research Fellow. Seine Interessen liegen auf den Gebieten der pharmazeutischen und der biologischen Chemie, der Chemie und Biologie von Peptiden sowie dem Design und der Entwicklung von Wirkstoffen.

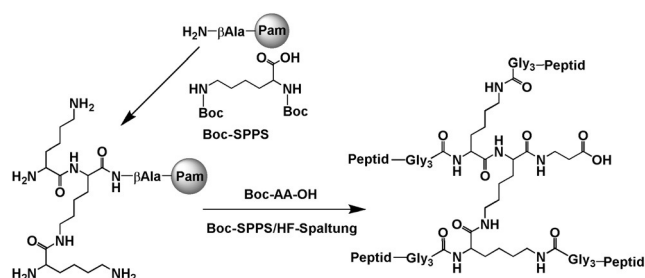


Abbildung 2. Stufen der Synthese eines tetrameren MAP durch die schrittweise Boc-Festphasenmethode. A: Aminosäure; Gly₃: Abstandhaltersegment, das eingebaut wird, um die Zugänglichkeit des Peptids zum Kern zu verbessern; Boc: *tert*-Butoxycarbonyl, Pam = Oxymethyl-phenylacetamidomethyl.^[14]

2.2. Konvergente konjugative Chemie

Die Konjugation von Peptiden und Dendrimern ist ausgiebig untersucht worden,^[12b,16] da sie verspricht, vollständig dekorierte Gerüste zu liefern, was möglicherweise die biologische Wirksamkeit der Produkte maximiert und zugleich deren Homogenität sowie die Reproduzierbarkeit der Reaktion sicherstellt.^[17] Es konnten zwar bereits komplexe Dendrimere hergestellt werden (z. B. bei der Entwicklung von Zucker-Arrays),^[18] allerdings hat sich die Dekoration mit Peptiden als schwieriger erwiesen; dies gilt besonders für wohlstrukturierte (wie cyclische oder disulfidreiche) Peptide.^[19] Um die endständigen Gruppen eines Dendrimers mit biologisch relevanten Peptiden zu dekorieren, ist es entscheidend, eine effiziente Konjugationsreaktion zu nutzen, damit eine erschöpfende Anknüpfung von Liganden unter Bildung eines wohldefinierten Produktes sichergestellt ist. Will man dieses Ziel erreichen, besteht eine Hauptanforderung an die Ligation ungeschützter Peptide in der Regio- und Chemo Selektivität der Reaktion, sodass auch in Gegenwart anderer funktioneller Gruppen in den Peptidseitenketten nur die gewünschten Stellen miteinander reagieren. Für die Synthese von PDDs mit linearen oder cyclischen Peptiden sind mehrere unterschiedliche Ligationsmethoden zum Einsatz gekommen. Im Fall linearer Peptide zählt zu den Ligationsmethoden die Bildung von Hydrazonen,^[20] Oximen,^[21] Thiazolidinen,^[22] Thioethern^[23] und Triazolen^[16] sowie von Amidbindungen durch native chemische Ligation (NCL).^[24] Dendrimere mit cyclischen Peptiden sind weniger häufig, finden aber immer größeres Interesse.

2.2.1. Dendrimere mit linearen Peptiden

Für die multivalente Präsentation von Peptiden stehen zahlreiche chemische Konjugationsmethoden zur Verfügung. 1995 stellten Tam und Shao eine chemische Ligationsstrategie vor, bei der eine schwache Base mit einer Aldehydgruppe reagiert, wodurch tetravalente Dendrimere mit dem linearen Peptidepitop V20 entstehen.^[20] Schwache Basen wie Thiole, Hydrazide und Aminoxygruppen werden an den N-Terminus des ausgewählten Peptids angefügt und anschließend unter sauren Bedingungen mit einem tetrameren Aldehyd-PLL-Dendron verknüpft; die Selektivität resultiert daraus,

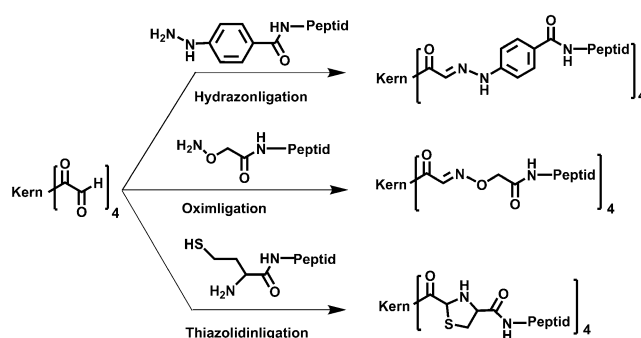


Abbildung 3. Synthese tetramerer Peptiddendrimerer unter Bildung von Hydrazon-, Oxim- und Thiazolidinbindungen. Der Kern besteht aus einem tetravalenten PLL-Dendrimer, das angeknüpfte lineare Peptid ist V20 mit 20 Aminosäureresten.^[20]

dass basische Seitenketten während der Konjugation protoniert sind (Abbildung 3). Eine ähnliche Strategie kam beim Entwurf eines 4-mer-MAP durch Patarroyo et al. zum Einsatz. Die Forscher konnten zeigen, dass die Thiazolidinbildung rascher und mit größerer Ausbeute vonstattengeht als die Oxim- oder Hydrazonbildung.^[21] Obgleich die ligierten MAP-Dendrimere mehrere Deletionen enthalten, ließen sich reine Tetramere durch Aufreinigung mittels Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC) gewinnen. Um Dendrimere höherer Generationen herzustellen, optimierten Lambert und Mitarbeiter die Oximbildungsreaktion durch den Einsatz von Keto-Dendrimern und Aminoxyeptiden als Reaktionspartner.^[22] PAMAM-Keto-Dendrimere mit acht Zweigen wurden mit einem linearen, aus 20 Resten bestehenden Peptid ligiert; dabei bildete sich ein Dendrimerengemisch aus Molekülen mit 4–8 Kopien der linearen Peptide. Dies wurde durch Gelpermeations-HPLC und Gelelektrophorese nachgewiesen. Weitergehende Versuche, den Grad der Peptidbeladung noch zu steigern, blieben erfolglos.

Die Thioetherligation verläuft über eine typischerweise irreversible Reaktion und nutzt die Konjugation zweier aufgereinigter chemoselektiver Komponenten: Ein halogenacetylierter (typischerweise mit Chlorsubstituent) Dendronkern reagiert mit einem synthetischen Peptid, das am Carboxy- oder Aminoterminus einen Cysteinrest trägt (Abbildung 4a). So wurde z.B. das aus 20 Resten bestehende, lineare Peptid R-HL4 mit einem Cysteinrest am C-Terminus durch Thioetherligation in das chloracetylierte (ClAc) PAMAM-Den-

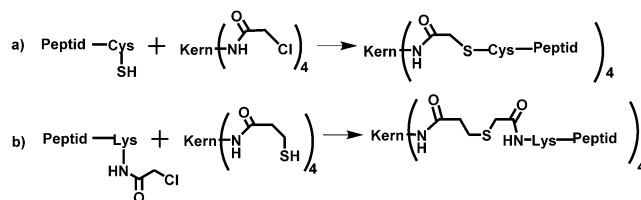


Abbildung 4. Thioether-basierte Routen zu tetrameren Peptiden. Bei Route (a) reagieren Peptide mit einem Cys-Rest am C-Terminus mit einem ClAc-funktionalisierten PAMAM-Dendronkern. Route (b) verläuft über den umgekehrten Weg: ClAc-Peptide werden mit einem Thiol-funktionalisierten PAMAM-Dendron verknüpft.^[25]

dimer eingeführt. Dies ergab homogene 4-mer- und 8-mer-Peptiddendrimere. Versuche, homogene 16-mer- und 32-mer-Peptiddendrimere herzustellen, schlugen hingegen fehl.^[23] Dennoch sticht diese Ligationsmethode durch ihre Einfachheit, die guten Ausbeuten und die metabolische Stabilität ihrer Produkte hervor. Ein Problem bei der Thioetherligation ist, dass als Konkurrenzreaktion zur Thioetherbildung eine Dimerisierung des Peptids durch Cystinbildung eintreten kann. Um dem Rechnung zu tragen, wurde eine verbesserte Version der Strategie vorgeschlagen (Abbildung 4b), bei der das durch Chloracetylierung derivatisierte Peptid in Gegenwart eines Überschusses des Reduktionsmittels Tris(2-Carboxyethyl)phosphin (TCEP) mit einem Thiol-funktionalisierten PLL-Dendronkern konjugiert wird. Die Gruppe von de La Torre berichtete von einer Ligation mit diesem Ansatz in wässriger Lösung unter Bildung homogener di- und tetra-valenter Thioether-Peptiddendrimere.^[25]

Die native chemische Ligation (NCL) wurde von Kent, Dawson und Mitarbeitern als chemoselektive Methode zur Ligation zweier ungeschützter Peptidfragmente unter Bildung einer nativen Peptidbindung entwickelt.^[26] Diese Reaktion erfolgt zwischen einem Peptid mit einer C-terminalen Thioesterfunktion und einem Peptid mit einem N-terminalen Cysteinrest im neutralen pH-Bereich in wässriger Lösung; sie profitiert dabei von der viel höheren Löslichkeit und Reinheit ungeschützter Peptide. Viele Anwendungen der NCL zielen auf die chemische Synthese kleiner Proteine^[27] sowie die Immobilisierung von Peptiden und Proteinen auf Nanopartikeln.^[28] Die NCL wurde von Meijer und Mitarbeitern auf Dendrimere angewendet,^[24] wobei homogene 4-mer- und 8-mer-PAMAM-Dendrimere, die das lineare Peptid LYRAG trugen, erhalten wurden. Versuche, ein homogenes 16-mer-Dendrimer herzustellen, schlugen fehl; die MALDI-MS-Analyse zeigte, dass auf der Dendrimeroberfläche ein Gemisch von 12–16 Peptiden zu finden war. Dieselbe Gruppe entwarf außerdem asymmetrische Dendrimere mit einem arithmetischen Verzweigungsmuster, bei dem Cystein-Dendritenkeile mit einer einzelnen ansteuerbaren Gruppe (dem „Fokuspunkt“) sowie zwei, drei, vier oder fünf Zweige synthetisiert wurden (Abbildung 5). Derartige Moleküle können, zusätzlich zu zwei bis fünf Kopien des linearen Thioesterpeptids auf der Dendrimeroberfläche, am „Fokuspunkt“ verschiedene, zur Bildgebung geeignete Einheiten (wie Biotin oder Chromophore) tragen (Abbildung 5).^[29]

Die NCL und die Thioetherligation sind zwar sehr wirkungsvolle Hilfsmittel für die Peptidligation, sind aber stark durch die Tatsache eingeschränkt, dass Thiol als funktionelle Gruppe verwendet wird. Wegen der Bedeutung der Cysteinreste in Peptiden kann die Einführung einer freien Thiol-

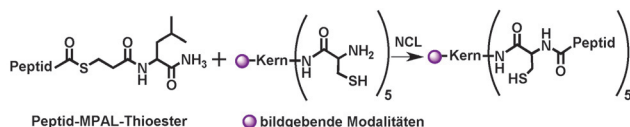


Abbildung 5. Synthese eines asymmetrischen Polyamiddendrons, das ein lineares Peptid und eine bildgebende Modalität trägt, die durch NCL angefügt wurden.^[29] Die bildgebende Modalität kann Biotin oder ein Chromophor sein.

gruppe unvorhersehbare Änderungen der Peptidkonformation bewirken, z. B. eine Umordnung von Disulfidbindungen oder die Bildung unerwünschter Nebenprodukte durch nichtselektive Thiolligation. Deshalb wurden alternative synthetische Plattformen mit höherer Chemoselektivität entwickelt.

Die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC)^[30] ist die am breitesten eingesetzte Form der Klickchemie^[31] und hat demgemäß rasch Anwendungen in der Biokonjugation gefunden.^[12b,13a] Die CuAAC-Reaktion weist viele Eigenschaften auf, die sie von alternativen Kupplungsstrategien unterscheidet; dazu gehören hohe Ausbeuten, die Toleranz der Reaktionsbedingungen (z. B. hinsichtlich des pH-Wertes und des Lösungsmittels), die Bildung eines einzelnen Produktes, hohe Reaktionsgeschwindigkeit und – am wichtigsten – ihre hohe Chemoselektivität.^[32] Unter typischen Konjugationsbedingungen verhalten sich die Azid- und Alkingruppen, die bei der CuAAC miteinander reagieren, gegenüber anderen funktionellen Gruppen inert. Sie sind daher für die Immobilisierung von Molekülen mit mehreren funktionellen Gruppen, wie es Peptide sind, sehr gut geeignet. Die CuAAC-Reaktion ist daher ein ideales chemisches Hilfsmittel für die quantitative chemoselektive Ligation ungeschützter Peptide an Dendrone.

Liskamp et al.^[16] legten eine effiziente, Mikrowellen-gestützte CuAAC-Synthese multivalenter dendrimerer Peptide vor. Eine Reihe von Azidopeptiden unterschiedlicher Länge wurde mit Alkindendrimern zunehmender Generation (G) in Gegenwart von CuSO₄/Na-Ascorbat/Cu-Draht und in einer Vielzahl von Lösungsmitteln unter Mikrowellenbestrahlung zur Reaktion gebracht. Die Konjugation von linearen Tetrapeptiden mit dem G₁-Dendrimer mit vier Zweigen wurde ohne Mühe erreicht. Die Kupplung mit Dendrimern höherer Generation misslang jedoch. In jüngerer Zeit entwarfen Toth et al.^[12b] ein System zum Impfstofftransport aus einem Polyacrylatkern, der mit dem linearen B-Zellepitop J14 dekoriert ist. Ausgangsmaterialien waren ein Polyacrylat-Alkin-Dendrimer mit acht Zweigen und das N-terminale Azidopeptid J14. Die Reaktion wurde in Gegenwart eines Kupferdrahtes bei 50 °C durchgeführt. Die Elementaranalyse ließ auf die Konjugation von fünf Peptidepitopen mit dem dendritischen Kern schließen. Im Unterschied dazu berichteten Galdiero et al. über die Funktionalisierung eines Azidopolyamid-basierten 18-mer-Dendrimers mit dem linearen, aus 20 Resten bestehenden, Alkin-modifizierten Peptid gH625 in Gegenwart von CuSO₄ und Natriumascorbat.^[33] Die Autoren gaben an, dass eine vollständige Funktionalisierung des Dendrimers mit Peptiden erreicht wurde, da im IR-Spektrum des Peptiddendrimers die Bande der Azid-Streckschwingung verschwand. Weitergehende Belege wie ein NMR-Spektrum oder eine Charakterisierung per MS fehlten jedoch in der vorgelegten Studie.

Die spannungsgetriebene Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC; Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition) ist eine vielversprechende Alternative zur CuAAC, besonders bei der Synthese von Materialien für biomedizinische Anwendungen.^[34] Ein möglicher Nachteil der klassischen CuAAC-Reaktion ist die Cytotoxizität des verwendeten Cu^I-Katalysators.^[35] Bei der SPAAC-Reaktion kommen intramo-

lekular gespannte Cyclooctine zum Einsatz, die ohne Metallkatalysator bereitwillig und in hoher Ausbeute mit Aziden reagieren. Die SPAAC ist für die Bildgebung von Biomolekülen in lebenden Systemen^[36] sowie zur Funktionalisierung von PAMAM-Dendrimern mit Ethylenglykolketten eingesetzt worden.^[37] Anseth und Mitarbeiter wendeten diese Reaktion auf die Ligation eines Azid-PEG-Dendrimergerüsts (PEG = Polyethylenglycol) mit einem 16-mer-Peptid an, das zwei difluorierte Cyclooctinendgruppen trug (Abbildung 6). Das vollständig beladene Gerüst bildete innerhalb 1 h ein Hydrogel.^[38]

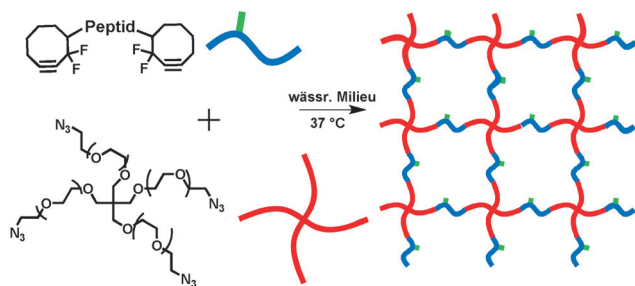


Abbildung 6. Die SPAAC-Reaktion von Tetraazid-Polyethylenglycol mit einem linearen Peptid, das an den Enden durch zwei difluorierte Cyclooctinendgruppen modifiziert ist, zu einem dreidimensional vernetzten, idealen Hydrogel. Adaptiert aus Lit. [38], Copyright (2009), mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd [Nat. Mater.].

2.2.2. Dendrimere mit cyclischen Peptiden

Im Unterschied zu linearen Peptiden haben cyclische Peptide eine wohldefinierte Ligandenstruktur. Berichten zufolge sollen sie die Dendrimerkonjugation sterisch deutlich behindern.^[19a] Zwei Hauptkategorien cyclischer Peptide sind untersucht worden: N- zu C-terminal aufgebaute cyclische Peptide sowie Peptide mit Disulfidbrücken.

Cyclische Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Sequenzen (cRGDs) sind an der Zelladhäsion über $\alpha_v\beta_3$ -Integrinrezeptoren beteiligt und haben Anwendungen in den Bereichen Wirkstofftransport,^[39] Gentransport,^[40] Bildgebung^[41] und Krebstherapie^[42] gefunden. cRGD-Peptide sind eingesetzt worden, um mehrästige synthetische Gerüste zu dekorieren, um so die Zelladhäsion und die Tumoraufnahme zu verbessern.^[43] Die Amidbindungskonjugation ist die am häufigsten eingesetzte Form der Verknüpfung von cyclischem RGD mit verschiedenartigen Dendrimerplattformen.^[44] Kessler und Mitarbeiter^[44c] beschrieben eine Fmoc-SPPS-Methode (Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl) für die Synthese multimerer cyclischer RGD-Peptide mit zwei und vier cRGD-Peptiden auf einem PLL-Dendron. Nachfolgend wurde für Targeting-Zwecke eine radioaktiv markierte Vorstufe per Oximilation in Lösung am Fokalfunkt des Dendrons angebracht.

Fréchet und Mitarbeiter setzten ein Pentaerythritoldendrimer mit höherer Peptidbeladung ein.^[41] Sie funktionalisierten acht Dendritenzweige mit einer heterogenen difunktionellen PEG-Kette, um eine ausreichende Flexibilität für

eine multiple Ligandenbindung bereitzustellen. Die PEG-Ketten wurden an Glutarsäureanhydrid gekuppelt und anschließend in aktive Imidazolide umgewandelt. Kupplung dieser Imidazolide an cyclische RGD-Peptide mittels einer Lysin-Aminogruppe führte zu einer durchschnittlichen Anbindung von fünf cRGD-Einheiten pro Dendrimer. Ein Grund für die Schwierigkeiten beim Erreichen homogener Multimere ist die wenig effiziente Säure-Amid-Konjugation. Um das Problem der unvollständigen Konjugation zu überwinden, untersuchten Wängler et al. drei verschiedene Klickreaktionen, namentlich CuAAC, Oxim- und Thiol-Maleimid-Ligation von PAMAM-Dendrimern mit cRGD-Peptiden, und ermittelten die Grenzen der cRGD-Multimerisierung.^[45] Durch eine Michael-Addition von Thiolen an Maleimide konnten an PAMAM-Dendrimern homogene cRGD-Multimere mit ein, zwei, vier, acht und sechzehn Einheiten erhalten werden.

Peptide mit wohldefinierten Tertiärstrukturen enthalten gewöhnlich Disulfidbrücken.^[46] 2003 fügten Andreu et al. durch Peptidbindungsbildung in Lösung ein cyclisches Epitop mit einer Disulfidbrücke am lipidierten PLL-Kern an. Dies ergab ein Gemisch von Molekülen mit maximal drei Kopien des cyclischen Disulfidepitops.^[47] Um die Zweige des tetrameren Dendrons vollständig mit cyclischen Disulfidpeptiden zu beladen, synthetisierten van Leeuwen et al.^[48] ein auf Glutaminsäure basierendes Dendron mit zusätzlichem β -Alanin als Abstandhalter, um die Zugänglichkeit für die chemische Ligation und die Möglichkeit mehrfacher Rezeptorbindung zu verbessern. Das cyclische, eine Disulfidbrücke enthaltende Peptid Ac-TZ14011 wurde durch Peptidbindungsbildung, die ein homogenes, tetrameres, cyclisches Peptiddendrimer generierte, vollständig auf das Gerüst geladen.

Die Klickchemie ist ein vielversprechender Ansatz für die Konjugation Cystein-haltiger cyclischer Peptide mit einem funktionalisierten Dendron. 2009 synthetisierten Liskamp und Mitarbeiter eine Reihe von Peptiddendrimern, die das Tyr³-Octreotidpeptid trugen, durch eine CuAAC der Peptidylazide mit dendrimern Alkinen in Gegenwart von CuOAc als Katalysator.^[49] Diese Strategie führte zu monomeren, dimeren und tetrameren Peptiddendrimern, wie durch LC-ESI-MS bestätigt werden konnte.

Ähnlich wie bei der Peptidkonjugation können CuSO₄ und Natriumascorbat auch für die CuAAC von Peptiden, die eine Azidodisulfidbindung enthalten, mit Alkindendrimern eingesetzt werden. Diese Methode wurde von unserer Gruppe zur Herstellung des modifizierten α -Conotoxins ImI (α -ImI; ein Antagonist nikotinischer $\alpha 7$ -Rezeptoren) genutzt, das zwei Disulfidbrücken mit PEG-Abstandhaltern an den N-terminal und Alkin-modifizierten PLL-Dendrimern enthält. Die Reaktion wurde in Gegenwart von CuSO₄, Natriumascorbat (niedrige Konzentration) und dem Liganden TBTA (Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin) durchgeführt (Abbildung 7).^[50] Eine LC-ESI-MS-Analyse bestätigte die Bildung homogener di- und tetravalenter Dendrimere mit eingebautem α -ImI-Peptid.

Mit signifikanter Optimierung kann auch die Thiol-Maleimid-Chemie für den Aufbau Cystein-haltiger cyclischer Peptiddendrimere herangezogen werden (Abbildung 8).

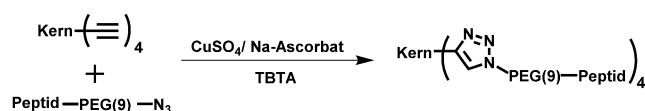


Abbildung 7. CuAAC-Synthese eines tetrameren Dendrimers, das ein oxidativ gefaltetes Peptid trägt.^[50] Der Kern ist ein tetravalentes PLL-Dendrimer, das angeknüpfte cyclische Peptid ist α -lml mit zwei Disulfidbindungen.

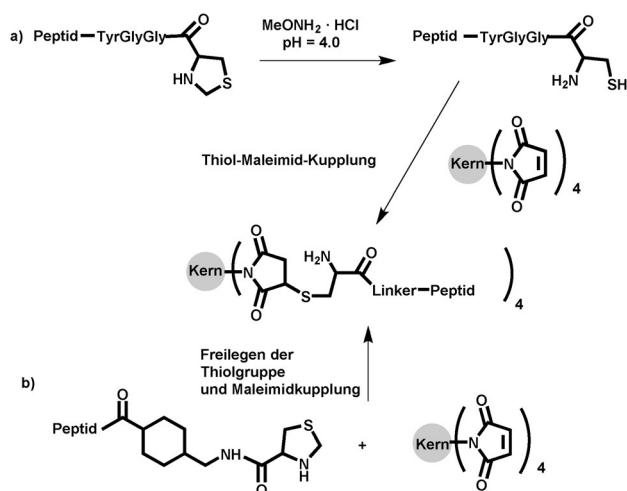


Abbildung 8. Synthese multipler antigener Peptide mit oxidativ gefalteten Peptidepitopen durch Thiol-Maleimid-Chemie.^[19b] Der Kern ist ein tetravalentes PLL-Dendrimer, das angeknüpfte cyclische Peptid enthält zwei Disulfidbindungen.

Hackeng et al. berichteten von der Herstellung eines Peptids mit einer Disulfidbrücke und einem N-terminal angefügten Thiaprolin-GlyGly-Linker.^[19b] Nachfolgend wurde das Thiaprolin in Cystein umgewandelt, um die Kupplung mit dem Maleimid-funktionalisierten Dendronkern durchführen zu können (Abbildung 8a). Das Hauptproblem bei dieser Strategie ist die Isomerisierung des Peptids durch Umordnung von Disulfidgruppen in Gegenwart eines Thiols; dies lässt sich jedoch vermeiden, wenn man den flexiblen Linker durch einen starrereren Abstandhalter ersetzt oder das Freilegen der Thiolgruppe und die Thiol-Maleimid-Kupplung simultan durchführt (Abbildung 8b).

Die Oximligation fand ebenfalls Anwendung für das Design tetramerer Dendrimere, die das Nonapeptid LyP-1 mit einer Disulfidbindung enthalten.^[51] Jeder der N-Termini des tetrameren Dendrimers wurde mit einer Aminooxygruppe modifiziert, um das oxidativ gefaltete Peptid LyP-1, das eine Ketogruppe am C-Terminus trägt, zu konjugieren. Mit dieser Methode erhielt man das vollständig beladene tetramere (LyP-1)₄-Dendrimer, das nachfolgend durch MALDI-TOF-MS charakterisiert wurde.

Trotz des beachtlichen Erfolgs dieser konvergenten Systeme lassen sich ihre Limitierungen bei der Synthese von PDDs höherer Generation doch nicht übersehen. So wurde bis heute von keinem octameren Dendrimer mit Disulfidbindungen berichtet. Selbst im Fall der kleinen cyclischen

RGD-Peptide handelt es sich bei den größten bisher synthetisierten homogenen PDDs um 16-mer-Dendrimere.^[45] Es scheint, dass effiziente Synthesemethoden entwickelt werden müssen, um zu großen Dendrimern mit vollständig beladenen Peptiden zu gelangen.

3. Biologische Anwendungen von PDDs

3.1. Bildgebung

Wichtige bildgebende Verfahren mit PDDs sind die Radionuclid- und die Fluoreszenz-basierte optische Bildgebung; zu diesem Zweck wurden zahlreiche Peptidliganden mit radioaktiven und/oder Fluoreszenzmarkern funktionalisiert, um Rezeptoren abzubilden.^[52] Bei der Markierung von Peptiden ist jedoch Vorsicht geboten, da das Peptid hierdurch häufig schlechter bindet, seine Funktion ändert und eine andere Verteilung im biologischen System aufweist.^[53] Eine Peptidmultimerisierung, die die Menge des Peptids an der Dendrimeroberfläche relativ zur eingeführten Markierung vergrößert, kann den Einfluss der Markierung vermindern und die Bindungsaffinität verstärken. Mehrere Forschergruppen haben das Konzept der Multimerisierung auf die Herstellung von Peptiddendrimern aus mehreren Peptiden und Hybridmarkierungen angewendet, um die Spezifität zu verbessern. So wurden beispielsweise das cyclische RGDfK-Dimer und -Tetramer $\text{NH}_2\text{-Glu}[\text{c(RGDfK)}]_2$ bzw. $\text{NH}_2\text{-Glu}[\text{c(RGDfK)}]_4$, die durch *N*-Succinimidyl-4-¹⁸F-fluorbenzoat ([¹⁸F]SFB) als prosthetische Gruppe am Fokalfunkt ¹⁸F-markiert waren, eingesetzt, um gegen Integrin $\alpha_v\beta_3$ gerichtete Radiotracer zum Nachweis von Tumorgewebe durch Einzelphotonenemissions-Computertomographie (SPECT) und Positronenemissionstomographie (PET)^[44a,54] zu entwickeln. Dabei zeigte sich, dass das Tetramer eine etwas bessere Bindungsaffinität für Integrin $\alpha_v\beta_3$ hat ($\text{IC}_{50} = 15 \text{ nM}$) als das Dimer ($\text{IC}_{50} = 32 \text{ nM}$). Der Fluoreszenzmarker 5(6)-Carboxyfluorescein (FAM) wurde an die C-terminale Aminogruppe eines PLL-Dendrimers angeknüpft, das vier Kopien des cyclischen Nonapeptids LyP-1 trug.^[51] Die In-vitro-Fluoreszenzbilder zeigen eine stärkere Akkumulation und Penetration von (LyP-1)₄-Dendrimer-FAM als von monomeren LyP-1-FAM.

PDDs mit dualer Funktion, die Fluoreszenzsonden ebenso wie Chelatliganden zur Koordination von Radionucliden enthalten, wurden als robuste, makromolekulare, multimodale Bildgebungsagentien hergestellt. Kuil et al.^[48] synthetisierten mono-, di- und tetramere Dendrimere, die das (gegen den Chemokinrezeptor CXCR4 gerichtete) Peptid Ac-TZ14011 enthalten, und funktionalisierten diese mit einer multimodalen Markierung aus einem Cy5.5-artigen Fluorophor und einem Diethylentriaminpentaacetat(DTPA)-Chelator (Abbildung 9). Das markierte Dimer und Tetramer zeigten eine höhere Affinität als das markierte Monomer, aber eine geringere als das unmarkierte Monomerpeptid. Alle drei dendrimernen Peptide wurden zur Abbildung von den Rezeptor CXCR4 exprimierenden Tumoren eingesetzt.^[48]

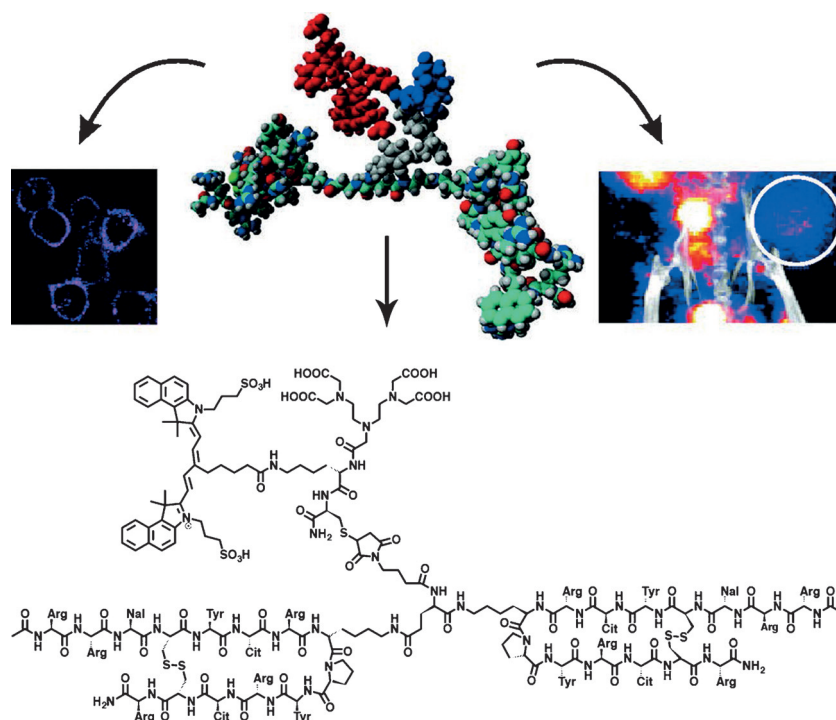


Abbildung 9. Dimere Peptiddendrimere mit Ac-TZ14011-Peptiden und einer multimodalen Markierung für die konfokale Mikroskopie und SPECT/CT-Bildgebung. Adaptiert aus Lit. [48], Copyright (2011), mit Genehmigung der American Chemical Society.

3.2. Wirkstofftransport

Dendrimere sind im Verlauf der vergangenen Jahrzehnte ausgiebig für Wirkstoff- und Gentransport eingesetzt worden.^[55] PDDs können eine derartige Fracht durch zielgerichtete Rezeptorbindung abliefern.^[56,57] Beispielsweise zeigen PEGylierte PAMAM-Dendrimere mit cyclischen RGD-Peptidliganden, die das über eine säureempfindliche *cis*-Aconitylbindung angeknüpfte Tumortherapeutikum Doxorubicin (DOX) transportieren, aktives Targeting durch spezifische Wechselwirkung des RGD mit Integrin $\alpha_v\beta_3$, passives Targeting durch den polymeren PEG-PAMAM-Träger sowie eine kontrollierte Freisetzung von DOX in Gegenwart schwach acider Lysosomen.^[39] Shah et al. konstruierten ein multifunktionales Wirkstofftransportsystem unter Zuhilfenahme eines modifizierten PPI-Dendrimers als Träger des Tumortherapeutikums Paclitaxel (das den Zelltod induziert) zuzüglich eines synthetischen Analogons des Peptidhormons LHRH (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone) zur gezielten Ansteuerung des Tumors.^[58] Eine Behandlung mit diesem Wirkstofftransportsystem führte zu einer wirkungsvollen Induktion des selektiven Zelltods (Apoptose) und effektiver Schrumpfung des Tumors, wobei unerwünschte Nebenwirkungen an gesunden Organen vermieden wurden.

Multifunktionale Nanomaterialien für die Theranostik haben in jüngster Zeit beträchtliche Aufmerksamkeit erlangt.^[59] Für die PDDs haben Taratula und Mitarbeiter eine multifunktionale Plattform vorgestellt, bei der PEGylierte PPI-Dendrimere durch eine Thiol-Maleimid-Reaktion mit LHRH-Peptiden konjugiert werden. Ein hydrophober Phtalocyaninwirkstoff (mit starker Absorption im sichtbaren

tiefroten und nahinfraroten (NIR) Bereich) wurde physikalisch im PPI-Dendrimergestütze gefangen. Die Assoziate konnten für die Bildgebung und die photodynamische Therapie eingesetzt werden.^[60] Die Bildgebungsexperimente an Mäusen ergaben, dass sich mit diesen Nanoträgermolekülen eine effiziente Internalisierung durch Krebszellen und somit eine Akkumulation im Tumor erreichen lässt, wenn sie intravenös verabreicht werden. Mit RGD-Peptid modifizierte Dendrimere, die sowohl mithilfe einer Thioharnstoffbindung angeknüpfte Fluoresceinisothiocyanat(FI)-Reste als auch den physikalisch verkapselten Wirkstoff DOX tragen, wurden von Shi et al. hergestellt (Abbildung 10a).^[61] Fluoreszenzmikroskopie bestätigte die spezifische Internalisierung der PDD-Träger durch Integrin $\alpha_v\beta_3$ überexprimierende Krebszellen. Der mitgeführte DOX-Wirkstoff wurde dann über einen längeren Zeitraum hinweg freigesetzt.

PDDs können beim Wirkstofftransport auch als stimuli-responsive Materialien wirken. Durch Enzyme spaltbare, temperaturempfindliche Peptide sind für die kontrollierte Wirkstofffreisetzung mit dendritischen Gerüsten verknüpft worden. Haag und Mitarbeiter konstruierten ein Gerüst mit hypervernetztem Polyglycerin als Träger, dem Dipeptid FK oder dem Tetrapeptid AFKK als enzymatisch abbaubarem Linker sowie Doxorubicin oder Methotrexat als mitgeführtem Wirkstoff.^[62] Das Konjugat war in der Lage, den Wirkstoff in Gegenwart von Cathepsin B, das in Tumorzellen überexprimiert wird, freizusetzen und zeigte bei zwei Humantumor-Zelllinien antiproliferative Wirkung. Thermosensitive, Elastin-artige Peptide mit einer VPGVG-Wiederholeinheit wurden mit PAMAM-Dendrimern konjugiert, um ein Elastin-mimetisches Dendrimer für den Wirkstofftrans-

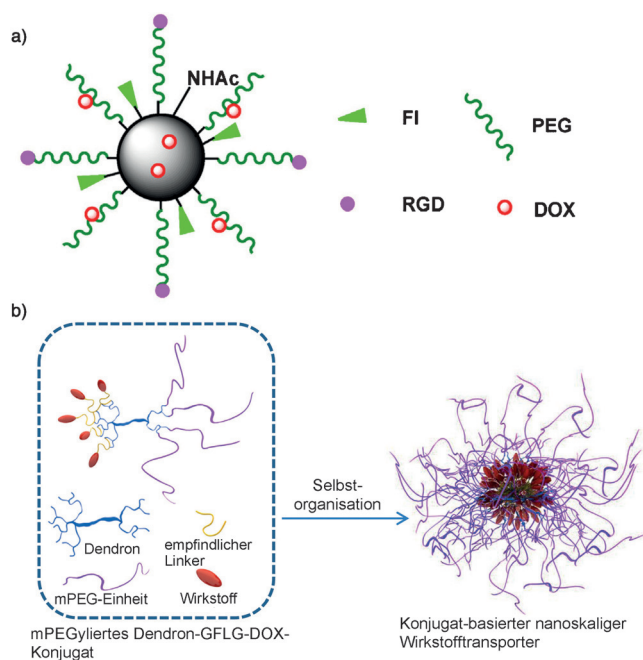


Abbildung 10. Schematische Darstellung a) des G5-PAMAM.NHAc-FI-PEG-RGD/DOX-Komplexes und b) amphiphiler mPEGylierter Dendron-GFLG-DOX-Konjugate, die sich zu Nanopartikeln selbstorganisieren haben. Wiedergabe aus Lit. [61, 64b], Copyright (2015) und (2014), mit Genehmigung von Elsevier.

port zu generieren.^[63] Detaillierte Untersuchungen an einem biologischen System liegen hierzu noch nicht vor.

Amphiphile Peptid-Dendrimer-Konjugate, die sich zu Nanostrukturen selbstorganisieren können, bilden eine neue Klasse von Wirkstofftransportsystemen. Gu et al. entwarfen mPEGylierte Peptiddendrimer-GFLG-DOX-Konjugate, die durch eine effiziente zweistufige Klickreaktion herstellbar sind und die sich zu Nanopartikeln mit Durchmessern von 80–100 nm selbstorganisieren (Abbildung 10b).^[64] Das GFLG-Peptid, das durch Cathepsin B spaltbar ist, wurde als enzymresponsiver Linker zur Verknüpfung mit DOX untersucht. Diese Nanopartikel zeigten eine gesteigerte Akkumulation in Tumoren infolge erhöhter Permeabilität und Retention (EPR-Effekt), geringe Toxizität und Nebenwirkungen infolge der kontrollierten Wirkstoffabgabe sowie in Mäusen mit Ovarial- oder Mammakarzinomen eine höhere Antitumoraktivität als bei Verabreichung einer gleich großen Dosis an freiem DOX.

Eine spezifische Wirkstoff-Freisetzung lässt sich auch bei Genstudien erreichen. So wurde beispielsweise ein dendritischer Dreiblock-Nanoträger, PAMAM-PEG-cRGD, entwickelt und an anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzellen des Menschen als siRNA-Vektor, der auf hERG (human Ether-à-go-go-Related Gene) abzielt, erprobt.^[40] Die PAMAM-PEG-cRGD-Konjugate zeigten als Folge der Konjugation der PEG-Kette und der verbesserten zellulären Aufnahme durch die RGD-Integrin-Wechselwirkung eine vernachlässigbare Cytotoxizität und konnten die Expression von hERG bis auf 26.3 % des Kontrollwerts herunterregulieren. Liu et al.^[65] dekorierten PAMAM-Dendrimere mit einem Peptid, das die

Sequenz RGDK (für die spezifische Tumoranbindung) und das E₁₆-Peptid (zur Förderung der Zellpenetration durch Wechselwirkung mit Neuropilin-1-Rezeptoren) enthielt. Die Peptid-modifizierten Dendrimere wurden mit Hsp-27-siRNA vermischt, um durch elektrostatische Wechselwirkungen Komplexe zu bilden. Diese bewirkten in vivo eine zweifach stärkere Gen-Stillegung als bei einer nicht gezielten Verabreichung sowie eine potente Antikrebswirkung durch Hemmung des Tumorwachstums bei Prostatakrebsmodellen in vitro und in vivo.^[65] Ein Polyglyceroldendron mit Glycindergruppe wurde am Fokalkpunkt mit einer hydrophoben C-18-Alkylkette modifiziert; das so konstruierte amphiphile Dendron wurde anschließend für die nichtvirale Geneinschleusung zu Micellen aggregiert.^[66] Der Genvektor ist selbst bei hohem Stickstoff/Phosphor(N/P)-Verhältnis (N/P = 100) ungiftig und vermag siRNA effizient ans Ziel zu führen, um in HeLa-Zellen eine Gen-Stillegung zu erreichen.

3.3. Makromolekulare Wirkstoffe funktionalisierter Dendrimere

Dendrimere werden nicht nur zum Wirkstofftransport eingesetzt, sondern können auch so gestaltet werden, dass Impfstoffe, antivirale Wirkstoffe, Tumortheraeutika oder pharmakologische Sonden für Ionenkanäle erhalten werden. Traditionell erfordern Antigen-Peptide zum Auslösen einer starken Immunantwort die Konjugation mit einem Protein- oder Peptidträger, um die Schwierigkeiten infolge einer schwachen Antigenität sowie durch immunogene Trägerproteine zu vermeiden. Tam entwickelte multiple Antigen-Peptide (MAPs),^[14] die aus PLL-Dendrimern mit kovalent angeknüpften Antigen-Peptiden bestehen. Die synthetisierten MAPs mit mehreren Kopien des Antigens erhöhten die Immunogenität stark und ergaben vielversprechende Impfstoffkandidaten für verschiedene Krankheiten wie Maul- und Klauenseuche (MKS),^[67] AIDS^[68] und Malaria.^[69] In jüngerer Zeit generierten Gervay-Hague et al. multivalente Peptidkonstrukte mit zwei verschiedenen Peptidkomponenten, die simultan B- und T_H-zellvermittelte Immunreaktionen zu stimulieren vermögen.^[12a] Die heteromultimeren Peptidkonstrukte zeigten erhöhte Bindung, Avidität und Spezifität gegen den etablierten HIV-neutralisierenden Human-Antikörper Mab b12, was sie zu HIV-1-Impfstoffkandidaten macht. Interessanterweise können sich PDDs mit amphiphiler Struktur zu Nanopartikeln aus einer peripheren antigenen Epitopschicht, die mit einem Dendrimerkern konjugiert ist, selbstorganisieren.^[12b] Für die Entwicklung eines neuartigen Impfstoffs für Gruppe-A-Streptokokken (GAS) mit verminderter Autoimmunität wurde eine dendritische Struktur aus einem Polyacrylatkern und einer peripheren Schicht des B-Zell-Minimalepitops J14 in Wasser zu 20 nm großen Nanopartikeln zusammengelagert (Abbildung 11), sodass eine maximale Zugänglichkeit für das Immunsystem gewährleistet ist und eine starke Immunreaktion gegen das GAS-M-Protein resultiert.

Peptiddendrimere sind auch als antivirale Wirkstoffe einsetzbar. So haben etwa Sato et al. Carbosilan-Dendrimere mit drei, vier und sechs Kopien des Hämagglutinin(HA)-bindenden Peptids (Ala-Arg-Leu-Pro-Arg) synthetisiert.^[70]

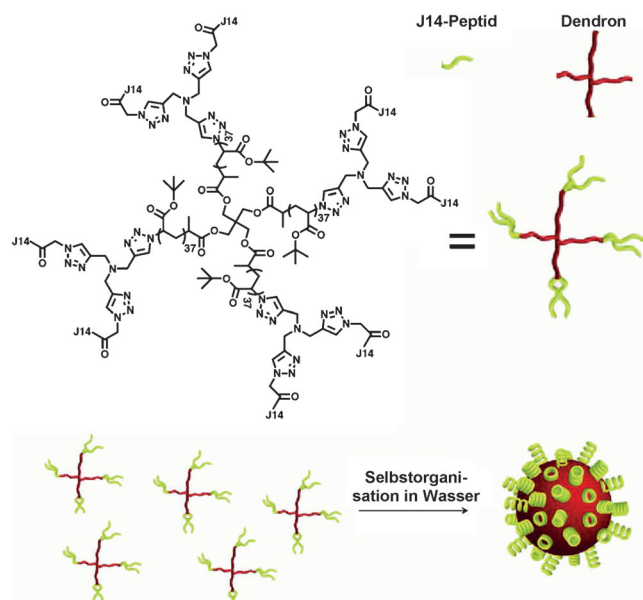


Abbildung 11. Synthese von Polyacrylatdendrimer-Nanopartikeln durch Selbstorganisation. Adaptiert aus Lit. [12b], Copyright (2010), mit Genehmigung von John Wiley & Sons.

Das 6-mer-PDD zeigte die stärksten Inhibitoraktivitäten gegen zwei Human-Influenzavirusstämme, A/PR/8/34 (H1N1) und A/Aichi/2/68 (H3N2), beide mit IC_{50} -Werten von $0.6 \mu\text{M}$.^[70] Ein mit Membranen wechselwirkendes, Alkin-modifiziertes Peptid, das vom Glykoprotein H aus Herpes-simplex-Virus (HSV) Typ 1 abgeleitet wurde, wurde von Weck und Mitarbeitern an ein Azidodendrimer auf Polyamidbasis angefügt.^[71] Es wurde erwartet, dass dieses Peptiddendrimer mit dem Glykoprotein der Hülle von HSV-1 und HSV-2 wechselwirkt und so verhindert, dass die Viren mit Zellmembranen in Kontakt kommen. Die IC_{50} -Werte für HSV-1 und HSV-2 waren 100 bzw. 300 nM. Bei diesen Konzentrationen fand sich kein Hinweis auf Cytotoxizität.

Jüngst haben Gu und Mitarbeiter Tryptophan-reiche Peptiddendrimere als neuartige dendritische Peptidwirkstoffe für die Tumorthherapie hergestellt.^[72] Die PDDs wurden aus einem polyedrischen, oligomeren Silsesquioxan(POSS)-Kern, einem Lysinrückgrat und einer terminalen Tryptophanylgruppe mittels Lösungsphasenpeptidsynthese aufgebaut. Infolge der gehäuften Tryptophanylreste mit ihren Indolringsystemen gingen die therapeutischen Dendrimere signifikante supramolekulare Wechselwirkungen mit DNA ein. Interessanterweise zeigten die Dendrimere verschiedenen Tumorzelllinien gegenüber eine gesteigerte Cytotoxizität und vermochten auch die Proliferation von Tumorzellen *in vivo* zu hemmen und die Zellapoptose am Tumorort zu beschleunigen. Die Inhibition von Faktoren der prä-mRNA-Spleißung wie dem FBP21-Protein hat auf dem Gebiet der Tumorthapeutika ein Interesse gewonnen.^[73] Freund et al. konstruierten über Säure-Amid-Konjugation ein multivalentes, dendritisches Polyglyceringerüst mit durchschnittlich sieben Peptiden der Sequenz WPPPPRVPR.^[74] Diese PDDs wiesen gegenüber dem monovalenten Peptid eine um das etwa 10-

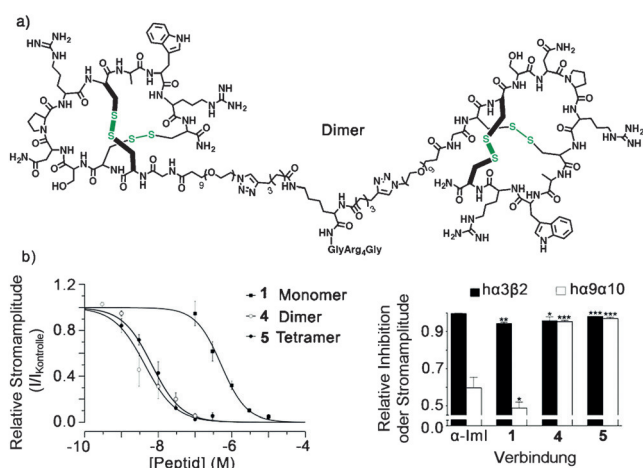


Abbildung 12. a) Ein Peptiddimer-Dendrimer mit Conotoxin α -ImI; b) Inhibition der nAChR-Subtypen $\alpha 7$, $\alpha 9\alpha 10$ und $\alpha 3\beta 2$ durch α -ImI- und ImI-Dendrimere. Adaptiert aus Lit. [50], Copyright (2015), mit Genehmigung der American Chemical Society.

Fache gesteigerte Affinität für die WW-Domänen des FBP21-Proteins auf. Hieraus ergibt sich ein Ansatz für die Inhibition der Erkennung Prolin-reicher Sequenzen durch FBP21.

Wir haben Peptiddendrimere mit erhöhter pharmakologischer Wirkung gegen homomere nikotinische Acetylcholinrezeptoren entworfen (nAChRs; Abbildung 12).^[50] Homomere di- und tetramere Lysindendrons, die den gegen $\alpha 7$ -nikotinische Acetylcholinrezeptoren wirkenden Hemmstoff α -ImI tragen, wurden mittels Klickchemie synthetisiert. Ein PEG-9-Abstandhalter wurde zwischen die α -ImI-Peptide und die Dendronzweige eingefügt, um die nachfolgende Bindung an mehrere Bindungsorte zu ermöglichen. Das dimere ImI-Konstrukt zeigte die stärkste Wirkung bei $\alpha 7$ -nAChR ($IC_{50} = 4 \text{ nM}$), was gegenüber dem nativen α -ImI ($IC_{50} = 440 \text{ nM}$) einer 100-fachen Verstärkung entspricht; bei den heteromeren $\alpha 3\beta 2$ - und $\alpha 9\alpha 10$ -nAChRs wurde keine signifikante Verstärkung der Wirkung festgestellt. Das Dendrimerdesign kann ein vielversprechendes Mittel zur Verbesserung der Wirkstärke und der Selektivität bioaktiver Peptide sein.

3.4. Proteinmimetika

Dendrimere sind von vergleichbarer Größe wie kleine Proteine und können dafür ausgelegt werden, die Wirkung einer Reihe solcher Moleküle nachzuahmen. PDDs, wie dendrimeres Collagen, haben sich als nützliche Proteinmimetika erwiesen.^[75] 2008 verknüpften Tong et al. zwei Sorten trifunktioneller Peptide mit der Oberfläche von PAMAM-Dendrimern, um collagenmimetische Dendrimere zu erhalten.^[76] Die collagenmimetischen Peptide bestehen aus:

- 1) einer sich wiederholenden GPO(Gly-Pro-Hyp)-Sequenz, die die tripelhelikale Struktur des Collagens nachahmen soll;
- 2) der zellbindenden Sequenz Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg (GFOGER);

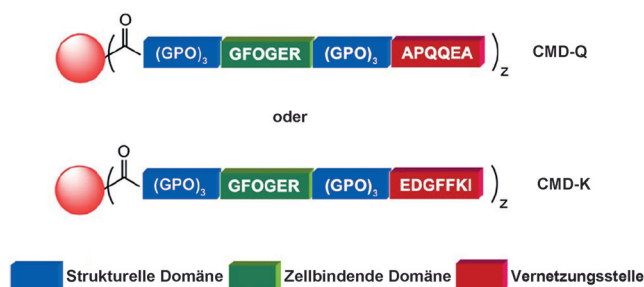


Abbildung 13. PAMAM-Dendrimere mit zwei Typen collagenmimetischer Peptide. Wiedergabe aus Lit. [76], Copyright (2008), mit Genehmigung von Elsevier.

- 3) entweder Ala-Pro-Gln-Gln-Glu-Ala (APQQEA) als Aminakzeptorsonde oder Glu-Asp-Gly-Phe-Phe-Lys-Ile (EDGFFKI), die als Amindonorsubstrat für die Gewebstransglutaminase (tTGase; Abbildung 13) wirkt.

Die beiden Typen von Peptiddendrimern wurden im Verhältnis 1:1 vermischt und enzymatisch zu einer supramolekularen Struktur vernetzt, die eine stabile, collagenartige Tripelhelixkonformation und verbesserte Zellerkennung aufwies. Kono et al. entwarfen einen thermosensitiven, Collagen imitierenden Wirkstoffträger durch die Kombination von Collagenpeptiden (Pro-Pro-Gly)₃ mit einem PAMAM-Dendron 4. Generation über Amidbindungen.^[77] Die Collagendendrimere induzierten die Bildung einer collagenartigen Tripelhelixkonformation. Der Vorgang war anders als bei natürlichem Collagen thermisch reversibel. Durch Anpassen der Dendrimergenerationen und der Peptidlänge lassen sich diese Dendrimere als mögliche Zellmatrix für eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung nutzen.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Polymerchemiker haben bei der Synthese und dem Einsatz neuer Materialien für biomedizinische Zwecke bedeutende Fortschritte erzielt.^[78] PDDs, die Eigenschaften sowohl von Peptiden als auch von Dendrons haben, sind besonders vielversprechend. In diesem Kurzaufsatz haben wir Beispiele für neuartige Routen zur Synthese von PDDs sowie einige ausgewählte biomedizinische Anwendungen vorgestellt.

Fortschritte bei der PDD-Synthese gründen sich stark auf die chemoselektive Peptidligation zur Konjugation linearer oder cyclischer Peptide. Dennoch bleibt die vollständige Dekoration von Dendrimern höherer Generation mit wohlstrukturierten Peptiden eine anspruchsvolle Aufgabe. Zusätzlich zur Optimierung der Ligationschemie und der Entwicklung effizienterer Konjugationsreaktionen sollte auch die Rolle der Abstandhaltersegmente zwischen den konjugierten Peptiden und dem Dendron weiter untersucht werden, um die Beladungskapazität von PDDs bei Dendrimern höherer Generation zu verbessern. Darüber hinaus müssen die Länge und die Flexibilität solcher Abstandhalter variiert werden, wenn oligomere Rezeptoren adressiert werden, um mehrfache Bindungen (Multivalenz) zu erreichen.^[79]

Im Rückblick auf die Entwicklung der frühen MAP-Systeme zeigt sich, dass PDDs anfänglich als Impfstoffe und antivirale Wirkstoffe Verwendung fanden. In der jüngeren Vergangenheit sind sie verbreitet für die Adressierung bestimmter Rezeptoren für die Bildgebung sowie zum Wirkstofftransport eingesetzt worden. Der Integrin- $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptor ist eines der bekanntesten Ziele, bei denen die Präsentation mehrerer cRGD-Peptide die Affinität für das Integrin $\alpha_v\beta_3$ erhöht hat. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) haben auf dem Gebiet des Multivalenzdesigns ebenfalls beachtliche Aufmerksamkeit geweckt, obgleich in den meisten Fällen keine signifikante Steigerung der Affinität gegenüber derjenigen von monomeren Peptidliganden festgestellt werden konnte. In weiteren Optimierungsstudien sollte untersucht werden, ob die Länge der Abstandhalter und die Peptidorientierung auf dem Weg zur Multivalenz zum Erfolg führen können. Jüngst fand unsere Gruppe, dass sich dendrimere Peptide durch eine signifikant gesteigerte Affinität und funktionelle Aktivität an einem Ionenkanal, dem α_7 -nAChR, auszeichnen.^[50] Dieser Befund könnte auf eine Vielzahl von Ionenkanälen erweiterbar sein, was zu wirksameren und selektiveren Liganden führen könnte.

Heute beginnt man damit, PDDs methodischer zu untersuchen, besonders in der Biomedizin. Heterogenität ist jedoch noch immer ein bedeutendes Problem, und in vielen Fällen fehlt eine vollständige Charakterisierung der PDDs. Insgesamt sind chemisch optimierte Syntheserouten, bessere Strukturdaten, verbesserte Analysen zur Qualitätskontrolle sowie ein besseres Verständnis der biophysikalischen Eigenschaften notwendig, um die Perspektiven von PDDs als Kandidaten für vielzählige klinische Anwendungen zu verbessern.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 5124–5134
Angew. Chem. **2016**, 128, 5208–5219

- [1] C. C. Lee, J. A. MacKay, J. M. Frechet, F. C. Szoka, *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, 1517–1526.
- [2] B. Helms, J. M. J. Frechet, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, 348, 1125–1148.
- [3] a) S. Svenson, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, 71, 445–462; b) C. Dufes, I. F. Uchegbu, A. G. Schatzlein, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, 57, 2177–2202; c) N. Joshi, M. Grinstaff, *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, 8, 1225–1236; d) I. N. Kurniasih, J. Keilitz, R. Haag, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 4145–4164; e) S. E. Stiriba, H. Frey, R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1329–1334; *Angew. Chem.* **2002**, 114, 1385–1390; f) D. Appelhans, B. Klajnert-Maculewicz, A. Janaszewska, J. Lazniewska, B. Voit, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 3968–3996.
- [4] A. M. Caminade, Y. Q. Wei, J. P. Majoral, *C. R. Chim.* **2009**, 12, 105–120.
- [5] B. Devarakonda, R. A. Hill, M. M. de Villiers, *Int. J. Pharm.* **2004**, 284, 133–140.
- [6] N. A. Stasko, C. B. Johnson, M. H. Schoenfisch, T. A. Johnson, E. L. Holmuhamedov, *Biomacromolecules* **2007**, 8, 3853–3859.
- [7] K. T. Al-Jamal, W. T. Al-Jamal, S. Akerman, J. E. Podesta, A. Yilmazer, J. A. Turton, A. Bianco, N. Vargesson, C. Kanthou, A. T. Florence, G. M. Tozer, K. Kostarelos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107, 3966–3971.
- [8] A. F. Hussain, H. R. Kruger, F. Kampmeier, T. Weissbach, K. Licha, F. Kratz, R. Haag, M. Calderon, S. Barth, *Biomacromolecules* **2013**, 14, 2510–2520.

- [9] T. L. Bowersock, B. E. Sobecki, S. J. Terrill, N. C. Martinon, T. R. Meinert, R. D. Leyh, *Am. J. Vet. Res.* **2014**, *75*, 770–776.
- [10] B. Lepenies, J. Lee, S. Sonkaria, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**, *65*, 1271–1281.
- [11] a) T. Niidome, H. Yamauchi, K. Takahashi, K. Naoyama, K. Watanabe, T. Mori, Y. Katayama, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2014**, *25*, 1362–1373; b) G. Lamanna, M. Grillaud, C. Macri, O. Chaloin, S. Muller, A. Bianco, *Biomaterials* **2014**, *35*, 7553–7561.
- [12] a) J. G. Schellinger, L. M. Danan-Leon, J. A. Hoch, A. Kassa, I. Srivastava, D. Davis, J. Gervay-Hague, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3230–3233; b) M. Skwarczynski, M. Zaman, C. N. Urbani, I. C. Lin, Z. F. Jia, M. R. Batzloff, M. F. Good, M. F. Monteiro, I. Toth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5742–5745; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5878–5881.
- [13] a) J. F. Lutz, H. G. Börner, K. Weichenhan, *Aust. J. Chem.* **2007**, *60*, 410–413; b) S. Dehn, R. Chapman, K. A. Jolliffe, S. Perrier, *Polym. Rev.* **2011**, *51*, 214–234; c) A. Pini, C. Falciani, L. Bracc, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2009**, *10*, 194–195.
- [14] J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 5409–5413.
- [15] P. Niederhafner, J. Sebestik, J. Jezek, *J. Pept. Sci.* **2005**, *11*, 757–788.
- [16] D. T. S. Rijkers, G. W. van Esse, R. Merckx, A. J. Brouwer, H. J. F. Jacobs, R. J. Pieters, R. M. J. Liskamp, *Chem. Commun.* **2005**, 4581–4583.
- [17] M. Mammen, S. K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754–2794; *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908–2953.
- [18] E. K. Woller, M. J. Cloninger, *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 1052–1054.
- [19] a) P. M. Heegaard, U. Boas, N. S. Sorensen, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 405–418; b) P. Van de Vijver, M. Schmitt, D. Suylen, L. Scheer, M. C. L. G. D. Thomassen, L. J. Schurgers, J. H. Griffin, R. R. Koenen, T. M. Hackeng, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 19318–19321.
- [20] J. Shao, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3893–3899.
- [21] F. Chaves, J. C. Calvo, C. Carvajal, Z. Rivera, L. Ramirez, M. Pinto, M. Trujillo, F. Guzman, M. E. Patarroyo, *J. Pept. Res.* **2001**, *58*, 307–316.
- [22] J. P. Mitchell, K. D. Roberts, J. Langley, F. Koentgen, J. N. Lambert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2785–2788.
- [23] M. Sakamoto, A. Ueno, H. Mihara, *Chem. Commun.* **2000**, 1741–1742.
- [24] I. van Baal, H. Malda, S. A. Synowsky, J. L. J. van Dongen, T. M. Hackeng, M. Merckx, E. W. Meijer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5052–5057; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5180–5185.
- [25] M. Monsó, W. Kowalczyk, D. Andreu, B. G. de La Torre, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 3116–3121.
- [26] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clarklewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779.
- [27] T. Durek, V. Y. Torbeev, S. B. H. Kent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 4846–4851.
- [28] S. Khan, S. Sur, P. Y. W. Dankers, R. M. P. da Silva, J. Boekhoven, T. A. Poor, S. I. Stupp, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 707–717.
- [29] a) M. M. C. Bastings, B. A. Helms, I. van Baal, T. M. Hackeng, M. Merckx, E. W. Meijer, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6636–6641; b) E. H. M. Lempens, B. A. Helms, A. R. Bayles, M. Merckx, E. W. Meijer, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 111–119.
- [30] a) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064; b) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711.
- [31] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021; *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056–2075.
- [32] N. K. Devaraj, J. P. Collman, *QSAR. Comb. Sci.* **2007**, *26*, 1253–1260.
- [33] T. P. Carberry, R. Tarallo, A. Falanga, E. Finamore, M. Galdiero, M. Weck, S. Galdiero, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 13678–13685.
- [34] a) L. S. Campbell-Verduyn, L. Mirfeizi, A. K. Schoonen, R. A. Dierckx, P. H. Elsinga, B. L. Feringa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11117–11120; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 11313–11316; b) H. L. Kim, K. Sachin, H. J. Jeong, W. Choi, H. S. Lee, D. W. Kim, *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 402–407.
- [35] W. Tang, M. L. Becker, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 7013–7039.
- [36] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16793–16797.
- [37] C. Ornelas, J. Broichhagen, M. Weck, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3923–3931.
- [38] C. A. DeForest, B. D. Polizzotti, K. S. Anseth, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 659–664.
- [39] S. J. Zhu, L. L. Qian, M. H. Hong, L. H. Zhang, Y. Y. Pei, Y. Y. Jiang, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, H84–H89.
- [40] G. H. Li, Z. J. Hu, H. H. Yin, Y. J. Zhang, X. L. Huang, S. M. Wang, W. Li, *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 1293–1306.
- [41] A. Almutairi, R. Rossin, M. Shokeen, A. Hagooly, A. Ananth, B. Capoccia, S. Guillaudeu, D. Abendschein, C. J. Anderson, M. J. Welch, J. M. J. Fréchet, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 685–690.
- [42] a) B. Jiang, J. Zhao, Y. H. Li, D. S. He, J. Z. Pan, J. H. Cao, L. Guo, *Lett. Org. Chem.* **2013**, *10*, 594–601; b) R. L. Juliano, X. Ming, O. Nakagawa, R. Z. Xu, H. Yoo, *Theranostics* **2011**, *1*, 211–219.
- [43] G. Carlucci, H. J. K. Ananias, Z. L. Yu, C. Van de Wiele, R. A. Dierckx, I. J. de Jong, P. H. Elsinga, *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 2501–2516.
- [44] a) Z. H. Wu, Z. B. Li, K. Chen, W. B. Cai, L. He, F. T. Chin, F. Li, X. Y. Chen, *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 1536–1544; b) X. Y. Chen, S. Liu, Y. P. Hou, M. Tohme, R. Park, J. R. Bading, P. S. Conti, *Mol. Imaging Biol.* **2004**, *6*, 350–359; c) G. Thumshirn, U. Hersel, S. L. Goodman, H. Kessler, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 2717–2725.
- [45] C. Wängler, S. Maschauer, O. Prante, M. Schäfer, R. Schirrmacher, P. Bartenstein, M. Eisenhut, B. Wängler, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2168–2181.
- [46] M. Góngora-Benítez, J. Tulla-Puche, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 901–926.
- [47] E. de Oliveira, J. Villen, E. Giralt, D. Andreu, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 144–152.
- [48] J. Kuil, T. Buckle, J. Oldenburg, H. S. Yuan, A. D. Borowsky, L. Josephson, F. W. B. van Leeuwen, *Mol. Pharmaceutics* **2011**, *8*, 2444–2453.
- [49] C. B. Yim, O. C. Boerman, M. de Visser, M. de Jong, A. C. Dechesne, D. T. Rijkers, R. M. Liskamp, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1323–1331.
- [50] J. Wan, J. X. Huang, I. Vetter, M. Mobli, J. Lawson, H. Tae, N. Abraham, B. Paul, M. A. Cooper, D. J. Adams, R. J. Lewis, P. F. Alewood, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3209–3212.
- [51] J. W. Seo, H. Baek, L. M. Mahakian, J. Kusunose, J. Hamzah, E. Ruoslahti, K. W. Ferrara, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 231–239.
- [52] J. A. Moss, A. L. Vavere, A. Azhdarinia, *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 3255–3265.
- [53] J. Kuil, A. H. Velders, F. W. B. van Leeuwen, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1709–1719.
- [54] I. Dijkgraaf, J. A. W. Kruijtz, S. Liu, A. C. Soede, W. J. G. Oyen, F. H. M. Corstens, R. M. J. Liskamp, O. C. Boerman, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2007**, *34*, 267–273.
- [55] a) K. Madaan, S. Kumar, N. Poonia, V. Lather, D. Pandita, *J. Pharm. BioAllied Sci.* **2014**, *6*, 139–150; b) J. Y. Wu, W. Z. Huang, Z. Y. He, *Sci. World J.* **2013**, DOI: 10.1155/2013/630654.
- [56] A. K. Patri, A. Myc, J. Beals, T. P. Thomas, N. H. Bander, J. R. Baker, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1174–1181.
- [57] a) W. G. Lesniak, M. S. T. Kariapper, B. M. Nair, W. Tan, A. Hutson, L. P. Balogh, M. K. Khan, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1148–1154; b) L. A. Han, R. Q. Huang, J. F. Li, S. H. Liu, S. X.

- Huang, C. Jiang, *Biomaterials* **2011**, 32, 1242–1252; c) D. A. Modi, S. Sunoqrot, J. Bugno, D. D. Lantvit, S. Hong, J. E. Burdette, *Nanoscale* **2014**, 6, 2812–2820.
- [58] V. Shah, O. Taratula, O. B. Garbuzenko, O. R. Taratula, L. Rodriguez-Rodriguez, T. Minko, *Clin. Cancer Res.* **2013**, 19, 6193–6204.
- [59] H. S. Peng, X. Y. Liu, G. T. Wang, M. H. Li, K. M. Bratlie, E. Cochran, Q. Wang, *J. Mater. Chem. B* **2015**, 3, 6856–6870.
- [60] O. Taratula, C. Schumann, M. A. Naleway, A. J. Pang, K. J. Chon, O. Taratula, *Mol. Pharmaceutics* **2013**, 10, 3946–3958.
- [61] X. He, C. S. Alves, N. Oliveira, J. Rodrigues, J. Zhu, I. Banyai, H. Tomas, X. Shi, *Colloids Surf. B* **2015**, 125, 82–89.
- [62] M. Calderón, R. Graeser, F. Kratz, R. Haag, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 3725–3728.
- [63] a) C. Kojima, K. Irie, *Biopolymers* **2013**, 100, 714–721; b) C. Kojima, K. Irie, T. Tada, N. Tanaka, *Biopolymers* **2014**, 101, 603–612.
- [64] a) C. Zhang, D. Pan, K. Luo, W. She, C. Guo, Y. Yang, Z. Gu, *Adv. Healthcare Mater.* **2014**, 3, 1299–1308; b) N. Li, N. Li, Q. Yi, K. Luo, C. Guo, D. Pan, Z. Gu, *Biomaterials* **2014**, 35, 9529–9545; c) C. Y. Zhang, D. Y. Pan, K. Luo, N. Li, C. H. Guo, X. L. Zheng, Z. W. Gu, *Polym. Chem.* **2014**, 5, 5227–5235.
- [65] X. Liu, C. Liu, C. Chen, M. Bentobji, F. A. Cheillan, J. T. Piana, F. Qu, P. Rocchi, L. Peng, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2014**, 10, 1627–1636.
- [66] S. Malhotra, H. Bauer, A. Tschiche, A. M. Staedtler, A. Mohr, M. Calderon, V. S. Parmar, L. Hoeke, S. Sharbati, R. Einspanier, R. Haag, *Biomacromolecules* **2012**, 13, 3087–3098.
- [67] E. De Oliveira, J. Villen, E. Giralt, D. Andreu, *Bioconjugate Chem.* **2003**, 14, 144–152.
- [68] H. Baigude, K. Katsuraya, K. Okuyama, T. Uryu, *Macromol. Chem. Phys.* **2004**, 205, 684–691.
- [69] E. H. Nardin, J. M. Calvo-Calle, G. A. Oliveira, R. S. Nussen-zweig, M. Schneider, J. M. Tiercy, L. Loutan, D. Hochstrasser, K. Rose, *J. Immunol.* **2001**, 166, 481–489.
- [70] K. Hatano, T. Matsubara, Y. Muramatsu, M. Ezure, T. Koyama, K. Matsuoka, R. Kuriyama, H. Kori, T. Sato, *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 8332–8339.
- [71] R. Tarallo, T. P. Carberry, A. Falanga, M. Vitiello, S. Galdiero, M. Galdiero, M. Weck, *Int. J. Nanomed.* **2013**, 8, 521–534.
- [72] X. Zhang, Z. J. Zhang, X. H. Xu, Y. K. Li, Y. C. Li, Y. T. Jian, Z. W. Gu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 4289–4294; *Angew. Chem.* **2015**, 127, 4363–4368.
- [73] S. Bonnal, L. Vigevani, J. Valcarcel, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2012**, 11, 847–859.
- [74] L. M. Henning, S. Bhatia, M. Bertazzon, M. Marczyneke, O. Seitz, R. Volkmer, R. Haag, C. Freund, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, 11, 701–706.
- [75] L. R. He, P. Theato, *Eur. Polym. J.* **2013**, 49, 2986–2997.
- [76] S. T. Khew, Q. J. Yang, Y. W. Tong, *Biomaterials* **2008**, 29, 3034–3045.
- [77] C. Kojima, S. Tsumura, A. Harada, K. Kono, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 6052–6053.
- [78] a) K. Li, B. Liu, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 6570–6597; b) S. Swaminathan, J. Garcia-Amoros, A. Fraix, N. Kandoth, S. Sortino, F. M. Raymo, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 4167–4178; c) P. M. Kharkar, K. L. Kiick, A. M. Kloxin, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 7335–7372.
- [79] J. Vagner, L. P. Xu, H. L. Handl, J. S. Josan, D. L. Morse, E. A. Mash, R. J. Gillies, V. J. Hruby, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 1685–1688; *Angew. Chem.* **2008**, 120, 1709–1712.

Eingegangen am 9. September 2015,
veränderte Fassung am 1. November 2015
Online veröffentlicht am 15. März 2016
Übersetzt von Dr. Thomas Lazar, Paderborn