

Polymere Antitumormittel auf molekularer und zellulärer Basis?

Von Leo Gros, Helmut Ringsdorf und Hans Schupp^[*]

„Die Chemie ist eine reife Wissenschaft geworden, mit allen Vorteilen und Nachteilen der Reife: es wird reichlich geerntet, aber die Zukunft, das Abenteuer, scheint vielen anderswo zu liegen“^[1a]. Das gilt – im Jahre des 100. Geburtstags von *Hermann Staudinger* – auch für die makromolekulare Chemie. Wo liegen ihre „Abenteuer“? In Grenz- und Nachbargebieten wie Biomedizin und Molekularbiologie locken ungelöste Probleme, z. B. im Bereich der Krebs-Chemotherapie. Kann der Polymerchemiker einen Beitrag zur Lösung solcher Probleme leisten?

Polymere können für sich pharmakologisch aktiv sein oder als Träger für Pharmaka aufgrund ihrer speziellen Eigenschaften die Körperverteilung, Ausscheidung und Zellaufnahme der Pharmaka beeinflussen. Sie eröffnen somit eventuell neue Möglichkeiten der Therapie maligner Tumoren bis hin zur Affinitätschemotherapie mit synthetischen Makromolekülen.

Mit der Fähigkeit zum gezielten Ansteuern körperfremder Zellen als Grundlage für die immunologische Abwehr von Infektionen verfügt unser Körper über ein perfektes biologisches System zur „Affinitätstherapie“: Es ist faszinierend zu sehen, was das Immunsystem mit einer Tumorzelle macht, wenn es dieser nicht gelingt, die Abwehrmechanismen zu unterlaufen (vgl. Abb. 14). Kann man solche spezifischen Zell-Zell-Wechselwirkungen simulieren? Was müsste man können, um sich diesem Abenteuer experimentell zu nähern? Der Aufbau stabiler Membran- und Zellmodelle ist bereits möglich. Dies könnte ein erster Schritt in diese Richtung sein.

Weit davon entfernt, praktisch verwendbare Lösungen für eine spezifische Tumorthherapie anbieten zu können, kann die makromolekulare Chemie auf dem Weg zum angestrebten Ziel viel lernen. Die Kooperation mit Nachbardisziplinen, denen sie bisher oft fremd gegenüberstand, ist dafür – *Staudingers* Ideen entsprechend – eine der Voraussetzungen.

Irrtümer haben ihren Wert;

Jedoch nur hier und da.

Nicht jeder, der nach Indien fährt,

Entdeckt Amerika.

(Erich Kästner)

1. Einleitung

Was vielleicht einmal als Wildern in fremden Revieren galt, ist heutzutage notwendiger Teil wissenschaftlichen Arbeitens: das Eindringen in Nachbargebiete, das „interdisziplinäre Denken“. Dabei können gelegentlich Denkmodelle hilfreich sein, die nicht den strengen Anforderungen an luppenreine Definitionen genügen, wohl aber als Wegweiser im Dickicht der Fakten brauchbar sind. In diesem Sinn ist es zu verstehen, wenn wir, nach einer Unterscheidungsmöglichkeit für verschiedene Wirkungen von Antitumormitteln suchend, von solchen auf molekularer und zellulärer Basis sprechen.

Die meisten zur Zeit gebräuchlichen Antitumormittel sind als Pharmaka auf molekularer Basis zu betrachten. Stellen wir uns ein Zellgift vor, das in eine Zelle eindringt und eine chemische Reaktion (z. B. eine DNA-Vernetzung) auslöst oder ein wichtiges Enzym hemmt. Der „Tod“, d. h. die Zerstörung der so angegriffenen Zelle, ist auf eine chemische Reaktion zurückzuführen. Der Stoffwechsel wird gestört, das

innere Milieu der Zelle wird geschädigt, und zwar auf der Ebene molekularer Vorgänge. Solche Stoffe sollen deshalb als Antitumormittel auf *molekularer Basis* bezeichnet werden.

Die Natur benutzt dagegen häufig einen anderen Weg, um Tumorzellen zu bekämpfen: das Immunsystem erkennt entartete Zellen; Antikörper zusammen mit einem Proteinkomplex (Complementsystem) oder „Killerzellen“ treten mit der Tumorzellmembran in Wechselwirkung und zerstören sie. Auch wenn dieser Vorgang chemisch induziert sein kann, z. B. durch Stoffe, die Membranen destabilisieren, so ist doch der Zelltod letztlich physikalisch bedingt; das innere Milieu der Zellen kann nicht aufrechterhalten werden, weil die entscheidende kompartimentierende Struktur, die das (Eigen-) Leben der Zelle ermöglicht hat, zerstört wird (vgl. Abb. 14). Systeme, die auf diese Art die Zelle als Ganzes zerstören, bezeichnen wir als Antitumormittel auf *zellulärer Basis*.

In den letzten Jahren ist versucht worden, neben niedermolekularen auch polymere Antitumormittel zu entwickeln. Im vorliegenden Beitrag wird versucht, aus der Sicht des Polymerchemikers über den Stand der Forschung zu berichten und die Möglichkeiten polymerer Antitumormittel auf molekularer und zellulärer Basis zu diskutieren. Nach einer kurzen Darstellung von Überlegungen, die bei der Entwicklung von Antitumormitteln Pate gestanden haben, und von Chancen, derartige Pharmaka „maßzuschneidern“ (Abschnitt 2), soll im Abschnitt 3 erörtert werden, warum und wie man versucht hat, polymere Antitumormittel auf molekularer Basis aufzubauen. In Abschnitt 4 wird es dann darum gehen, welche Ansatzpunkte es gibt, um sich dem Problem der Chemotherapie von Tumoren von einer anderen Seite zu nähern:

[*] Prof. Dr. H. Ringsdorf, Dipl.-Chem. L. Gros, Dipl.-Chem. H. Schupp
Institut für Organische Chemie der Universität
J.-J.-Becher-Weg 18–20, D-6500 Mainz 1

ob man, die natürliche Immunabwehr imitierend, polymere Antitumormittel auf zellulärer Basis aufbauen kann.

2. Kann man Antitumormittel maßschneidern?

Die beiden gebräuchlichsten Therapien gegen Krebs, die Chirurgie und die Bestrahlung, sind nur dann mit optimalem Effekt anwendbar, wenn ein solider Tumor lokalisierbar ist. Sind die malignen Zellen über den Körper verteilt, dann bedarf es einer Therapie, die die Tumorzellen erreicht, wo immer sie sind. Das ist – zumindest theoretisch – die Domäne der Chemotherapie von Tumoren^[1b]. Obwohl in den letzten Jahren auf diesem Gebiet beachtliche Fortschritte erzielt wurden, existiert das Hauptproblem einer chemischen Bekämpfung von Tumoren nach wie vor, nämlich die nicht vorhandene Selektivität von Antitumormitteln: sie sind hochtoxisch, nicht nur für maligne, sondern auch für normale, d. h. gesunde Zellen.

Der Chemiker, der sich anschickt, Substanzen zur Krebstherapie rein empirisch zu entwickeln, kann entweder Naturstoffe isolieren oder neue Verbindungen synthetisieren und ihre Wirkung an Krebszellkulturen (in vitro) oder Tiernodellen (in vivo) prüfen. Abgesehen davon, daß dieses Vorgehen den nach Zusammenhängen zwischen Ursache und Wirkung suchenden Naturwissenschaftler nicht befriedigt, ist es sehr aufwendig. Ein solches „screening“ wird trotzdem in großem Maßstab durchgeführt; allein am National Cancer Institute der USA wurden bereits 1972 30800 neue Verbindungen getestet^[2].

Schon Anfang dieses Jahrhunderts hatte *Paul Ehrlich* das gezielte Ansteuern eines Krankheitsherdes^[*] über geeignete Rezeptoren zur Diskussion gestellt^[3]. Das Interesse, auch das Tumorproblem über diesen Weg, d. h. über die Immunologie anzugehen, hat ständig zugenommen und beruht auf dem Wissen um die hohe Spezifität der Erkennungs- und Abwehrmechanismen des Organismus gegenüber Fremdkörpern. In einer Flut von Arbeiten wurde daher in den letzten Jahren immer wieder versucht, die unspezifischen, für alle Zellen toxischen Antitumormittel durch maßgeschneiderte, die Tumorzellen selektiv angreifende Chemotherapeutika zu ersetzen.

„Drug Design“^[4] – d. h. das Maßschneidern von Pharmaka – setzt „Maßnahmen“ voraus. Es erfordert einerseits genaue Kenntnisse über die Beziehung zwischen der chemischen Struktur und der pharmakologischen Wirkung des Arzneistoffes, andererseits aber auch detailliertes Wissen über biochemische und morphologische Charakteristika der zu bekämpfenden Zelle. Hier liegt insbesondere bei der Krebserkrankung ein entscheidendes Problem. Trotz zahlloser Arbeiten auf diesem Gebiet ist das wirkliche Verständnis der Entstehung und Ausbreitung von Tumoren noch äußerst lückenhaft. Vor einer Überbewertung des „rational drug de-

sign“ und seiner Möglichkeiten kann man daher nur warnen^[5]. Trotzdem ist und bleibt die Vorstellung, Unterschiede zwischen Tumorzellen und Normalzellen zu erforschen und therapeutisch zu nutzen, eine brauchbare Leitlinie^[11, 6].

Dabei ist zunächst zu bedenken, daß es „die“ Tumorzelle nicht gibt. Die etwa 100 bekannten menschlichen Tumorarten unterscheiden sich beträchtlich, und sogar innerhalb eines Tumors gibt es verschiedene Zellsubpopulationen (Phänotypen), die sich ihrerseits im Verlauf der Entwicklung des Tumors verändern können^[7]. Tabelle 1 gibt einen Überblick über einige bisher bekannte Unterschiede zwischen normalen und entarteten Zellen eines Gewebetyps. Allerdings trifft nicht jedes dieser Charakteristika für alle Tumorarten zu^[8].

Tabelle 1. Charakteristische Eigenschaften von Tumorzellen im Vergleich zu Normalzellen.

Eigenschaften	Lit.
<i>Zellstoffwechsel und intrazelluläres Milieu</i>	
1. erhöhter Anteil methylierter Nucleoside	[9]
2. unterschiedliche Enzymmuster	[10]
– erhöhte Aktivität DNA-aufbauender und verminderte Aktivität DNA-abbauender Enzyme	[10]
– Fehlen der Asparagin-Synthetase (einige Leukämie-Arten)	[11]
– erhöhte Aktivität proteolytischer Enzyme in den Lysosomen	[12]
– stark verringerte Mn^{2+} -Superoxid-Dismutase-Aktivität	[13]
3. höherer Bedarf an exogenem Zn^{2+}	[14]
4. geringere Ca^{2+} -, höhere K^{+} -Konzentration	[15]
5. niedrigerer pH-Wert des Cytoplasmas (nach Glucose-Gabe)	[16]
<i>Membranstruktur und -eigenschaften</i>	
6. höhere Endocytoserate	[18]
7. geänderte Phospholipid-Zusammensetzung	[17d]
8. andere Membran-Glycoproteine (Lectin-Rezeptoren)	[7, 19]
9. tumorassoziierte Oberflächen-Antigene	[20]
<i>Zellwachstum und Verhalten im Zellverband</i>	
10. gestörte Zellproliferation	[21]
11. verringerte Kohäsion im Gewebeverband	[22]
12. verringerte Kontaktinhibierung	[22]
13. Metastasenbildung	[23]
14. Aktives Eindringen in fremdes Gewebe (invasiveness)	[22]

So beeindruckend diese Zusammenstellung charakteristischer Eigenschaften von Tumorzellen in Tabelle 1 auch sein mag, so muß doch festgehalten werden, daß sie zwar für diagnostische Zwecke brauchbar sind, jedoch bisher nur eine schmale Basis für die Entwicklung einer gezielten Tumorchemotherapie bilden.

Hervorzuheben ist die hohe Mitoserate vieler Tumorzellen. Nahezu alle bisher klinisch verwendeten Antitumormittel greifen in die Stoffwechselvorgänge ein, die für die Zellteilung wichtig sind. Tumoren, deren Zellen sich häufig teilen, werden deshalb besonders stark durch Cytostatica wie auch durch Bestrahlung getroffen. Hierbei wird natürlich auch gesundes, aber sich ebenfalls rasch teilendes Gewebe – z. B. Leber und Lymphsystem – stark geschädigt.

Auch wenn von einer tumorspezifischen Chemotherapie noch nicht gesprochen werden kann, so haben sich über die hohen Mitoseraten hinaus doch noch einige der in Tabelle 1 angeführten Unterschiede zwischen Normal- und Tumorzelle als brauchbar für ein „rational drug design“ erwiesen. Während auf höhere Endocytoseraten (Punkt 6 in Tabelle 1) und tumorassoziierte Oberflächen-Antigene (Punkt 9 in Tabelle 1) in den Abschnitten 3.2 bzw. 3.3.5 noch eingegangen wird, soll hier als Beispiel nur die Ausnutzung der unterschiedlichen Enzymmuster (Punkt 2 in Tabelle 1) erwähnt werden. Eine Enzymtherapie – die Zuführung von

[*] Lange vor *Ehrlich*, bereits im 14. Jahrhundert, war der Gedanke des „drug targeting“ geläufig. Im Vorwort zu seiner Sammlung von Lebensweisheiten begründet *Don Juan Manuel* („El conde de Lucanor“, Editorial Castalia, Madrid 1976), warum er sie in ansprechenden Geschichten verpackt: „Dies tat ich, dem Beispiele der Ärzte folgend, die, wenn sie eine Medizin zum Nutzen der Leber bereiten wollen, Zucker, Honig oder eine andere süße Sache hinzutun, weil die Leber das Süße liebt. Und wegen der Neigung der Leber zum Süßen zieht sie es an sich, und mit ihm die Medizin, die ihr guttut. Das Gleiche macht man mit jedem beliebigen Organ, das einer Medizin bedarf, indem man sie jeweils mit demjenigen mischt, welchem das Organ von Natur aus zuneigt.“

Asparaginase – wurde bei einigen Leukämie-Arten angewendet^[11,24]. Diese Leukämie-Zellen können kein Asparagin synthetisieren und decken ihren Bedarf aus exogenen Quellen. Asparaginase baut Asparagin ab und entzieht den Zellen diesen für die Protein-Biosynthese essentiellen Baustein.

Dieser relativ hohe Grad von Spezifität ist allerdings eine Ausnahme. Es hat nicht an Versuchen gefehlt^[2,6,25], Antitumormittel höherer Selektivität zu finden. Hierzu wurden mehrere Wege beschritten:

- 1) Isolierung oder Synthese neuer Wirkstoffe, z. B. Hormone, Pflanzenwirkstoffe, Interferone, Antimetabolite.
- 2) Weiterentwicklung bekannter Antitumormittel zur Selektivitätserhöhung, z. B. durch Fixierung an gewebsspezifische Substanzen wie Hormone^[26] oder anhand des Transportform-Wirkform-Prinzips^[27].
- 3) Verwendung von Trägersystemen (Carriern), die das Antitumormittel zum Wirkort (Tumor) befördern sollen^[28]. Dabei wurden insbesondere diskutiert:
 - Polymere (vgl. Abschnitt 3)
 - Liposomen^[29]
 - Zellen^[30]

Auf die Trägersysteme wurden in den letzten zehn Jahren große Hoffnungen gesetzt^[28–30], über die Verwendung eines dieser möglichen Trägersysteme für Antitumormittel, nämlich über Polymere, soll im folgenden berichtet werden.

3. Polymere Antitumormittel auf molekularer Basis

3.1. Warum polymere Antitumormittel?

Die Untersuchung von Polymeren in der Medizin^[31] (biomaterials), einem der neuesten und interessantesten Gebiete der Polymerwissenschaft (Polymer Science), konzentriert sich insbesondere auf pharmakologisch aktive Polymere, d. h. auf Makromoleküle, die entweder als solche pharmakologische Wirkung zeigen oder als Träger für niedermolekulare Pharmaka dienen.

Obwohl Polymere in der Medizin bereits breite Anwendung gefunden haben, z. B. zur Herstellung künstlicher Organe und Ersatzteile^[32], werden polymere Pharmaka trotz der Fortschritte in diesem Bereich^[33–43] nach wie vor mit großer Skepsis betrachtet. Zahlreiche Arbeiten befassen sich mit der Entwicklung polymerer Antitumormittel^[28,44,53]. Warum? *Harris Busch* gibt eine verblüffend einfache Antwort: "Everybody wants to contribute to the cancer problem..."^[45] – also auch die Polymerchemiker?

Ursprünglich hoffte man, durch Verwendung pharmakologisch aktiver Polymere mit hohen Molekulargewichten Depoteffekte zu erreichen^[46], dies nicht zuletzt aufgrund der Erfahrungen mit synthetischen, polymeren Plasmaexpandern^[47]. Bedenkt man jedoch die Vielfalt der Wechselwirkungen von Polymeren mit biologischen Systemen, so ist der Depoteffekt nur eine der Möglichkeiten, die die Anwendung pharmakologisch aktiver Polymere eröffnen kann.

Entscheidend bei der Tumorthherapie ist die Spezifität eines Antitumormittels^[48]. Ein Beispiel einer gezielten Synthese niedermolekularer Antitumormittel mit einer tumorzell-spezifischen Transportgruppe soll zeigen, welche Schwierigkeiten hierbei auftreten können, und warum eventuell die makromolekulare Chemie einen Beitrag zur Lösung der Probleme leisten kann.

Connors et al.^[49] untersuchten den Einfluß von Substituenten auf die zellspezifische Aufnahme von Sulfadiazinen durch Tumorgewebe in Ratten.

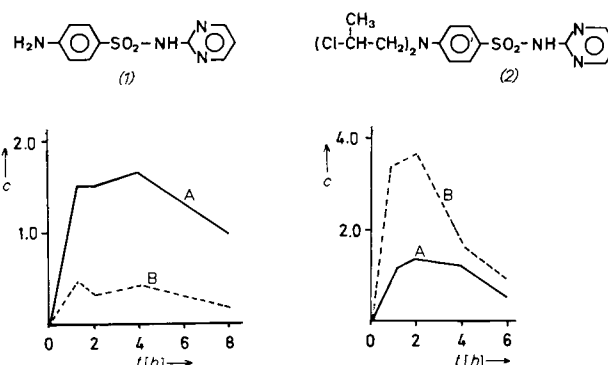


Abb. 1. Unterschiedliche Aufnahme der Sulfadiazine (1) und (2) durch Leber- und Tumorzellen (Walker-Tumor bei Ratten) [49]. c: µg Substanz pro mg Gewebe, t: Zeit nach intraperitonealer (i.p.) Injektion, A: Tumorzellen, B: Leberzellen.

Abbildung 1 zeigt (links), daß das Sulfadiazin-Derivat (1) stärker ins Gewebe eines Walker-Tumors aufgenommen wird als in die Leber. *Connors et al.* nahmen an, daß die Kombination dieser gewebsspezifischen Verbindung mit einem cytotoxischen Wirkprinzip, dem Lost-System, zu einer tumorspezifischen, cytotoxischen Wirkung führen könne und synthetisierten das Sulfadiazin-Lost (2). Dieses Molekül war in der Tat antitumoral wirksam, wurde aber nicht mehr bevorzugt im Tumorgewebe angereichert, sondern in der Leber (Abb. 1, rechts).

Anders gesagt: die chemische Verknüpfung von Struktureinheiten am kleinen und damit in seinen Eigenschaften stark strukturabhängigen Molekül führte in diesem Fall nicht zu einer Kombination der gewünschten Eigenschaften^[50]. Das muß nicht immer so sein^[51], ist aber sehr häufig der Fall^[52].

Die Natur erreicht ihre hohen Spezifitäten unter anderem dadurch, daß sie hochmolekulare Stoffe mit verschiedenen, häufig räumlich getrennten Wirkzentren aufbaut. Der Wirkungs-Spezifität und Kombination von Eigenschaften entspricht eine strukturelle Komplexität. Es liegt deshalb nahe, die Kombination erwünschter Eigenschaften (z. B. Zelltoxizität, Löslichkeit, Tumorzellspezifität) durch Bindung entsprechender Struktureinheiten an verschiedene Bereiche entlang einer Polymerkette zu verwirklichen. Abbildung 2 zeigt ein entsprechendes Modell^[36,53].

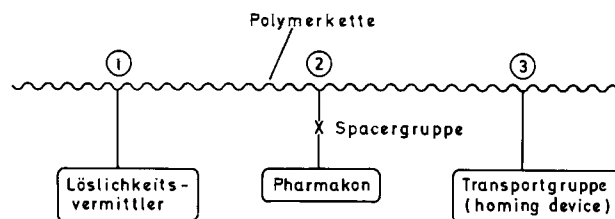


Abb. 2. Modell eines pharmakologisch aktiven Polymers [36,53].

Der Bereich ① des Modell-Makromoleküls enthält Bausteine, die zum einen das Löslichkeitsverhalten (Lipophilie, Hydrophilie) des Gesamt-moleküls und damit die Verteilung im Körper und zum anderen seine akute Toxizität beeinflussen können. Im Bereich ② ist das Pharmakon über eine (unter physiologischen Bedingungen spaltbare oder nicht spaltbare) Bindung und einen „Spacer“ (Abstandshalter) an das

Polymer gebunden. Schließlich kann man sich eine Struktureinheit ③ vorstellen, die eine spezifische Aufnahme in ein Zielgewebe ermöglicht, eine Transportgruppe („*homing device*“).

Die Wirkungsweise und biologische Aktivität polymerer Pharmaka hängt insbesondere von polymerspezifischen strukturellen Parametern ab:

- Molekulargewicht und Molekulargewichtsverteilung beeinflussen die Verteilung polymerer Pharmaka im Körper^[54]. So werden z. B. hochmolekulare Verbindungen nicht ins Gehirn transportiert (Blut-Hirn-Schranke^[55]) und im allgemeinen nach oraler Gabe nicht aus dem Darm resorbiert. Die Ausscheidung über die Niere ist molekulargewichtsabhängig^[56]. Vor allem bei hohen Molekulargewichten kommt es zu verzögerter Ausscheidung und Speicherung, insbesondere in Zellen des reticulo-endothelialen Systems (RES)^[57].
- Die Stereochemie von Polymeren kann ihr Verhalten im Körper beeinflussen. So zeigt z. B. isotaktische Polyacrylsäure eine höhere antivirale Aktivität als das heterotaktische Polymer^[58]. Poly-D-lysin wird im Gegensatz zu Poly-L-lysin nicht intrazellulär abgebaut^[59].
- Die Technik der Copolymerisation ermöglicht es, die Verteilung von Wirkstoffen entlang der Polymerkette sowie die Lipophilie oder Hydrophilie des Gesamtpolymers oder einzelner Bereiche (Blocksysteme) gezielt zu verändern. Die Eigenschaften der „Mikroumgebung“ in einem Polymerknäuel können sich drastisch von denen der Lösung unterscheiden und werden von der Comonomerzusammensetzung beeinflusst^[60]; die Geschwindigkeit der Abspaltung polymergebundener Wirkstoffe kann auf diese Weise variiert werden^[60].
- Der Einbau spaltbarer Gruppen in die Polymerhauptkette ermöglicht hydrolytischen oder enzymatischen Abbau und damit die langsame Freigabe gebundener oder eingemischter Wirkstoffe (z. B. Chronomere Systeme)^[61].
- Die Abspaltbarkeit eines gebundenen Pharmakons von der Polymerkette kann in weiten Grenzen variiert werden, indem man Länge und Struktur des Spacers geeignet wählt^[62].
- Die Toxizität niedermolekularer Verbindungen kann durch Bindung an eine Polymerkette aufgehoben werden (Verkappung)^[62b,63].
- Die Bindung von Haptenen an synthetische Polymere führt nahezu ausnahmslos zum Ausbleiben der Immunantwort^[64] oder verringert diese stark^[62b] (Haptene sind Moleküle, die eine Immunantwort auslösen, wenn sie an einen hochmolekularen Träger gebunden sind).
- Darüber hinaus ist es denkbar, daß schon Makromoleküle selbst, ohne ein daran gebundenes Pharmakon, pharmakologisch wirksam sind. Dies ist tatsächlich der Fall, wie in Abschnitt 3.3.1 gezeigt wird.

Den Vorteilen, die solche polymerspezifischen Eigenschaften bieten können, stehen gewichtige Nachteile, Bedenken und ungelöste Probleme^[62c] gegenüber:

- Die Bioverträglichkeit wasserlöslicher Polymere ist nur in einzelnen Fällen geprüft worden. Es fehlt an umfassenden Erfahrungen über hämolytische Wirkungen (Tensidwirkung), Pyrogenität, osmotische Eigenschaften und die

Wechselwirkung mit Plasmabestandteilen unter in-vivo-Bedingungen^[62b,65].

- Die Nichtabbaubarkeit synthetischer Polymere führt zwar zu Depoteffekten, ist aber pharmakologisch und toxikologisch bedenklich. Eine dauerhafte Speicherung von Polymeren mit hohem Molekulargewicht im Körper ist unzulässig. Daher kommt der Entwicklung biologisch abbaubarer Polymere besondere Bedeutung zu^[66]; zur Lösung dieses Problems bieten sich aber auch Oligomere und Polymere mit kleinem Molekulargewicht an, die ausgeschieden werden können.
- Über den zeitlichen und örtlichen Verlauf der Körperverteilung von Polymeren gibt es nur wenige systematische Untersuchungen^[54].
- Den möglichen immunologischen Reaktionen auf pharmakologisch aktive Polymere wurde zu wenig Aufmerksamkeit geschenkt^[64b].
- Die bisher untersuchten synthetischen Polymere können nicht aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert werden. Dies schränkt die Wahl geeigneter Arzneiformen ein.

Für die Verwendung polymerer Pharmaka spräche nichts, wenn es sich dabei lediglich um „me-too drugs“^[4] handelte, d. h. um Pharmaka, die nur dasselbe leisten wie andere (niedermolekulare) auch. Es ist deshalb sinnvoll, die Entwicklung pharmakologisch aktiver Polymere vor allem auf Bereiche zu konzentrieren, in denen niedermolekulare Pharmaka bisher versagten oder nur unzureichende therapeutische Erfolge ermöglichten, z. B. bei der Krebs-Chemotherapie. Wenn auch die Erfolge mit Polymeren auf diesem Gebiet bisher als bescheiden bezeichnet werden müssen, so konnte doch gezeigt werden, daß polymere Antitumormittel neue Möglichkeiten bieten, die niedermolekularen Pharmaka nicht offenstehen.

3.2. Wie gelangen Makromoleküle in Zellen?

Neben der Diffusion und dem aktiven Transport gibt es eine weitere Möglichkeit für die Zelle, Stoffe aufzunehmen: die Endocytose^[67] (Pinocytose, Phagocytose). Eine Aufnahme von Polymeren ist im allgemeinen auf diesen letzten Weg beschränkt^[68], der dem Freßvorgang der Amöbe ähnelt.

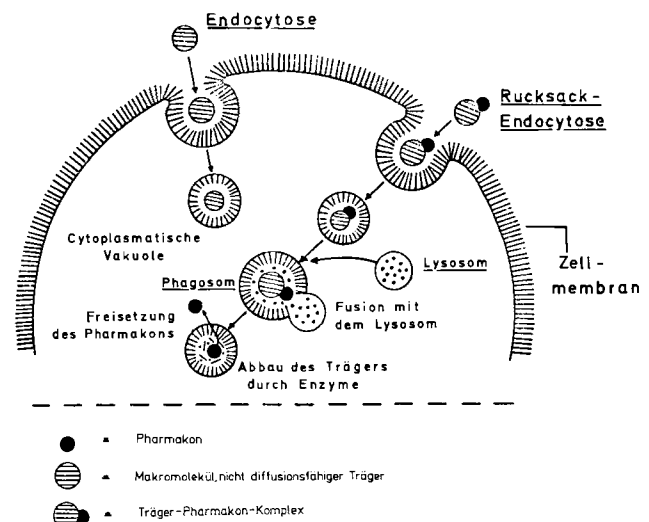
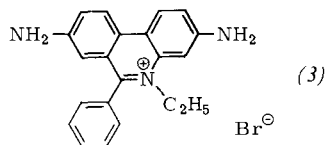


Abb. 3. Schematische Darstellung der Aufnahme von Polymeren in Zellen durch Endocytose und Rucksack-Endocytose.

Der Endocytose von Makromolekülen geht meist eine Adsorption an der Zellmembran voraus. Die Membran stülpt sich dann ein und schnürt sich ab. Die so gebildete cytoplasmatische Vakuole (Phagosom) kann in der Zelle mit einem Lysosom fusionieren, dessen etwa 40 Verdauungsenzyme in acidem Medium dann auf das endocytisierte Makromolekül einwirken. Über den Einfluß von Ladung, Hydrophobie und Molekulargewicht auf die Endocytose sind zahlreiche, zum Teil widersprüchliche Arbeiten erschienen^[69]. Ein spezieller Fall ist die „Rucksack“- oder „piggyback“-Endocytose^[70] (Abb. 3), bei der das Makromolekül ein Pharmakon trägt. Das polymergebundene Pharmakon kann nicht mehr durch Membranen diffundieren. Dies ist eine erste Stufe von Zellspezifität, denn die Aufnahme kann nur in Zellen erfolgen, die zur Endocytose befähigt sind. Da Tumorzellen im allgemeinen eine höhere Endocytoserate als entsprechende Normalzellen aufweisen (vgl. Tabelle 1), erhoffte man sich von Polymeren an sich schon eine gewisse Tumorzellspezifität. Cytostatica, die nicht durch die Membran in die Zelle eindringen können, gelangen durch Endocytose an einen intrazellulären Wirkort (vgl. Abschnitt 3.3.3).

Ein interessantes Beispiel für eine therapeutische Ausnutzung der Rucksack-Endocytose sind Experimente von A. Trouet et al.^[71], die sich mit der Wirkung von Ethidiumbromid (3) auf *Trypanosoma Cruzi* befassen.



In vitro ist (3) für den Parasiten hochtoxisch, in vivo dagegen, z. B. in einer von Parasiten befallenen Maus, nahezu wirkungslos. Abbildung 4 zeigt, warum der Parasit in vivo dem toxischen Ethidiumbromid (3) entgeht und wie man ihn mit der Rucksack-Endocytose schließlich doch angreifen kann: der Parasit gelangt durch Endocytose in die Lysosomen, deren lytischen Enzymen er aufgrund seiner Zellwandstruktur widersteht.

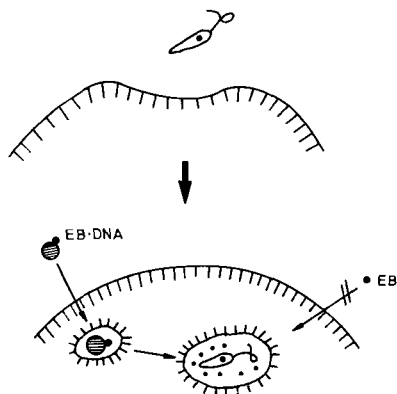


Abb. 4. Schematische Darstellung der Aufnahme des Parasiten *Trypanosoma Cruzi* in die Zelle durch Endocytose und Wirkung eines Ethidiumbromid-DNA-Komplexes (EB-DNA) auf die vom Parasiten befallene Zelle (vgl. [71]).

Während freies Ethidiumbromid (3) nicht in die Zelle eindringen kann, wird es als Komplex mit DNA – vermutlich durch Rucksack-Endocytose – in die Zelle eingeschleust; nach Fusion der wirkstoffhaltigen Vakuole mit einem parasitenhaltigen Lysosom und nach Abbau des DNA-Trägermo-

leküls durch die lysosomalen Enzyme kann (3) im Phagosom seine toxische Wirkung entfalten.

Aus den in Abbildung 5 wiedergegebenen Resultaten^[71] wird deutlich, daß mit *T. cruzi* infizierte Mäuse weit bessere Überlebenschancen hatten, wenn der gegen die Parasiten aktive Wirkstoff (3) nicht als solcher, sondern als Komplex mit DNA verabreicht wurde.

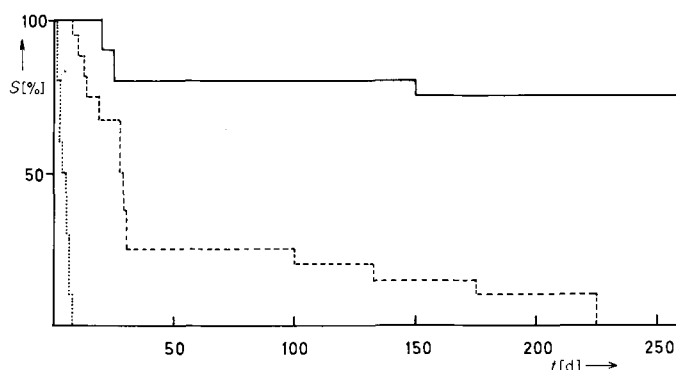


Abb. 5. Überlebenshäufigkeiten von Mäusen, die mit dem Parasiten *Trypanosoma Cruzi* infiziert wurden [71]. Behandlung: Injektionen an den Tagen 2, 3, 4. (·····) unbehandelte Kontrolltiere, (----) 3×0.5 mg Ethidiumbromid (3), (—) 3×0.5 mg Ethidiumbromid-DNA-Komplex, S = Anteil überlebender Tiere, t = Zeit nach i. p. Gabe von *T. Cruzi*.

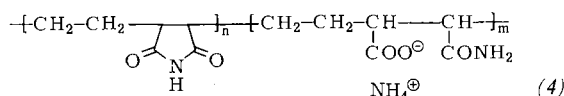
Derartige Systeme, die gezielt durch Endocytose in die Lysosomen eingeschleust werden können, bezeichnen de Duve et al.^[72] als „lysosomotrop“ und diskutieren sie als Träger für Pharmaka.

3.3. Polymere Antitumormittel auf molekularer Basis – ausgewählte Beispiele

Nachdem die Besonderheiten der Aufnahme polymerer Moleküle durch Zellen gezeigt wurden, sollen aus der Fülle der bisher synthetisierten polymeren Antitumormittel lediglich einige Beispiele herausgegriffen werden, um auf die Möglichkeiten und Probleme hinzuweisen.

3.3.1. Synthetische Polymere selbst zeigen eine antitumorale Wirkung

Wie bereits angedeutet (Abschnitt 3.1) fand man, daß synthetische Polymere an sich auf Zellen und Organismen wirken, ohne daß niedermolekulare, aktive Substanzen an sie gebunden sind. So zeigt z. B. Polyacrylsäure antivirale Aktivität, die stark vom Molekulargewicht und der Taktizität abhängig ist^[58]. Ein Copolymer aus Maleinsäureanhydrid und Divinylether (Divema)^[73] wirkt stimulierend auf das Immunsystem und wird als Interferon-Induktor diskutiert^[74]. Eine umfassende Übersicht über anionische polymere Pharmaka ist kürzlich erschienen^[75]. Auch kationische Polymere zeigen antitumorale Wirkung^[76]. Besonderes Interesse fand das statistische Copolymer (4) mit niedrigem Molekulargewicht, das aus Ethylen- und modifizierten Maleinsäureeinheiten besteht^[77].



Bei Ratten mit einem Methylcholanthren-induzierten Blasenkarzinom bewirkte (4) eine Lebensverlängerung und verhinderte nahezu völlig die Entstehung von Lungenmetastasen, wie sie die unbehandelten Kontrolltiere bekamen. Ga-

ben von (4) nach vorheriger operativer Entfernung des Tumors hielt die Tiere nicht nur metastasenfrei, sondern verhinderte das Wiederauftreten des Tumors nach der Operation völlig, wenn das Polymer im Abstand von sechs Wochen wiederholt appliziert wurde (Abb. 6)^[77].

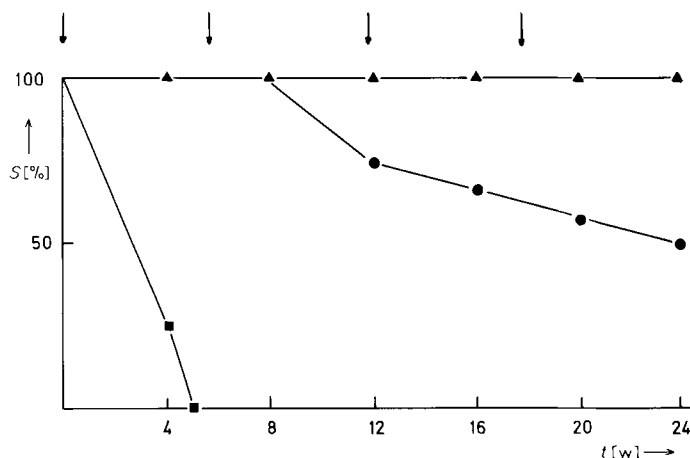


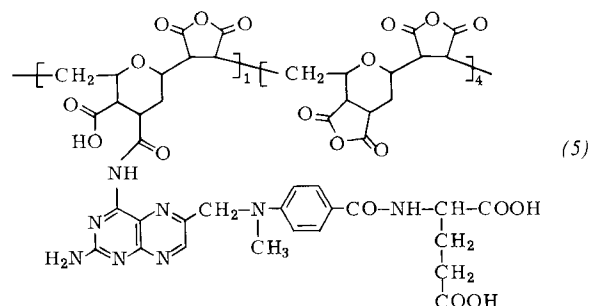
Abb. 6. Überlebenshäufigkeiten von Ratten nach operativer Entfernung eines primären Blasenkarzinoms und anschließender Behandlung mit dem Copolymer (4). (■-■) Unbehandelte Kontrolltiere, Tod durch Auftreten von Lungenmetastasen, (●-●) einmalige Gabe von (4) (Tag 1), Wiederauftreten des lokalen Tumors, (▲-▲) viermalige Applikation von (4) im Abstand von sechs Wochen (siehe Pfeile). S: Anteil überlebender Tiere, t: Zeit nach Entfernen des Primärtumors.

(4) verstärkt die Immunantwort der Tiere gegen den Tumor; dieser Effekt beruht auf einer Stimulierung der Antikörper-produzierenden Zellen (B-Zellen). Dabei ist die Substanz atoxisch und wirkt selbst nicht immunogen. Nach ersten Versuchen an Patienten^[78], die an Tumoren im Gastrointestinalbereich litten, ist das Copolymer (4) auch für Menschen atoxisch; die Ergebnisse deuten auf erhöhte Überlebensdauer hin. Über ein weiteres Copolymer, das ebenfalls antitumoral wirksam ist, ohne selbst cytotoxisch zu sein, wurde kürzlich berichtet^[79].

Die Idee, mit geeigneten immunstimulierenden Polymeren die Eigenabwehr des Körpers zu stärken, ist damit wiederum bestätigt worden.

3.3.2. Fixierung von Methotrexat an ein immunstimulierendes Trägerpolymer

Aufgrund seines immunmodulierenden Effekts (z. B. Aktivierung von Makrophagen) wurde das Cyclo-Copolymer aus Divinylether und Maleinsäureanhydrid (Divema) als Träger zur Fixierung des Folsäure-Antagonisten Methotrexat (MTX) verwendet. MTX ist ein klinisch oft genutztes Cytostaticum, dessen immunsuppressive Wirkung häufig zu therapeutischen Problemen führt. Das Polymer Divema-MTX (5)^[80], in dem die Pteridinygruppe kovalent gebunden ist,



wurde in seiner Wirkung auf das Makrophagensystem (Makrophagen sind die „Fresszellen“ des Immunsystems) getestet und mit Divema selbst verglichen. Das Polymer zeigte einen deutlich stimulierenden Effekt, der allerdings etwas geringer als bei reinem Divema war^[81].

Trotz der relativ hohen Labilität der Bindung zwischen dem Polymergerüst und den Pteridinygruppen hatte das Divema-MTX-Copolymer (5) im Tierversuch (z. B. L1210-Leukämie der Maus) eine höhere Antitumorwirkung als MTX, was eventuell auf verzögerte Freisetzung und längere Zirkulation von MTX zurückzuführen ist (Abb. 7)^[82].

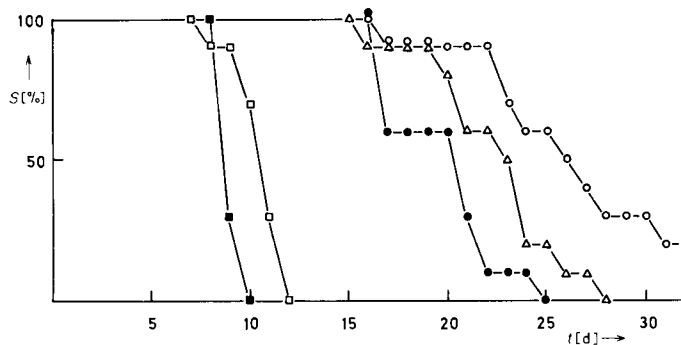


Abb. 7. Überlebenshäufigkeiten von CDF₁-Mäusen (männlich) nach i.p. Gabe von 10⁵ L1210-Tumorzellen und anschließender Behandlung mit polymerfixiertem Methotrexat (5) an den Tagen 1, 5, 9, 13, 17 [82]. (■-■) Unbehandelte Kontrolltiere, (□-□) Behandlung mit Divema (80 mg/kg Körpergewicht), (●-●) Behandlung mit Divema + Methotrexat (MTX) (29 + 10 mg/kg Körpergewicht), (▲-▲) Behandlung mit MTX (20 mg/kg Körpergewicht, optimale Dosis), (○-○) Behandlung mit Divema-MTX (5), (31 mg/kg Körpergewicht ≅ 8 mg MTX pro kg Körpergewicht). S: Anteil überlebender Tiere, t: Zeit nach Tumorumplantation.

Ein Effekt der Polymerfixierung ist ein starker Anstieg der Toxizität von Divema-MTX im Bereich therapeutischer Dosierung. Vermutlich beruht dies auf der Aufnahme des Polymers in die Makrophagen, wo nach Abspaltung freies MTX toxisch wirkt. Der in vitro inhibierende Effekt von Divema-MTX (5) auf Tetrahydrofolsäure-Dehydrogenase wurde außerdem an Tumorzellen (Murine L5178 Y) untersucht^[83] und deutet ebenfalls auf eine rasche Abspaltung des Cytostaticums vom Trägerpolymer hin.

3.3.3. Kombination eines lysosomotropen Trägerpolymers mit Methotrexat

Ein weiteres Problem bei der Verwendung von MTX als Antitumormittel ist, neben seiner immunsuppressiven Wirkung, die entstehende Resistenz von Tumorzellen gegen MTX. Sie wird auf das Fehlen eines entsprechenden Transportsystems zurückgeführt^[84]. Ryser und Shen^[84] konnten zeigen, daß kovalent an Poly-D- und Poly-L-lysin gebundenes MTX in resistente Zellen ebenso gut aufgenommen wird wie in nicht resistente Zellen; die Aufnahme in resistente Zellen ist (bei einem Molekulargewicht des Polymers von 60000–70000) um den Faktor 200 größer als bei Methotrexat selbst. Eine das Zellwachstum hemmende Wirkung tritt aber nur auf, wenn das Trägerpolymer aus L-Lysin-Einheiten aufgebaut ist (Abb. 8)^[84].

Die Autoren wiesen nach, daß dieses Polymer im Gegensatz zum Poly-D-lysin-MTX intrazellulär abgebaut wird. Da polymergebundenes MTX die Dihydrofolsäure-Reduktase nur schwach hemmt, ist dieser enzymatische Abbau die Voraussetzung für die Hemmung des Zellwachstums.

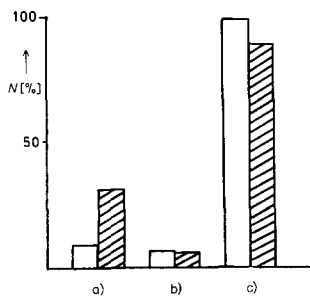
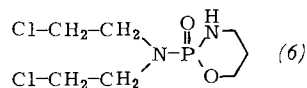


Abb. 8. Wachstumshemmung von CHO-Zellen („Chinese hamster ovary“-Zellen) nach Gabe von 10^{-6} mol MTX [84] als: a) niedermolekulares MTX, b) Poly-L-lysin-MTX, MW 70000 und c) Poly-D-lysin-MTX, MW 60000. Offen: nicht resistenter Zellstamm, schraffiert: MTX-resistenter Zellstamm, N: Anteil der Zellen nach 4 d bezogen auf unbehandelte Kontrollkultur.

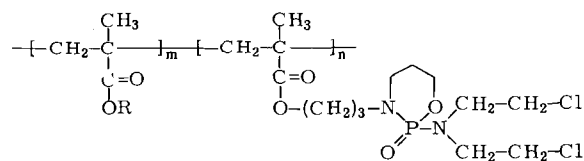
Das MTX-Polylysin-Konjugat ist also ein lysosomotropes System (vgl. Abschnitt 3.2), das erst in den sekundären Lysosomen (Phagosomen) aktiviert wird. Die Resistenz von Tumorzellen gegen MTX kann so überwunden werden. Die Autoren vermuten darüber hinaus, daß aufgrund der höheren Aktivität von proteolytischen lysosomalen Enzymen in einigen soliden Tumoren (vgl. Tabelle 1) eine gewisse Tumorzellspezifität erreicht werden kann. Dies ist ein gutes Beispiel für den Einfluß der Stereochemie der Polymerhauptkette auf die Wirkung derartiger polymerer Pharmaka.

3.3.4. Eine Sackgasse und was man daraus lernen kann

Eines der bekanntesten Antitumormittel ist 2-[Bis(2-chlor-ethyl)amino]-1,3,2-oxazaphosphorinan-2-oxid (Cyclophosphamid, Cytoxan) (6)^[85], das als die atoxische metabolische Vorstufe des wirksamen, offenkettigen *N,N*-Bis(2-chlor-ethyl)phosphorsäurediamids („Friedman-Säure“) (10) betrachtet werden kann^[27].



Im Sinne des oben beschriebenen Modells (Abb. 2) wurden unter anderem polymere Derivate des Cyclophosphamids (CP) vom Typ (7) hergestellt^[86].



(7a), R = $-(\text{CH}_2)_2\text{-SO-CH}_3$; (7b), R = $-(\text{CH}_2)_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{ Cl}^-$

Diese Verbindungen haben sich im Tierversuch nur als schwach wirksam oder unwirksam erwiesen. Dies wird verständlich, wenn man den Metabolismus von Cyclophosphamid (6) betrachtet (Abb. 9).

Durch Untersuchungen über den Transport- und Wirkform-Mechanismus von Cyclophosphamid haben Hohorst und Brock^[87] sowie Connors et al.^[88] gezeigt, daß (6) durch Enzyme bevorzugt in der Leber zu (8) hydroxyliert wird, das dann unter Acrolein-Abspaltung in die Friedman-Säure (10) zerfällt.

Während (6) in Tumorzellkulturen wegen des Fehlens metabolisierender Enzyme inaktiv ist, wirkt es im Tierversuch

nach der Oxidation zum labilen 4-Hydroxycyclophosphamid (8) stark zelltoxisch. Dementsprechend ist (8) als der primäre Metabolit nicht nur in vivo, sondern auch in vitro die aktive Substanz.

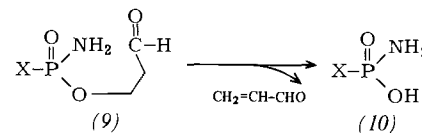
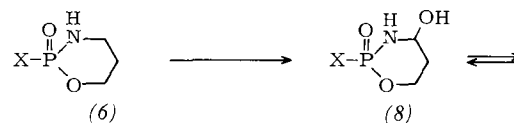
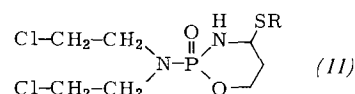


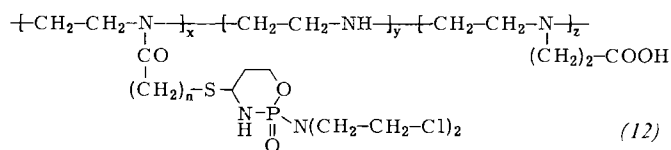
Abb. 9. Metabolische Aktivierung von Cyclophosphamid (6) im Organismus durch Hydroxylierung und Acroleinabspaltung.

Die Polymere (7) enthalten kovalent gebundenes Cyclophosphamid, das nach einem möglichen Transport des Polymer in die Tumorzellen und eventueller Abspaltung dort unwirksam ist und erst wieder den Weg über die Leber gehen müßte, um die wirksame Spezies (10) freizusetzen. Insofern ist verständlich, daß die Polymere (7) fast unwirksam sind.

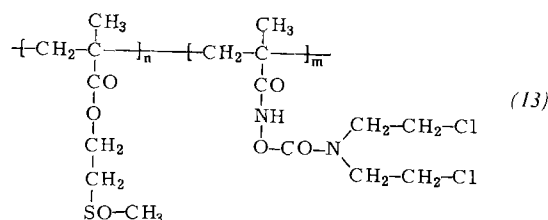
Die kovalente Bindung eines Antitumormittels an einen Polymerträger muß demnach so beschaffen sein, daß eine am Ort wirksame Spezies abgespalten werden kann. Nachdem Takamizawa^[89] einen Weg zur Synthese des aktivierten, labilen Metaboliten (8) gefunden hatte, konnten Hohorst et al.^[90] stabilisierte, zum aktiven Metaboliten spaltbare Verbindungen des Typs (11) herstellen.



Damit war es möglich, über Derivate mit reaktiven Gruppen, z. B. R = $-(\text{CH}_2)_n\text{-COOH}$ oder $-(\text{CH}_2)_n\text{-OH}$ ^[91], den aktiven Metaboliten in seiner stabilen Form an Polymere, z. B. modifiziertes Polyethylenimin, zu binden. Die Poly-



mere (12) können nach Transport in die Tumorzellen und Abspaltung des aktiven Metaboliten (8) direkt zelltoxisch wirken. Die niedermolekularen Verbindungen (11) sind ausnahmslos in ihrer Wirksamkeit mit Cyclophosphamid vergleichbar^[91c]. Bei Verwendung von Divema als Trägerpolymer nimmt die Antitumoraktivität ab^[91c]. Die Polymere vom Typ (12) werden gegenwärtig untersucht.



Aufgrund ähnlicher Überlegungen untersuchte man polymere Derivate des Bis(2-chlorethyl)amins (N-Lost). Als Amid fixiert ist dieses hochtoxische Cytostaticum inaktiv, so daß für die Polymerfixierung labile Strukturen (*O*-Acylhydroxamsäuren, Urethane), z. B. (13), verwendet wurden^[92].

Nach ersten Ergebnissen sind die Verbindungen in vitro wirksam^[92].

Diese beiden Beispiele zeigen die Bedeutung der Spaltbarkeit der Polymer-Pharmakon-Bindung^[62] und der Freisetzung direkt zelltoxischer, d. h. nicht erst metabolisch zu aktivierender Komponenten bei Verwendung von Polymeren als Carrier.

3.3.5. Affinitätschemotherapie – ein Versuch, ein polymergebundenes Antitumormittel gezielt zum Tumor zu lenken

Als letztes Beispiel für polymere Antitumormittel auf molekularer Basis sei ein System genannt, das auch den im Modell (Abb. 2) als „homing device“ bezeichneten Bereich einbezieht.

Tierische Zellen tragen als Erkennungsmerkmal an ihrer Oberfläche spezifische Proteine (Oberflächenantigene), die für zahlreiche biologische Prozesse (Zell-Zell-Erkennung, Immunantwort, Zelldifferenzierung) mitbestimmend sind. Wenn es gelingt, gegen ein bestimmtes Zielgewebe (genauer: gegen die Oberflächenantigene der Zellen dieses Gewebes) Antikörper zu erzeugen, so sollten diese Antikörper das Zielgewebe spezifisch erkennen. Es lag also nahe, einen solchen Antikörper mit Antitumormitteln zu beladen und als spezifisches Transportsystem zu Zellen zu verwenden.

Dieses Prinzip der Affinitätschemotherapie, bereits 1906 von Paul Ehrlich vorgeschlagen^[3] und unter anderem von Wilchek et al. weiterentwickelt^[93], ist in Abbildung 10 schematisch dargestellt.

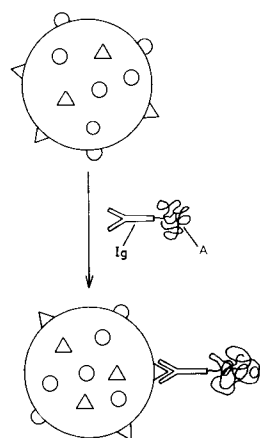


Abb. 10. Schematische Darstellung der Affinitätschemotherapie am Beispiel einer Tumorzelle. A: Polymeres Antitumormittel; Ig: Immunglobulin, Δ : tumorspezifische Antigene, \circ : Antigene der Normalzelle.

Abgesehen von Problemen bei der Präparation und Isolierung reiner tumorspezifischer Antikörper besteht eine entscheidende Schwierigkeit darin, die optimale Konzentration an Antitumormittel an den Antikörper zu binden. Ist die Beladung zu gering, so wird zwar die Tumorzelle erkannt, die Antitumorstoffwirkung ist jedoch unzureichend oder nicht vorhanden. Ist die Beladung zu hoch, wie schematisch in Abbildung 11a angedeutet, wird die Antigen-Antikörper-Erkennung durch Blockierung der Bindungsstellen unmöglich.

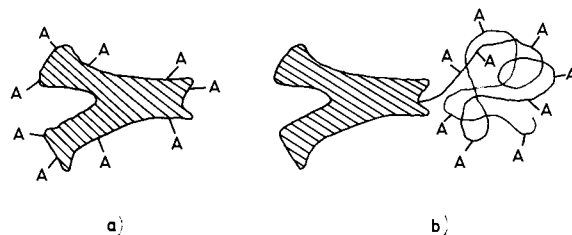


Abb. 11. Schematische Darstellung der Bindung eines Antitumormittels (A) an einen Antikörper. a) Direkte Bindung von Antitumormittel an das Immunglobulin, b) Bindung eines mit Antitumormittel beladenen Polymers an das Immunglobulin.

Bindet man im Sinn des Modells (Abb. 2) das Antitumormittel an ein Polymer, das den Antikörper als Transportgruppe („homing device“) gebunden enthält (Abb. 11b) und nicht mit diesem mischbar ist, so kann man erwarten, daß eine Blockierung der Bindungsstellen des Antikörpers vermieden wird. Ein entsprechendes System synthetisierten z. B. Rowland, O'Neill und Davies (Abb. 12)^[94].

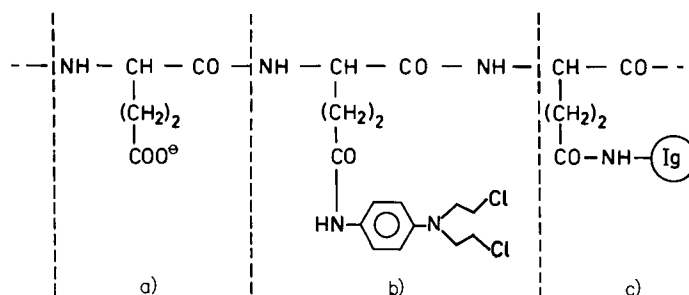


Abb. 12. Polymeres, tumorspezifisches, alkylierendes Antitumormittel (vgl. Abb. 2 und 13). a) Löslichkeitsvermittler, Polyglutaminsäure (PGA), b) Pharmakon, *p*-Phenylendiamin-Lost (PDM), c) „homing device“, Immunglobulin (Ig).

Polyglutaminsäure (PGA) dient hier als makromolekularer Träger. Die Carboxylatgruppen der Glutaminsäure (a) sind Löslichkeitsvermittler im Sinne des Modells. Als Cytostaticum ist *p*-Phenylendiamin-Lost (PDM) durch eine Amidbindung (b) gebunden. Als homing device (c) wurden Proteine aus dem Serum von Kaninchen verwendet, die mit Lymphom-Tumorzellen „geimpft“ worden waren und tumorspezifische Antikörper gebildet hatten. In vivo erwies sich dieses System gegen ein EL-4-Maus-Lymphom den entsprechenden Kontrollsystemen überlegen. Keines der Tiere, die mit dem Terpolymer behandelt wurden, starb innerhalb von 60 d nach der Transplantation des Tumors (Abb. 13).

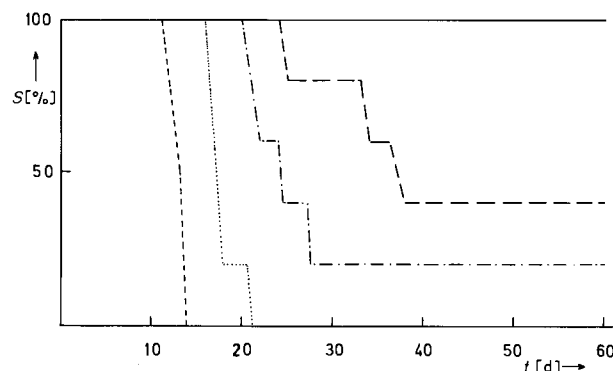


Abb. 13. Überlebenshäufigkeiten von Mäusen mit EL-4-Lymphom nach Behandlung mit polymeren Antitumormitteln (vgl. Abb. 12) [94]. (----) Unbehandelte Kontrolltiere, (····) 4 mg Ig, (— · — ·) 750 µg PGA-PDM, (—) 4 mg Ig + 750 µg PGA-PDM, (—) PGA-PDM-Ig (≅ 4 mg Ig und 750 µg PGA-PDM), S: Anteil überlebender Tiere; t: Zeit nach Tumorumplantation.

Die Autoren schließen aus den Kontrollversuchen, daß wirklich ein Carriereffekt und nicht eine synergistische, auf bloßer Kombination von freiem Immunglobulin (Ig) und Lost-Polymer beruhende Wirkung vorliegt. In einem späteren Bericht über ein analoges System mit Dextran als Trägerpolymer kann Rowland die Möglichkeit synergistischer Effekte nicht ganz ausschließen^[95]. Das Konzept der Affinitätschemotherapie läßt für die Tumorforschung brauchbare Ergebnisse erwarten^[20, 96]. Die positiven Resultate, die mit der Affinitätschemotherapie im Tierversuch erzielt wurden, rechtfertigen es, das Konzept eines gezielten Transportes polymerer Antitumormittel durch ein „homing device“ weiter zu verfolgen.

3.4. Aus der Forschung in die Praxis?

Ein unvoreingenommener Leser mag aus den fünf Beispielen des Abschnitts 3.3 den Schluß ziehen, daß polymere Antitumormittel auf molekularer Basis bald klinische Verwendung in der Chemotherapie finden werden oder schon gefunden haben. Dies ist nicht der Fall, nicht zuletzt aufgrund der in Abschnitt 3.1 diskutierten Probleme.

Was wurde erreicht? Es wurden Konzepte für pharmakologisch aktive Polymere entwickelt und zahlreiche Substanzen synthetisiert. Die Grundüberlegungen und die Variationsbreite im strukturellen Bereich haben ein weites Feld eröffnet, das nun systematischer als bisher und in verstärkter interdisziplinärer Zusammenarbeit bearbeitet werden muß. Wie immer folgt auf die Idee und den Nachweis, daß „es im Prinzip geht“, die Phase der mühsamen Anpassung und Optimierung auf das biologische Zielsystem hin. Die Kenntnisse über Tumorzellen und über die Wechselwirkungen des Organismus mit polymeren Pharmaka müssen dazu gründlich vertieft werden.

Auch bei der Übertragung der Ergebnisse von Tierversuchen in den Humanbereich ist Vorsicht geboten^[97]. Nicht alle Stoffe, die bei Tieren aktiv sind, haben sich auch bei Menschen als wirksam erwiesen. Zum Beispiel darf über den beeindruckenden „Überlebenskurven“ in Abbildung 13 nicht vergessen werden, daß für die Affinitätschemotherapie bei Krebs-Patienten vor allem das Auffinden und Isolieren tumorspezifischer Antikörper des Menschen ein noch nicht gelöstes Problem ist. Die jüngsten Fortschritte der Membranbiologie, Immunologie und Gentechnologie (Erzeugung monoklonaler Antikörper) lassen hier hoffen.

4. Polymere Antitumormittel auf zellulärer Basis?

4.1. Läßt sich die Immunantwort gegen Tumorzellen simulieren?

Beim Übergang von einer normalen in eine maligne Zelle (Carcinogenese) ändert sich besonders stark die Biomembran (vgl. Tabelle 1). Viele der Signale, die Zellwachstum, Zellteilung und Zellaufnahme kontrollieren, gehen von der Membran aus. Es ist daher verständlich, daß geringe Veränderungen in der Zelloberfläche tiefgreifende Einflüsse auf das Zellverhalten haben. In diesen Zusammenhang gehören auch die membranassoziierten Antigene^[98]; sie gaben den Anstoß zu Überlegungen, dem Tumorproblem auf immunologischem Weg beizukommen.

4.1.1. Tod einer Tumorzelle

Obwohl Tumorzellen normalerweise dem Immunsystem entkommen, ist es eindrucksvoll zu sehen, was geschieht, wenn es ihnen nicht gelingt, die Immunabwehr des Körpers zu unterlaufen. Abbildung 14^[99] demonstriert dies am Tod einer Tumorzelle, einem Prozeß, der sich auf zellulärer Basis abspielt und von dem es zu lernen gilt, wenn man Antitumormittel auf eben dieser zellulären Basis diskutieren will.

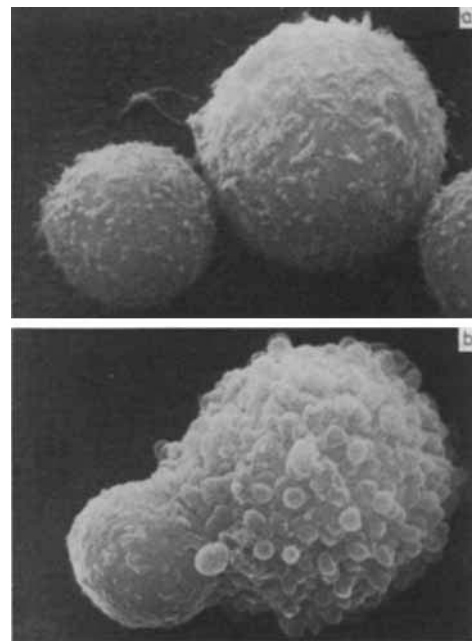


Abb. 14. Elektronenmikroskopische Aufnahme des Angriffs eines T-Lymphocyten auf eine Tumorzelle [99]. a) Die Tumorzelle (rechts) hat Antigene auf ihrer Oberfläche, die vom aktivierten Lymphocyten (kleinere Zelle links) durch Antikörper in dessen Membran selektiv erkannt werden; b) Tod einer Tumorzelle. Die Zerstörung der Tumorzelle durch den Lymphocyten erfolgt nach Destabilisierung der Membran unter Bildung von Ausstülpungen („bubbles“).

Die beiden Bilder (Abb. 14) zeigen die Abfolge des Angriffs eines T-Lymphocyten auf eine maligne Zelle. Die tumorzellassoziierten Antigene werden vom angreifenden Lymphocyten erkannt. Dies entspricht im Prinzip der in Abschnitt 3.3.5 beschriebenen Affinitätschemotherapie, jedoch in diesem Fall auf zellulärer Basis. Die anschließende Zerstörung der Tumorzelle ist kein molekularer Vorgang im Sinne der in der Einleitung gegebenen Definition, sondern beruht auf einer Zerstörung der Tumorzellmembran nach dem Kontakt des T-Lymphocyten mit der Tumorzelle unter Bildung blasenförmiger vesikulärer Strukturen. Der Mechanismus der Zellzerstörung durch Membrandestabilisierung ist im einzelnen noch nicht geklärt; es werden zumindest drei Möglichkeiten diskutiert: lokal hohe Bildung von Lysophospholipiden^[100], Freisetzung membranzerstörender, d. h. zelltoxischer Substanzen durch den Lymphocyten^[101] oder spontane Membrandestabilisierung durch Protein-Konformationsänderungen^[102].

Nach allen Hypothesen ist die Zerstörung rein physikalischer Natur. Obwohl dies noch nicht bewiesen ist, gibt es eine Reihe von Hinweisen darauf. So destabilisiert allein eine Adsorption von Liposomen (geschlossene kugelförmige Membrangebilde) an eine Zelle deren Membranen so weit, daß aus dem Liposom niedermolekulare Stoffe in die Zelle eindringen können^[103]. Eine Zellfusion, die eine starke De-

stabilisierung der Membran voraussetzt, kann auf verschiedene Weise induziert werden: biologisch, beispielsweise mit Hilfe des Sendai-Virus^[104], chemisch, z. B. durch Anwesenheit von Calcium-Ionen^[105] oder durch Einbringen von Lysophospholipiden^[100] in eine Membran, aber auch rein physikalisch durch Anlegen eines elektrischen Feldes^[106].

Angesichts dieses eindrucksvollen Bildes vom Tod einer Tumorzelle muß man fragen, ob Antitumormittel auf zellulärer Basis vorstellbar sind, die eventuell imstande wären, einen solchen Prozeß wirkungsvoll nachzuahmen.

Ein möglicher Ansatz zur Lösung des Problems wäre, die Wechselwirkung einer Tumorzelle mit einem synthetischen Vesikel auszunutzen, das die folgenden Voraussetzungen mitbringen müßte:

1. die Möglichkeit der zellspezifischen Erkennung
2. die Fähigkeit zur Destabilisierung von Tumorzellmembranen
3. eine der Tumorzelle vergleichbare oder überlegene Membranstabilität

Nach den bisher beschriebenen Arbeiten zur Verwendung von Liposomen in der Medizin sind alle drei Probleme noch ungelöst. So wird in Versuchen zur Wechselwirkung von Tumorzellen mit Liposomen aus natürlichen oder synthetischen Phospholipiden im Gegensatz zu dem Beispiel in Abbildung 13 nicht die maligne Zelle, sondern in allen Fällen das angreifende Vesikel zerstört: Es wird fusioniert, endocytiert, oder seine Membran wird destabilisiert^[107]; dies entspricht nicht den Erwartungen an ein Antitumormittel auf zellulärer Basis. Noch schlechter sieht es bei der zellspezifischen Erkennung (vgl. Abschnitt 4.3.3) und besonders der Destabilisierung von Tumorzellmembranen (vgl. Abschnitt 4.3.4) aus. Membranzerstörende Substanzen würden natürlich auch die Membranen der bisher gebräuchlichen Liposomen destabilisieren.

Essentiell ist daher zunächst die Erhöhung der Stabilität synthetischer Liposomen, ein Problem, das unter den drei genannten Forderungen zur Zerstörung von Tumorzellen auf zellulärer Basis noch am leichtesten lösbar erscheint. Darüber hinaus sind allerdings stabilisierte Liposomen als Zellmodelle von Interesse, z. B. zur Untersuchung der Zellerkennung^[108], der Zell-Zell-Wechselwirkung^[109] etc. Auch für die Verwendung von Liposomen als Carrier für Pharmaka ist das Problem der Stabilität mitentscheidend. Die bisher verwendeten Liposomen haben im Kontakt mit Blutplasma eine relativ hohe Permeabilität für eingeschlossene Pharmaka, weil sie durch Adsorption von Proteinen destabilisiert und durch Lipasen zerstört werden^[110]. Im folgenden werden Überlegungen und Versuche zur Herstellung von Modellen für Biomembranen und Zellen erhöhter und variabler Stabilität beschrieben.

4.1.2. Die Natur baut stabile Membranen. Kann der Chemiker das auch?

Membranen enthalten nach dem bekannten Modell von Singer und Nicolson (Abb. 15) Lipide, die eine Doppelschicht bilden, und Proteine, z. B. Enzyme, die in dieser Lipidmatrix „schwimmen“^[111].

Diese anschauliche Darstellung ist allerdings sehr vereinfacht. Das geht bereits daraus hervor, daß Zellen weitaus höhere Stabilitäten aufweisen, als sich durch eine Lipid-Dop-

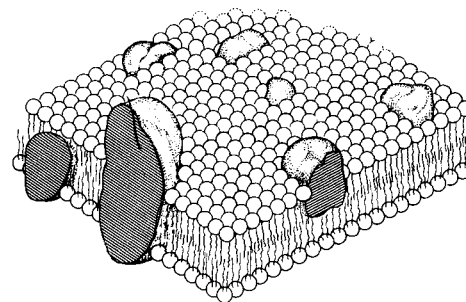


Abb. 15. „Fluid-mosaic-Modell“ der biologischen Membran nach Singer und Nicolson [111].

pelschicht allein erzielen ließe, die ja auch in den relativ instabilen Vesikeln aus Phospholipiden vorliegt; manche Biomembranen bestehen überdies nur zu 25% aus Lipiden^[112]. Die Natur findet also Mittel und Wege, um Membranen hoher Stabilität zu erzeugen. Zwei dieser Möglichkeiten sollen hier kurz betrachtet werden:

1. Neben den „integralen“ Membran-Proteinen, die in den hydrophoben Teil der Membran eingebettet sind, gibt es auch „periphere“ Proteine, die sich nur im hydrophilen Teil der Membran befinden. Ein Teil dieser peripheren Proteine ist mit mehreren integralen Proteinen assoziiert und dient als Stützgerüst. Als Beispiel sei auf das Spectrin an der Innenseite der Erythrocytenmembran^[113] hingewiesen.
2. Im Falle der „coated vesicles“^[114] befinden sich im Zellinneren Phospholipid-Liposomen, die von einem Polypeptid umhüllt sind und damit einem Fußball im Netz ähneln. Man kann sich auch hier vorstellen, daß das Peptidgerüst zur Stabilität des Vesikels beiträgt.
Eine andere Form der Gerüstbildung an der Außenseite einer Membran repräsentiert die Zellwand von Bakterien^[115]. Auch hier bilden Makromoleküle, in diesem Fall aus Polysacchariden mit Quervernetzung durch Oligopeptide, einen stabilen, netzartigen Membranüberzug. Bezeichnend ist, daß diese extreme Stabilisierung durch ein äußeres Stützgerüst häufig gerade bei Bakterien vorkommt, die als Parasiten in einem fremden Gewebe besonders widerstandsfähig sein müssen.

Wie kann man nun die Stabilisierung von Biomembranen simulieren? Da zur Zeit noch nicht einmal alle Wechselwirkungen zwischen integralen und peripheren Proteinen bekannt sind, ist der Versuch, ein stützendes Gerüst analog den Spectrinen zu imitieren, sicher noch indiskutabel. Eine Erhöhung der Stabilität durch umhüllende Polymere wie bei einer Bakterienmembran klingt zwar realistischer und wurde im Prinzip zur Immobilisierung lebender Zellen schon angewendet, unterbindet allerdings den Kontakt – und damit die Wechselwirkung – zwischen benachbarten Zellen^[116].

Chemisch am einfachsten realisierbar erscheint es, die Membranlipide selbst in die Stabilisierungsreaktion einzubeziehen. Eine Möglichkeit hierzu teilten Khorana et al. schon mit^[117]. Sie bauten Lipide mit photoreaktiven Gruppen in eine Membran ein und konnten durch Bestrahlung Proteine kovalent mit diesen Lipiden verknüpfen. Eine andere Möglichkeit mit größerer Anwendungsbreite besteht in der Polymerisation von Lipiden, die eine polymerisierbare Gruppierung enthalten.

Bevor im nächsten Abschnitt derartige Systeme vorgestellt werden, sei kurz auf Modelle eingegangen, an denen Membraneigenschaften untersucht werden können.

4.1.3. Membranmodelle

Um Lipide und Tenside auf ihre Tauglichkeit zur Bildung von Biomembranen zu prüfen, reicht die Kenntnis ihrer Eigenschaften als Reinsubstanz nicht aus. Ihre Wechselwirkung mit einer wässrigen Phase führt zu völlig anderen Eigenschaften, die mit Begriffen wie amphiphiles Verhalten, Micell- und Liposomenbildung sowie lyotrope Phasen beschrieben werden können^[118]. Lipide ordnen sich in wässriger Phase spontan zu membranähnlichen Strukturen. Die drei am häufigsten verwendeten Membranmodelle sind Monoschichten^[119], bimolekulare Lipidmembranen (BLM)^[120] und Liposomen^[121] (Abb. 16)^[122].

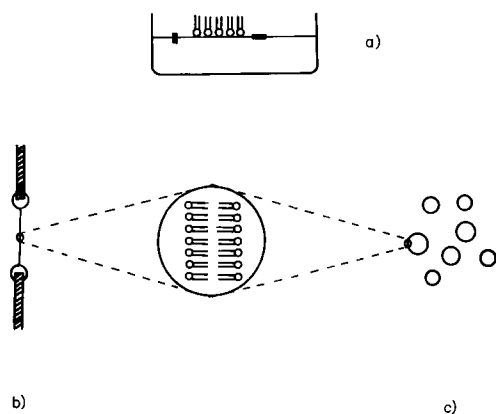


Abb. 16. Orientierung amphiphiler Substanzen in Modellmembranen: a) Monoschicht, b) bimolekulare Lipidmembran (BLM), c) Liposomen. Zwischen b) und c) ist ein Querschnitt durch die BLM- oder Liposomenwand zu sehen.

Nach allen drei Modellen ordnen sich amphiphile Lipide spontan zu einer Struktur, die der von Phospholipidschichten in einer biologischen Membran ähnelt. Diese Membranmodelle gestatten Messungen physikalischer Eigenschaften an geordneten Systemen, wie sie in dieser Vielfalt an den weit komplexeren natürlichen Membranen nicht möglich sind. Eine anschauliche Gegenüberstellung und ausführliche Diskussion dieser Modelle gibt Noell^[122].

4.2. Modelle polymerer Membranen

4.2.1. Polymerisierbare Lipidsysteme

Den Hauptanteil der Lipide in einer Membran stellen Phospholipide. Abbildung 17 zeigt die Struktur typischer amphiphiler Systeme mit hydrophoben Alkylketten und hydrophiler Kopfgruppe.

Will man polymerisierbare Lipide zur Herstellung stabiler Modelle für Biomembranen synthetisieren, so kann die polymerisierbare Gruppe rein formal in die hydrophile Kopfgruppe oder in die hydrophobe Alkylkette eingeführt werden (Abb. 18)^[123].

Nach allen vier Prinzipien in Abbildung 18 entstehen Systeme, bei denen nicht alle Eigenschaften von Zellmembranen erhalten bleiben. Die Methoden a)–c) lassen zwar die Kopfgruppen unbeeinflusst, so daß physikalische Eigenschaften wie Ladung, Ladungsdichte etc. gleich bleiben, verändern aber die für biologische Systeme sehr wichtige Flui-

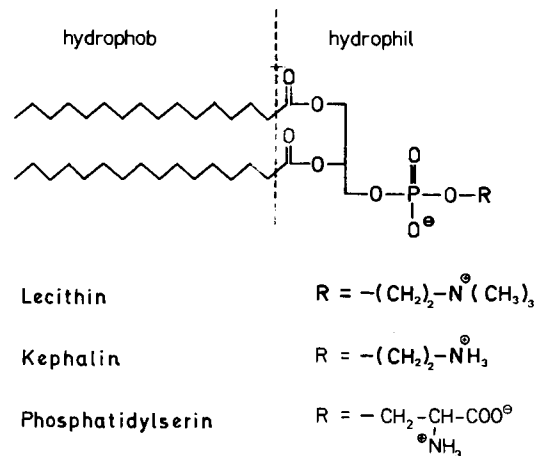


Abb. 17. Struktur der in Biomembranen am häufigsten vorkommenden Phospholipide.

dität der hydrophoben Ketten. Im Fall d) bleibt diese zwar weitgehend unverändert, doch muß man in der Wahl der Kopfgruppen Einschränkungen hinnehmen. Allen polymeri-

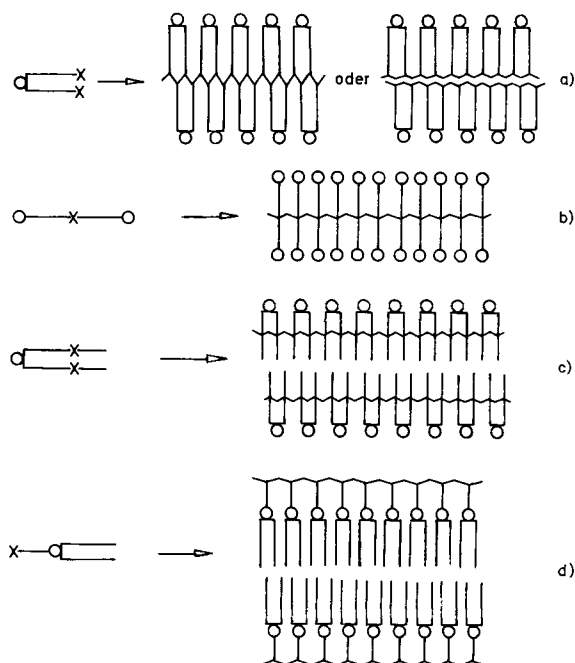


Abb. 18. Möglichkeiten zur Herstellung polymerer Modellmembranen [123] (x = polymerisierbare Gruppe). a)–c) Polymerisation unter Erhaltung der Kopfgruppeneigenschaften, d) Polymerisation unter Erhaltung der Kettenbeweglichkeit. Beispiele für Monomere siehe Tabelle 2.

sierten Lipidsystemen gleich sind die stark erhöhte Viskosität und die verringerte laterale Beweglichkeit der einzelnen Moleküle.

Alle vier in Abbildung 18 gezeigten Möglichkeiten zum Aufbau polymerisierbarer Lipide wurden bereits realisiert^[123]. Es ist dabei durchaus nicht nötig, zum Aufbau von Modellen für Biomembranen die relativ komplizierten Phospholipide herzustellen: "One need not attempt to reproduce Mother Nature slavishly" (Fendler)^[124]. Kunitake^[125] zeigte bereits 1977, daß auch einfach gebaute Moleküle wie Dialkylphosphat-Salze oder Dialkyldimethylammonium-Salze Liposomen bilden können. Fuhrhop^[126] und Kunitake^[127] konnten außerdem Liposomen aus Molekülen herstellen, bei denen zwei hydrophile Kopfgruppen durch eine Kette verbunden sind (vgl. Tabelle 2, Typ b). Als polymerisier-

während (27) lediglich einen expandierten Film zeigt, bildet (28) neben einer flüssig-analogen eine fest-analoge Phase. (29) liegt nur in einer kondensierten Phase vor. – Das Schub-Flächen-Verhalten natürlicher Phospholipide und synthetischer Lipide ist ausführlich beschrieben worden^[138, 144].

Über die Charakterisierung von Lipiden in Monoschichten hinaus zeigen zahlreiche Arbeiten die Verwendbarkeit

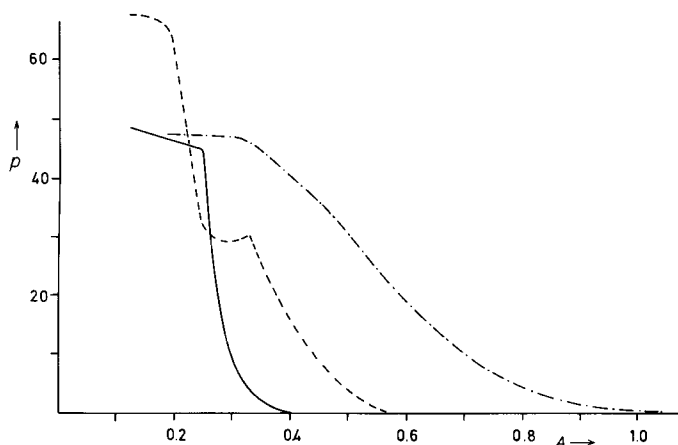


Abb. 20. Einfluß der Kopfgruppe der Lysophospholipid-Analoga (27)–(29) auf das Verhalten in Monoschicht [137]. Schub-Flächen-Diagramme von (27) (---); (28) (- - - -) und (29) (—). p : Oberflächendruck (in mN/m), A : Fläche (in nm²/Molekül).

dieser Methode zur Untersuchung von Membraneigenschaften: Gorter und Grendel leiteten aus dem Flächenbedarf der Monoschicht von Membranextrakten die Existenz einer Doppelschicht in Biomembranen ab^[139]. Auch Reaktionen, wie sie in Biomembranen ablaufen, können in Monoschichten untersucht werden, z. B. die Adsorption von Proteinen an die Monoschicht und ihre Insertion in die Lipidmatrix^[140] oder die Aktivität des Enzyms Lipase in Abhängigkeit vom Oberflächendruck^[141]. Der Nachweis der Mischbarkeit verschiedener Phospholipide und die Charakterisierung von Phospholipid-Cholesterin-Mischungen ermöglichen Rückschlüsse auf das Verhalten dieser Moleküle in der Biomembran^[142]. Wechselwirkungen von Lokalanästhetika mit Membranen wurden modellhaft in Monoschichten untersucht^[143].

Inwieweit die Ergebnisse der Studien über das Verhalten von Phospholipiden in Monoschichten auch für sphärische Membransysteme (Liposomen, Zellen) gelten, hat Blume diskutiert^[144].

4.2.3. Polymerisation in monomolekularen Schichten

Da die Orientierung und Packungsdichte der Monomere in monomolekularen Schichten genau festgelegt und überprüft werden kann, ermöglicht diese Methode auch den Verlauf der Polymerisation in solchen geordneten Systemen zu untersuchen (Abb. 21)^[145].

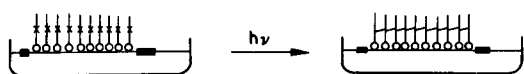


Abb. 21. Schematische Darstellung des Aufbaus polymerer Monoschichten durch UV-Bestrahlung unter Erhaltung der Orientierung (x = polymerisierbare Gruppe).

Dabei bleibt die Orientierung der Monomerbausteine erhalten. Man erhält hochgeordnete stabile Polymerfilme mit

Orientierungsgraden, wie sie nach anderen Verfahren – z. B. durch Spreitung des fertigen Polymers – nicht zu erreichen sind^[146]. UV-initiierte Monoschicht-Polymerisationen wurden in den letzten Jahren intensiv untersucht^[145–148]. Die Reaktionen verlaufen in der Regel unter Kontraktion; die steileren Schub-Flächen-Diagramme der polymeren Monoschichten zeigen einen geringeren Flächenbedarf und höheren Kollapsdruck an^[146]. Daher ist es möglich, den Verlauf der Polymerisation durch die Kontraktion des Films in Abhängigkeit von der Zeit bei konstantem Druck zu verfolgen. Dies kann am Beispiel des Diacetylenlipids (21) gezeigt werden (Abb. 22)^[132].

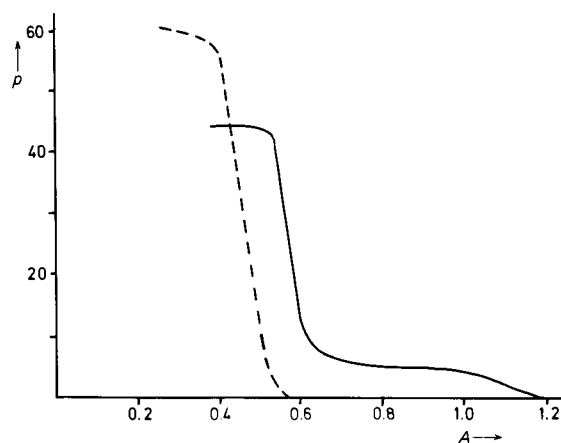
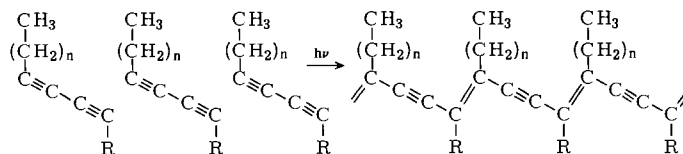


Abb. 22. Schub-Flächen-Diagramme des monomeren und des polymeren Ammoniumlipids (21) [132] (Tabelle 2). (—) Monomer, (---) Polymer, p : Druck (in mN/m), A : Fläche (in nm²/Molekül).

In den letzten Jahren wurde eine weitere Methode – die Messung der UV-Absorption in Monoschichten – zum Studium der Polymerisationskinetik entwickelt^[148]. Dabei benutzt man einen in ein konventionelles UV-Gerät eingebauten Langmuir-Trog. Speziell die Diacetylen-Polymerisation kann mit dieser Technik leicht verfolgt werden, da das Polymer im sichtbaren Bereich eine hohe Extinktion zeigt (vgl. Abb. 27). Die Polymerisation von Diacetylenen im Festkörper ist ein seit langem bekanntes Phänomen^[149]. Die Reaktion verläuft topochemisch, d. h. die Struktur des Monomerkristalls bestimmt die Reaktivität und Struktur des Polymers. Die Farbe des Polymers (blau/rot, vgl. Abb. 26) mit konjugierter „En-in-Struktur“ hängt von der Konformation der Polymerkette im Kristall^[150] und in Lösung^[151] ab.



Die Polymerisation von Diacetylen-Tensiden und -Lipiden nimmt, wie sich UV-spektroskopisch zeigt, in monomolekularer Schicht den gleichen Verlauf wie im Kristall^[148]. Man findet in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer sowohl die blaue Modifikation ($\lambda_{\text{max}} = 620 \text{ nm}$) als auch die rote Polymer-Endstufe ($\lambda_{\text{max}} = 540 \text{ nm}$). Die sowohl durch Kontraktion der Monoschicht (Abb. 22) als auch UV-spektroskopisch nachgewiesene Polymerisierbarkeit des Diacetylen-Lipids (21) demonstriert, daß auch in der Monoschicht die für eine topochemische Reaktion notwendige Packungsdichte erreichbar ist. Man kann zeigen, daß die Po-

lymerisation lediglich im fest-analogen Monomerfilm erfolgt, d. h. im vorliegenden Beispiel bei Schüben oberhalb 10 mN/m^[132, 134, 148]. Eine Bestrahlung des Films im flüssig-analogen Bereich ($p < 10$ mN/m) führt nicht zu Polymerfilmen.

Im Gegensatz zu den nur topochemisch polymerisierbaren Diacetylenen sind sowohl die Methacryloyl- als auch die Dien-Derivate der Lipide und Tenside nicht nur im fest-analogen, sondern auch im flüssig-analogen Bereich polymerisierbar^[123, 130]. Abbildung 23 gibt das Kontraktionsverhalten des Dienlecithin-Analogons (20) bei Bestrahlung im flüssig-analogen Bereich ($p = 7$ mN/m) wieder^[130].

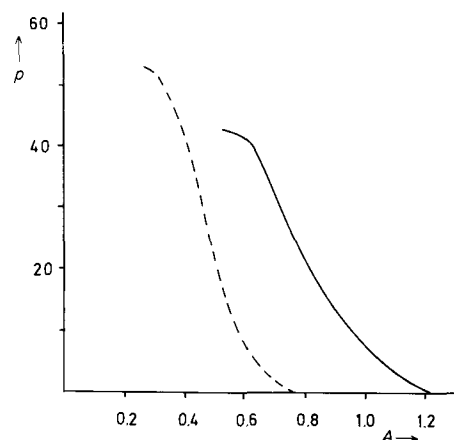


Abb. 23. Schub-Flächen-Diagramme des monomeren und des polymeren Lecithin-Derivats (20) [130] (Tabelle 2). (—) Monomer, (---) Polymer, p : Druck (in mN/m), A : Fläche (in nm²/Molekül).

In den Methacryloyl- und Dien-Systemen sind die (nicht konjugierten) Polymerketten weit beweglicher als in den Diacetylenen und daher zum Aufbau flexibler Membranen besser geeignet.

Bei allen bisher untersuchten Systemen zeigen die Schub-Flächen-Diagramme für die Polymere dichtere Filmpackungen und höhere Kollapsdrücke als für die Monomere. Dies deutet auf die vom Konzept her erwartete höhere Filmstabilität der polymerisierten Membranen hin. Anschaulich ist dies in Abbildung 24 demonstriert.

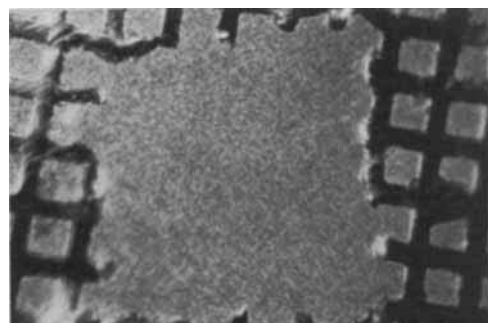


Abb. 24. Doppelschicht einer Poly(diacetylen-carbonsäure) auf einem Elektrodenmikroskop-Kupfernetz. Die stabile Doppelschicht überspannt eine Fläche von 0,25 mm².

Eine Doppelschicht aus einer Poly(diacetylen-carbonsäure) überspannt eine Öffnung von 0,5 mm Durchmesser an einem Elektronenmikroskop-Netz. Diese Doppelschichtmembran bleibt in Wasser und an Luft über Wochen stabil^[147d].

Nach den bisherigen Untersuchungen ist eine Polymerisation in planaren geordneten Systemen möglich, und sie führt tatsächlich zu hochgeordneten und wie erwartet sehr stabilen

Modellmembranen. Zu diskutieren bleibt allerdings im nächsten Abschnitt, ob auch bei sphärisch angeordneten Doppelschichten in Liposomen eine Polymerisation stattfinden kann und wie weit die dabei gebildeten Polymervesikeln den bisher bekannten niedermolekularen Systemen an Stabilität überlegen sind.

4.3. Polymere Liposomen als Zellmodelle

4.3.1. Struktur und Herstellung von Liposomen

Liposomen als Zellmodelle sind den biologischen Membranen am ähnlichsten; es handelt sich hierbei um geschlossene, kugelförmige Gebilde mit einem wässrigen Innenraum und einer oder mehreren Lipid-Doppelschichten^[152] (Abb. 25).

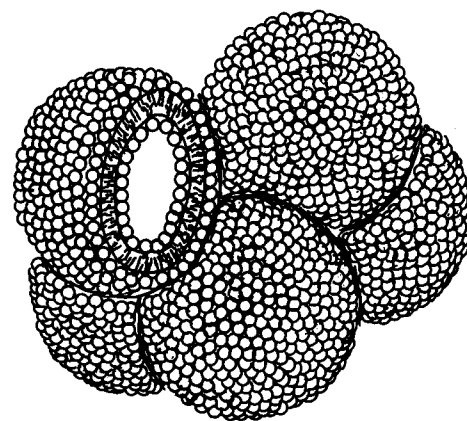


Abb. 25. Schematische Darstellung unilamellarer, d. h. aus einer Doppelschicht gebildeter Liposomen.

Derartige Vesikeln lassen sich sowohl aus synthetischen Amphiphilen als auch aus Membranextrakten herstellen; rekonstituierte Membranen, d. h. Liposomen aus Zellmembranbestandteilen, enthalten fast alle Komponenten von Zellmembranen (Lipide, Proteine, Glycolipide etc.). Ein weiteres Beispiel sind die durch osmotischen Schock hergestellten „Erythrocyt-Ghostzellen“^[153].

Vesikeln aus synthetischen Lipiden oder Lipidanaloga sind in ihrem Aufbau natürlich sehr viel einfacher. Im Normalfall bestehen sie aus einer einzigen Komponente, und man erhält je nach Art der Erzeugung unterschiedlich große Doppel- oder Multischicht-Vesikeln^[121].

Die gebräuchlichsten Methoden zur Herstellung von Liposomen^[121] sind die Beschallung von Lipidsuspensionen in Wasser, die Injektion von Methanol- oder Etherlösungen des Lipids in Wasser, die Dialyse von Tensid-Lipid-Gemischen sowie das Schütteln von an Glasoberflächen aufgetragenen Lipidfilmen in Wasser.

Die in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen polymerisierbaren Lipide und Lipidanaloga (14)–(25) (Tabelle 2) wurden überwiegend durch Beschallung ihrer Kristallsuspensionen in liposomale Lösungen überführt^[123, 154]. Analog den Untersuchungen von Gebicki und Hicks^[155] an gesättigten Tensiden konnten z. B. auch langkettige Diacetylen-carbonsäuren und einige ihrer Derivate in Liposomen überführt werden^[154]. Bei längerer Beschallung bilden sich kleine, relativ homogene Vesikeln mit einer einzigen Doppelschicht. Man erhält nach Filtration durch einen Millipore-Filter klare oder leicht opake Lösungen. Wie die bekannten niedermolekularen Ve-

sikeln sind auch die Monomerliposomen relativ instabil: Ihre Lösungen werden nach einigen Tagen trüb.

4.3.2. Polymerisation in liposomalen Systemen

Die Monomerliposomen aus Methacryloyl-, Dien- und Diacetylenlipiden und -tensiden lassen sich durch UV-Bestrahlung in Polymerliposomen umwandeln. Dieser Prozeß läßt sich für die Diacetylenlipide durch den bereits bei der Monoschichtpolymerisation erwähnten Farbumschlag visuell und spektroskopisch verfolgen (Abb. 26). Es werden auch hier – wie bei der Monoschichtpolymerisation – klare, aber tief farbige Polymerlösungen erhalten^[154].

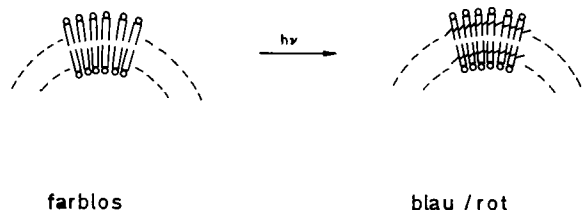


Abb. 26. Polymerisation von Liposomen aus dem Diacetylenlipid (21) (Tabelle 2, vgl. Abb. 27). Umwandlung der farblosen Monomerlösungen in die tiefblauen oder leuchtendroten Polymerlösungen.

Der Übergang von blau nach rot (Abb. 26) erfolgt durch lange Bestrahlung oder Temperaturerhöhung. Die VIS-Spektren der roten Polymer-Endform in Monoschicht und in Liposomen stimmen hinsichtlich der Bandenlage überein (Abb. 27).

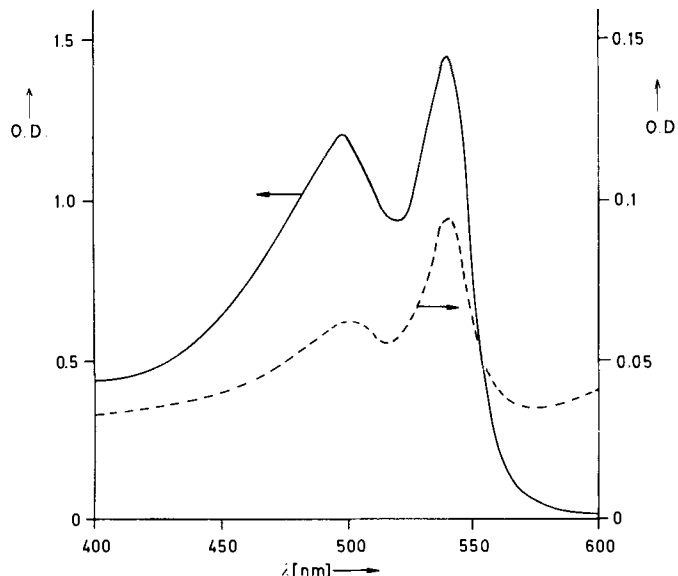


Abb. 27. VIS-Spektren der roten Form polymerer Monoschichten und polymerer Liposomen aus dem Diacetylenlipid (21) [154]. (----) Spektrum der Monoschicht (vgl. Abb. 22), (—) Spektrum der Liposomenlösung (vgl. Abb. 26); O. D.: optische Dichte.

Der direkte Beweis, daß es sich bei den Polymerlösungen der Methacryloyl-, Dien- und Diacetylenlipide um liposomale Strukturen handelt, kann durch die Elektronenmikroskopie erbracht werden. Abbildung 28 zeigt die Lösung der monomeren Vesikeln des Ammoniumlipids (21)^[154].

Durch vergleichende Messungen mit der Lösung des analogen Polymers kann die Strukturhaltung nachgewiesen werden. Dies stimmt auch mit den Ergebnissen elektronen-

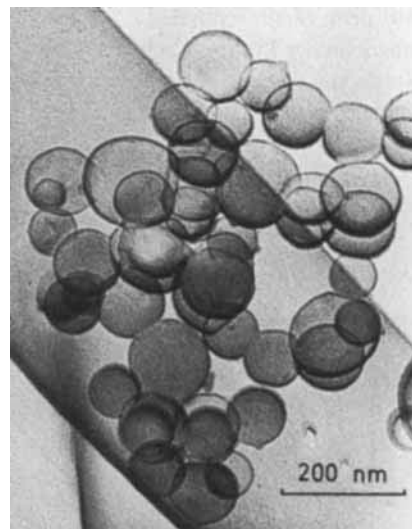


Abb. 28. Elektronenmikroskopische Aufnahme kleiner unilamellarer Monomer-vesikeln aus dem Diacetylenlipid (21) nach Ultraschallbehandlung, negativ kontrastiert mit Uranylacetat [154].

mikroskopischer Untersuchungen von Regen et al.^[128] an Liposomen des aus (15) erhaltenen Polymethacryloyllipids überein.

Die Größenverteilung von Monomer- und Polymervesikeln bleibt gleich, was am Beispiel der Liposomen aus dem Dien (20) durch Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) bestätigt wurde^[156].

Wäßrige Lösungen dieser polymeren Liposomen sind – anders als die der Monomere – über Wochen stabil. Eingeschlossene Substanzen werden von Polymerliposomen weit aus weniger leicht freigegeben als von Monomerliposomen. Dies wurde am Beispiel des Dienlipids (20) durch Fluoreszenzmessungen untersucht: In Liposomen in hoher Konzentration eingeschlossenes 6-Carboxyfluorescein (6-CF) zeigt keine Fluoreszenz (quenching). Bei der Freisetzung in das umgebende wäßrige Medium tritt aufgrund der hohen Verdünnung eine starke Fluoreszenz auf^[154a]. Liposomen aus Dipalmitoyllecithin zeigen unterhalb der Phasenübergangstemperatur in 40 h eine Freigabe von 8% des eingeschlossenen 6-CF. Liposomen aus monomeren (20), die im flüssig-analogen Zustand vorliegen, setzen den Farbstoff sehr viel schneller frei. Bei Polymerliposomen dagegen ist auch nach 40 h noch keine Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs zu beobachten^[156] (Abb. 28a). Darüber hinaus lassen sich Vesikellösungen, z. B. mit Ethanol, ohne Ausfällung verdünnen^[154b]. Die polymeren Liposomen aus dem Diacetylenlipid (21) so-

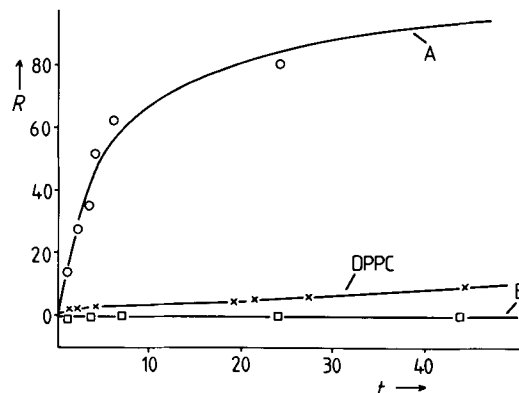


Abb. 28a. Freisetzung von eingeschlossenem 6-Carboxy-fluorescein aus Liposomen aus monomerem und polymerem (20). Zum Vergleich: DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholin). R = % Freisetzung, t = Zeit in h

wie dem Methacryloyllipid (14) bleiben auch in 80proz. ethanolischer Lösung wochenlang unverändert. Das gleiche wurde von *Regen* am polymeren Methacryloyllipid (15) gefunden^[128] (Abb. 29).

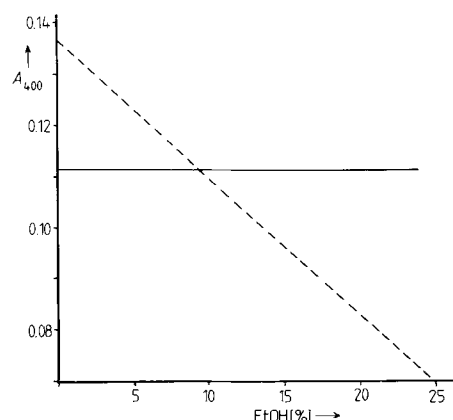


Abb. 29. Stabilität von Monomer- (---) und Polymer-Liposomen (—) aus dem Methacryloyllipid (15) nach Ethanolzusatz [128], A_{400} : Absorption bei 400 nm.

Eine Ausfällung kann durch Zugabe von Salzen, z. B. KCl, erreicht werden. Die Liposomen werden durch den osmotischen Schock nicht zerstört. Im Präzipitat lassen sich elektronenmikroskopisch weiterhin kugelige Vesikeln nachweisen^[154].

Einen weiteren Hinweis auf die hohe Stabilität der polymeren Liposomen erhält man aus rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 30). Während die Monomeresvesikeln schon aufgrund der drastischen Bedingungen bei der Präparation im Hochvakuum zerstört werden, lassen sich die polymeren Liposomen wiederum unter Erhaltung ihrer sphärischen Strukturen abbilden^[154].

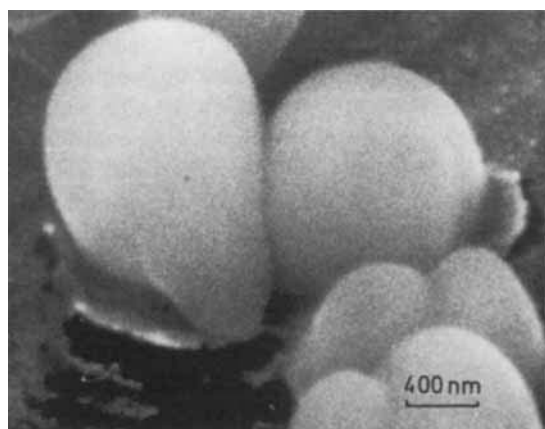


Abb. 30. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme großer multilamellarer Polymervesikeln aus dem Diacetylenlipid (21) [154].

Von den drei in Abschnitt 4.1.3 diskutierten Möglichkeiten zur Untersuchung von Membranmodellen wurden bisher die Polymerisation in Monoschichten und in Liposomen realisiert. Unseres Wissens ist die Polymerisation von Tensiden und Lipiden in einer bimolekularen Lipidmembran (BLM) noch nicht beschrieben. Polymerisationsfähige Tenside und Lipide bilden ähnlich stabile BLMs wie Phospholipide^[157]. Darüber hinaus lassen sich auch Mischsysteme von polymerisierbaren Lipiden mit natürlichen Phospholipiden herstellen. An einem Methacryloyl-Lipid konnte gezeigt

werden, daß Doppelschichten auch als BLM polymerisierbar sind^[157].

4.3.3. Versuche zur Oberflächenerkennung polymerer Liposomen

Von den im Abschnitt 4.1.1 an ein hypothetisches polymeres Antitumormittel auf zellulärer Basis gestellten Forderungen kann die erhöhte Stabilität – zugegebenermaßen die einfachste Bedingung – als realisierbar betrachtet werden.

Das nächste Problem, die spezifische Erkennung, ist für niedermolekulare Liposomen bereits vielfach experimentell angegangen worden.

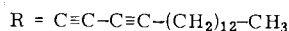
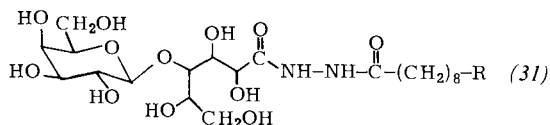
Bereits der strukturelle Aufbau von Liposomen spielt eine Rolle für ihr in-vivo-Verhalten. Faktoren wie Größe, Ladung und Lipidzusammensetzung sind entscheidend für die Aufenthaltsdauer im biologischen System und für die Fähigkeit, in bestimmte Organbereiche einzudringen^[158]. Ein spezifisches Ansteuern von Zielorganen („targeting“) ist durch Variation dieser Parameter nicht zu erzielen.

Direkte Versuche zum zellspezifischen Transport von Liposomen wurden mehrfach beschrieben: *Cohen et al.* überzogen Liposomen mit aggregiertem Immunglobulin^[159]; die Aufnahme in Phagocyten konnte damit um den Faktor 60 gegenüber freien Liposomen erhöht werden. *Gregoriadis* und *Neerunjun* erzielten ein „homing“ von Antikörpern bei Zellkulturen^[160]; die Aufnahme dieser Liposomen durch die entsprechenden Zellen war maximal um den Faktor 25 erhöht, wenn die Liposomen mit den Antikörpern beladen waren. Ähnliche Versuche wurden mit lipid-fixierten Antikörpern^[161] unternommen. Trotz dieser vielversprechenden Versuche ist ein genaues „targeting“ bisher nicht gelungen. Nach wie vor reichert sich die Hauptmenge der Liposomen in Leber und Milz an und wird zu schnell aus dem Blutkreislauf entfernt.

Mit polymeren Liposomen sind bisher nur einfache Modellreaktionen zur spezifischen Erkennung durchgeführt worden. Dabei boten die intensiv untersuchten Wechselwirkungen membrangebundener Zucker mit Lectinen eine aussichtsreiche Perspektive: In der biologischen Membran erfüllen die im Außenmilieu exponierten Zuckerreste als Erkennungssignale eine Vielzahl wichtiger Funktionen^[162]. Einige Zuckerreste können von bestimmten Proteinen pflanzlicher und tierischer Herkunft, den Lectinen, spezifisch erkannt und gebunden werden^[163]. Über die Bindung solcher Lectine an in Liposomen herkömmlicher Art inkorporierte Glycoproteine und Glycolipide und die Agglutination der resultierenden Lectin-Liposomen-Komplexe liegen bereits umfangreiche Untersuchungen vor^[164]. Das gebräuchlichste Lectin ist Concanavalin A (Con A), das bei pH=7 als Tetramer über vier Bindungsstellen für endständige Zucker wie D-Mannopyranose und D-Glucose verfügt^[163].

Für die Modellreaktionen zur Oberflächenerkennung polymerer Liposomen mit Con A wurden die amphiphilen Monomere (30) und (31) mit einem Gluco- bzw. Galactopyranosering als Kopfgruppe hergestellt^[129,165].

(30) konnte als langkettiges Tensid durch Beschallung in Liposomen umgewandelt werden. Diese lassen sich durch UV-Bestrahlung analog den vorher beschriebenen Lipiden zu blauen und schließlich roten Lösungen polymerisieren. Versetzt man die Lösungen monomerer und polymerer Liposomen des Glycolipids mit Con-A-Lösung, so treten nach kurzer Zeit Agglutination und Ausfällung der Liposomen

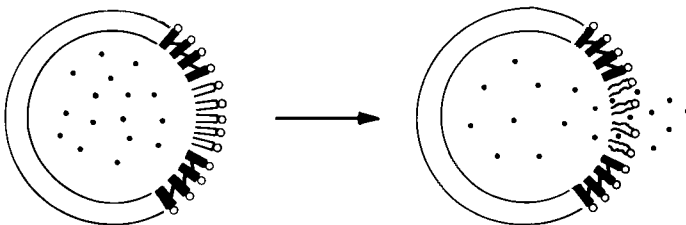
$$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ | \\ \text{HO} \diagup \text{---} \text{O} \diagdown \\ | \quad \quad | \\ \text{HO} \quad \quad \text{HO} \end{array} \text{---} \text{O} \text{---} (\text{CH}_2)_9 \text{---} \text{R} \quad (30)$$


4.3.4. Auf dem Weg zu Zellmodellen

Was die hierzu diskutierten Überlegungen angeht, so wurden drei wesentliche Anforderungen an solche Systeme erwähnt, nämlich Stabilität, Fähigkeit zur Zellerkennung und zur Zellmembranzerstörung. Die Herstellung ausreichend stabiler Liposomen aus amphiphilen Monomeren ist gelungen. Eine Möglichkeit der spezifischen Erkennung solcher polymerer Liposomen konnte am Beispiel der Lectin-Zucker-Wechselwirkung gezeigt werden. Bis zu einem echten „targeting“ ist es aber noch ein weiter Weg. Nachdem in jüngster Zeit der Einbau monoklonaler Antikörper in niedermolekulare Liposomen erreicht werden konnte^[166], kann man auch hier für die Zukunft optimistischer sein.

nes solchen Systems durch Lyse nicht zerstörbar sein dürfen. Über Versuche zur selektiven Zerstörung von Tumorzellen durch synthetische Alkyl-Lysophospholipide wurde bereits berichtet^[167]. Eine weitere Möglichkeit wäre der Transport polymerer Tenside, die das Transportliposom nicht zerstören können, zur Tumorzellmembran. Dieses letzte Beispiel ähnelt im Prinzip dem als humorale Immunantwort bezeichneten Weg zur Zerstörung von Tumorzellen^[168].

Die Freisetzung von in Polymerliposomen eingeschlossenen Substanzen verlangt aber, daß die stabilen Liposomen destabilisierbare Bereiche enthalten, den Korken von Flaschen vergleichbar. Dies ist in Abbildung 31 schematisch dargestellt.



Mechanismen zur Öffnung der stabilen polymeren Liposomen, z. B. durch Permeabilitätserhöhung oder durch „Entkorkung“, könnten sein:

- photochemische Membrandestabilisierung^[169]
- pH-abhängige Öffnung in saurem Milieu^[170]
- temperaturabhängige Öffnung durch Überschreiten der Phasenübergangstemperatur (Hyperthermie)^[171]
- enzymatische Prozesse

Die Erhöhung der Stabilität von Liposomen durch Polymerisation ist also nur ein erster, aber nicht unwesentlicher Schritt auf dem Weg zu möglichen zellulären Antitumormitteln.

327

ren^[126b], ohne daß die Liposomen zerstört werden. Um über die einfache Kompartimentierung hinaus zu vesikulären Systemen mit spezifischen Reaktionsmöglichkeiten zu kommen, sind komplexere Systeme notwendig.

Membranen aus polymerisierbaren Bereichen, destabilisierbaren Bereichen sowie Proteinen und Einheiten mit Erkennungsfunktionen führen zu Liposomen, die als Zellmodell betrachtet werden können.

Ganz allgemein hat sich in der modernen Zellmembranforschung die Diskussion von Modellen als äußerst nützlich erwiesen^[177]. Die heutigen Membranmodelle – mögen sie noch so simplifiziert sein – sind erstaunlich gut geeignet, um wichtige biologische Funktionen^[178] wie Kommunikation zwischen Zellen, Aufnahme von Substanzen in Zellen und Übertragung von Außenimpulsen auf Innenreize bei Zellen verständlich zu machen. Vier Wege zum Aufbau von Zellmodellen mit polymerisierbaren Einheiten sind in Abbildung 32 zusammengefaßt.

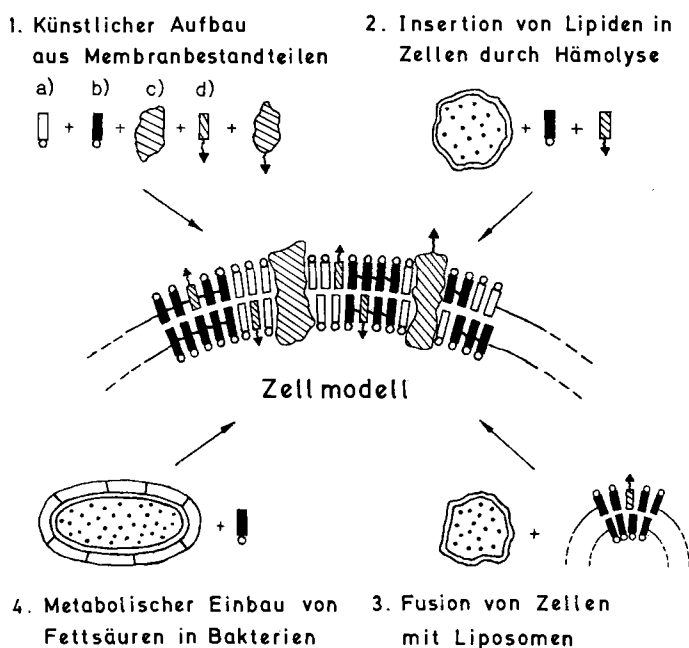


Abb. 32. Schematische Darstellung des Aufbaus von Zellmodellen hoher Stabilität durch partielle Polymerisation der Membran. Membranbestandteile: a) natürliche oder synthetische Lipide, b) polymerisierbare Lipide, c) Proteine, d) Einheiten mit Erkennungsfunktionen.

Erstens kann man von einer synthetischen Mischung aus niedermolekularen Lipiden, polymerisierbaren Lipiden und Proteinen ausgehen, diese durch die in Abschnitt 4.3.1 besprochenen Methoden in Liposomen umwandeln und polymerisieren. Erste Versuche ergaben, daß auf diesem Weg auch komplexe Proteine wie die Fo-F₁-ATPase aus *Rhodospirillum rubrum* in polymere Liposomen eingebaut werden können. Die Aktivität der ATPase bleibt dabei erhalten^[179]. Sie ist abhängig von der Polymerisationszeit, d. h. vom Anteil an polymerisiertem Lipid in der Membran. Die Aktivität der ATPase in einem Monomerliposom [aus Verbindung (23)] ist geringer als in einem Liposom aus natürlichen Phospholipiden. Mit zunehmender Polymerisationsdauer steigt jedoch die Aktivität des Enzyms in Liposomen an und erreicht den für Lecithin-Liposomen gemessenen Wert. Im Gegensatz zu den letzteren sind die ATPase-haltigen Polymerliposomen über längere Zeit stabil.

Zweitens können durch Hämolyse polymerisierbare Lipidbestandteile z. B. in Erythrocyten-Ghostzellen eingelagert und nachfolgend polymerisiert werden. Während die osmotische Hämolyse^[153] hierfür einige entscheidende Nachteile aufweist, bietet sich das von Zimmermann et al. ausgearbeitete Verfahren der elektrischen Hämolyse an, um z. B. Ghostzellen-Membranen zu variieren. Es beruht auf einem reversiblen dielektrischen Durchbruch der Zellmembran im elektrischen Feld^[106c, 180].

Der dielektrische Durchbruch eröffnet auch den dritten Weg zur Erzeugung von Zellmodellen: Nach Zimmermann et al. fusionieren unter geeigneten Bedingungen Zellen mit anderen Zellen oder Liposomen^[181]. Auf diese Weise können z. B. Lipide aus künstlichen Liposomen in die Membran von Zellen eingeschleust werden^[106c].

Über eine vierte Möglichkeit berichten Chapman et al.^[131]: Bakterienzellen bauen polymerisierbare Diacylenfettsäuren als Lipide in ihre Membran ein, die dann in der lebenden Zelle durch UV-Bestrahlung polymerisiert werden können. Die vier in Abbildung 32 diskutierten Möglichkeiten lassen erwarten, daß die so hergestellten stabilisierbaren Zellmodelle zur Untersuchung und Charakterisierung zellulärer Eigenschaften und zur Simulation biologischer Reaktionen dienen können.

5. Schlußbemerkung

Im vorliegenden Beitrag ist versucht worden, aus dem (notwendig begrenzten) Blickwinkel des Polymerchemikers über mögliche Beiträge der makromolekularen Chemie zur Entwicklung neuer Antitumormittel zu berichten.

Ziel dieser Überlegungen war, einige gelöste Probleme sowie offene Fragen deutlich zu machen und über weitere Lösungsmöglichkeiten zu spekulieren. Es ist uns durchaus bewußt, daß die Verknüpfung von zwei zunächst eigenständigen Problemkreisen, nämlich Entwicklung polymerer Antitumormittel auf molekularer Basis und Aufbau stabiler Zellmodelle, dem Leser willkürlich erscheinen mag. In der Tat sind bei den polymeren Antitumormitteln erste Erfolge sichtbar – und mit ihnen die zugehörigen Schwierigkeiten. Man kann sicher sagen, daß dieses Gebiet weiterer intensiver Erforschung bedarf und wert ist. Im Fall der Zellmodelle und hypothetischen Antitumormittel auf zellulärer Basis sind bisher nur die ersten Voraussetzungen geschaffen, und es bleibt abzuwarten, ob das Konzept einer Verwirklichung näher gebracht werden kann.

Für beide Ansätze gilt nach wie vor, daß die entscheidende Frage des gezielten Ansteuerns von Tumorzellen im Humanbereich noch weitgehend ungelöst ist: "The development of comparative biochemistry of various tissues and cells has lagged behind the ingenuity of the synthetic chemist, so that although in many cases the gun could be loaded with suitable ammunition, we lack information about the target."^[182]

Angesichts dieser Sachlage könnte man einwenden, daß es unsinnig sei, weiter „die Kanone zu laden“, ehe man das Ziel ausreichend genau kenne. Die Aktualität des Tumormproblems läßt jedoch ein Aufgeben der empirischen oder gezielten Suche nach wirksamen Substanzen gegen Krebs nicht zu. Interdisziplinär, d. h. durch Kooperation von Chemikern, Pharmakologen, Immunologen und Molekularbiologen betrieben, sollten sich auch daraus detailliertere Kenntnisse über die Tumorzelle und ihr Verhalten ableiten lassen. Die

Entwicklung von Antitumormitteln kann also sowohl der Behandlung als auch der Charakterisierung von Tumoren dienen. Manches an den hier vorgestellten Konzepten mag dem Leser spekulativ erscheinen; zu Recht. Wir sind jedoch der Meinung, daß das vorgestellte Forschungsgebiet Anregungen gibt und zu neuen Fragen herausfordert. Die makromolekulare Chemie kann vielleicht einen bescheidenen Beitrag dazu leisten.

C. C. Zubrod, ein Altmeister der Chemotherapie, verglich 1978 die geringen Erfolge der Tumorchemotherapie mit den Triumphen bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten und fügte hinzu: "Remember, however, that with regard to infectious disease, quinine was discovered in the 17th century, and Salvarsan in 1910, and now, in 1978, we still lack curative agents for viral diseases. The only treatment for my grandchildren's chickenpox is watching TV. So the short list of cure of metastatic disease compiled in these 37 years should not be discouraging. I feel optimistic that wider success will follow in years or decades, rather than in centuries, as with chemotherapy of infection."^[48]

Weder unkritischer Optimismus noch hemmender Pessimismus scheinen also gerechtfertigt. Im übrigen gilt – wie bei allen Versuchen, ein Gebiet von „höherer Warte“ vorzustellen – was H. von Saalfeld in Abbildung 33 so trefflich beschreibt^[183].



„Ohne den nötigen Überblick ist es heute einfach nicht mehr zu schaffen!“
H/S

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich 41, Chemie und Physik der Makromoleküle, Mainz/Darmstadt), dem Bundesministerium für Forschung und Technologie (Forschungsprogramm Arzneimittelentwicklung und -testung für die Krebstherapie) und dem Fonds der Chemischen Industrie für die Unterstützung unserer Arbeiten.

Eingegangen am 30. Januar 1981 [A 357]

Glossar

Antimetabolit:	Chemische Verbindung, die einen wichtigen Stoffwechselprozeß blockiert, indem sie mit dem normalen Metaboliten (z. B. dem Substrat einer Enzymreaktion) in Konkurrenz tritt. Antimetabolite werden auch in der Krebs-Chemotherapie angewendet (z. B. Methotrexat).
Chronomere:	Abbaubare Polymere, die einen Wirkstoff zeitlich kontrolliert freisetzen.
Endocytose:	Prozeß, durch den bestimmte Zellen extrazelluläres Material aufnehmen (siehe Abb. 3). Man unterscheidet Phagozytose (Aufnahme von im Lichtmikroskop sichtbarem Material) und Pinocytose (Aufnahme von sub-lichtmikroskopischem Material).
Hämolyse:	Austritt von Hämoglobin bei Auflösung von roten Blutkörperchen (Zerstörung der Zellmembran). Kontrollierte Hämolyse (osmotisch, elektrisch induziert) ermöglicht die Erzeugung von hämoglobinfreien („Ghost“-)Erythrocyten.
Immunogen:	Antigen, das eine Immunantwort auslöst.
Immunstimulierend:	Die Immunabwehr verstärkend, z. B. durch Stimulation der Makrophagen oder der Antikörper-produzierenden B-Zellen.
Immunsuppressiv:	Die Immunantwort unterdrückend.
Liposom:	Geschlossenes, kugelförmiges Gebilde (siehe Abb. 28) aus einer oder mehreren Lipid-Doppelschichten mit wäflrigem Innenraum; oft auch als Vesikel bezeichnet.
Lyotrope Phase:	Aus amphiphilen Molekülen und einem Lösungsmittel (insbesondere Wasser) gebildete Struktur hoher Orientierung (z. B. lamellare oder zylinderförmige Anordnung).
Monoklonale Antikörper:	Chemisch einheitliche Antikörper, die durch Vermehren einzelner Antikörper-bildender Zellen (Klonieren) erhalten werden [166a]. Natürlich vorkommende Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen sind nicht chemisch einheitlich (sondern heterogen).
Phasenübergangstemperatur:	Bei Membransystemen Temperatur, bei der ein Übergang von einem fest-analogen in einen flüssig-analogen Zustand stattfindet.
Pyrogene:	Substanzen, die bei höheren Tieren und Menschen 1–2 h nach Injektion Schüttelfrost und Fieber hervorrufen.
RES (reticuloendotheliales System):	Oberbegriff für Zellen unterschiedlicher Gestalt und Herkunft, die zur Endocytose befähigt sind; sie kommen insbesondere in Knochenmark, Leber, Milz und Lymphgewebe vor.
solider Tumor:	An einer bestimmten Stelle des Körpers lokalisierter Tumor.
Trypanosomen:	Parasitische Einzeller, die von blutsaugenden Insekten auf Wirbeltiere übertragen werden. <i>T. cruzi</i> wird in Südamerika von Raubwanzen auf Menschen übertragen und verursacht Chagas' Krankheit: Lymphknotenschwellung, Vergrößerung von Milz, Leber und Schilddrüse, Herzmuskelschäden; verläuft meist chronisch oder tödlich.
Vesikel:	Siehe Liposomen.

- [1] a) J. Rutschmann, *Chimia* 34, 376 (1980); b) A. S. Sartorelli, D. G. Johns: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. 38, Part 1 und 2. Springer, Berlin 1974/1975.
- [2] S. K. Carter, M. Slavik, *Annu. Rev. Pharmacol.* 14, 157 (1974).
- [3] a) P. Ehrlich in L. Shuster: *Readings in Pharmacology*. Little Brown, Boston 1962, S. 231; b) T. Davies, *Nature* 289, 12 (1981).
- [4] E. J. Ariens: *Drug Design*. Vol. 1. Academic Press, New York 1971.
- [5] H. König, *Angew. Chem.* 92, 802 (1980); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 19, 749 (1980).
- [6] Vgl. V. T. de Vita, H. Busch: *Methods in Cancer Research*. Vol. 16, Part A. Academic Press, New York 1979.
- [7] L. A. Smets, *Biochim. Biophys. Acta* 605, 93 (1980).
- [8] Kriterien für eine Beschreibung von Unterschieden zwischen Tumor- und Normalzelle entwickelt Smets [7].
- [9] C. Cheng, *J. Pharm. Sci.* 61, 645 (1972).
- [10] a) G. Weber, *N. Engl. J. Med.* 296, 486, 541 (1977); b) G. Weber, *Adv. Enzyme Regul.* 11, 79 (1973).
- [11] a) C. Tan, *Hosp. Pract.* 7, 99 (1972); b) vgl. auch die Beiträge von M. K. Patterson, Jr. und H. F. Oettgen in [1].
- [12] A. R. Poole in J. T. Dingle: *Lysosomes in Biology and Pathology*. Vol. 3. Elsevier, North Holland, Amsterdam 1973, S. 303.
- [13] a) L. W. Oberley, G. R. Buettner, *Cancer Res.* 39, 1141 (1979); b) G. M. Bartoli, S. Bartoli, T. Galeotti, E. Bertoli, *Biochim. Biophys. Acta* 620, 205 (1980).
- [14] C. P. Li: *Anticancer Agents Recently Developed in the People's Republic of China*. D. H. E. W. Publication No. NIH 74, Washington D.C. 1974.
- [15] A. K. Brewer, *Am. Lab.* 5, 12 (1973).
- [16] a) C. H. Lo, V. J. Cristofalo, H. P. Morris, S. Weinhouse, *Cancer Res.* 28, 1 (1968); b) Z. B. Papanastassiou, R. J. Bruni, E. White, P. L. Levins, *J. Med. Chem.* 9, 725 (1966).

- [17] a) J. C. Robbins, G. L. Nicolson in F. F. Becker: *Biology of Tumors: Surfaces, Immunology and Comparative Pathology*. Vol. 4. Plenum Press, New York 1975, S. 3; b) G. L. Nicolson, G. Poste, N. Engl. J. Med. 295, 197, 253 (1976); c) G. L. Nicolson, Biochim. Biophys. Acta 457, 57 (1976); 458, 1 (1976); d) D. F. H. Wallach: *Membrane Molecular Biology of Neoplastic Cells*. Elsevier, Amsterdam 1975; e) W. W. Franke in H. Koprowski: *Neoplastic Transformation: Mechanisms and Consequences*. Dahlem Workshop Reports, Verlag Chemie, Weinheim 1977, S. 181; f) G. Poste, Biochem. Soc. Trans. 8, 695 (1980).
- [18] a) H. Busch, E. Fujiwara, D. C. Firszt, Cancer Res. 21, 371 (1961); b) C. H. Sutton, N. H. Becker, Ann. N. Y. Acad. Sci. 159, 497 (1969).
- [19] a) G. L. Nicolson, Int. Rev. Cytol. 39, 89 (1974); b) M. M. Burger, Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 32, 91 (1973); c) M. E. Bramwell, Biochem. Soc. Trans. 8, 697 (1980).
- [20] D. A. Weiss, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 89, 1 (1980).
- [21] K. W. Brunner, G. A. Nagel: *Internistische Krebstherapie*. 2. Aufl. Springer, Heidelberg 1979, S. 69.
- [22] R. Süss, V. Kinzel, J. D. Scribner: *Krebs – Experimente und Denkmodelle*. Springer, Berlin 1970, S. 85.
- [23] a) G. Poste, J. J. Fidler, Nature 283, 139 (1980); b) G. L. Nicolson, Spektrum der Wissenschaft 1979 (5), 44.
- [24] Vgl. dazu die Beiträge von M. K. Patterson, Jr. und H. F. Oetgen in [1].
- [25] L. N. Ferguson, Chem. Soc. Rev. 4, 289 (1975).
- [26] a) C. E. Tananis, M. G. McLoughlin, P. C. Walsh, Cancer Treat. Rep. 61, 265 (1977); b) P. G. Riches, E. D. Gilby, S. M. Sellwood, R. Wilkinson, I. Konyves, Eur. J. Cancer 13, 873 (1977).
- [27] N. Brock, Chem. Exp. Technol. 3, 441 (1977).
- [28] a) D. S. Zaharko, M. Przybylski, V. T. Oliverio, Methods Cancer Res. 16, 347 (1979); b) A. Trouet, Eur. J. Cancer 14, 105 (1978); c) G. Gregoriadis: *Drug Carriers in Biology and Medicine*. Academic Press, London 1979; d) E. Goldberg, L. Donaruma, O. Vogl: *Targeted Drugs*. Wiley, New York, im Druck.
- [29] a) H. K. Kimelberg, E. J. Mayhew, CRC Crit. Rev. Toxicol. 6, 25 (1978); b) G. Gregoriadis, A. C. Allison: *Liposomes in Biological Systems*. Wiley, New York 1980; c) D. Papahadjopoulos: *Liposomes and Their Uses in Biology and Medicine*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 308 (1978); d) R. E. Pagano und J. N. Weinstein [Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 7, 435 (1978)] geben eine kritische Übersicht über mögliche Wechselwirkungen von Liposomen mit Zellen und entsprechende Untersuchungstechniken.
- [30] a) U. Zimmermann, G. Pilwat, Z. Naturforsch. C 31, 732 (1976); b) U. Zimmermann, F. Riemann, G. Pilwat, Biochim. Biophys. Acta 436, 475 (1976); c) M. Furusawa, M. Yamaizumi, T. Nishimura, T. Ushida, Y. Okada, Methods Cell Biol. 14, 73 (1976); d) S. J. Updike, R. T. Wakamiya, E. N. Lighfoot, Jr., Science 193, 681 (1976); e) D. A. Tyrell, B. E. Ryman, Biochem. Soc. Trans. 4, 677 (1976); f) U. Zimmermann in [28d].
- [31] H. F. Mark, Pure Appl. Chem. 16, 201 (1968).
- [32] a) D. J. Lyman, Rev. Macromol. Chem. 1, 355 (1966); b) H. Lee, K. Neville: *Handbook for Surgery and Artificial Organs*. Pasadena Technology Press, Pasadena 1971; c) G. W. Hastings, Angew. Chem. 82, 367 (1970); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 9, 332 (1970); d) vgl. die Vorträge auf dem 7th Biennial Manchester Polym. Symp. 1978, Br. Polym. J. 10, 232–301 (1978); e) O. Oest, K. Müller, W. Hupfauer: *Die Knochenzemente*. Enke, Stuttgart 1975.
- [33] C. Schuerch, Adv. Polym. Sci. 10, 173 (1972).
- [34] V. Kabaivanov, M. Georgieva, Plaste Kautsch. 19, 886 (1972).
- [35] L. G. Donaruma, Prog. Polym. Sci. 4, 1 (1974).
- [36] H. Ringsdorf, J. Polym. Sci. Polym. Symp. 51, 135 (1975).
- [37] P. Ferruti, Pharmacol. Res. Commun. 7, 1 (1975).
- [38] H. G. Bätz, Adv. Polym. Sci. 23, 25 (1977).
- [39] A. D. Virnik, V. A. Snieschko, K. P. Chomiakov, Polim. Med. 6, 197 (1976); 7, 27 (1977).
- [40] a) R. J. Kostelnik: *Polymeric Delivery Systems*. Midl. Macromol. Monogr., Vol. 5, Gordon & Breach, New York 1977; b) B. Sedláček, C. G. Overberger, H. F. Mark: *Medical Polymers: Chemical Problems*. J. Polym. Sci. Polym. Symp. 66 (1979).
- [41] J. Kopeček, Polim. Med. 7, 191 (1977).
- [42] L. G. Donaruma, O. Vogl: *Polymeric Drugs*. Academic Press, New York 1978.
- [43] O. Vogl, D. Tirelli, J. Macromol. Sci. Chem. 13, 415 (1979).
- [44] I. Iliev, M. Georgieva, V. Kabaivanov, Russ. Chem. Rev. 43, 69 (1974).
- [45] H. Busch, Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 38, 94 (1979).
- [46] a) H. Jatzkewitz, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 297, 149 (1954); b) Z. Naturforsch. B 10, 27 (1955); c) K. P. Khomyakov, A. D. Virnik, Z. A. Rogovin, Russ. Chem. Rev. 33, 462 (1964); d) C. G. Overberger, H. Ringsdorf, B. Avchen, J. Med. Chem. 8, 862 (1965); e) H. Ringsdorf, Strahlentherapie 132, 627 (1967).
- [47] A. Gresser, Dtsch. Med. Wochenschr. 88, 2217 (1963).
- [48] C. G. Zubrod, Cancer Res. 38, 4377 (1978).
- [49] C. Abel, T. A. Connors, W. C. Ross, N. H. Nam, H. Hoellinger, L. Pichat, Eur. J. Cancer 9, 49 (1973).
- [50] Allerdings zeigte auch das entsprechende Sulfadiazin-haltige Polymer nicht die gewünschte Anreicherung im Tumor; vgl. dazu: a) V. Hofmann, H. Ringsdorf, E. Schaumlöffel, Makromol. Chem. 180, 595 (1979); b) G. Abel, T. A. Connors, V. Hofmann, H. Ringsdorf, ibid. 177, 2669 (1976).
- [51] T. A. Connors [Top. Curr. Chem. 52, 152 (1974)] berichtet über ein Sulfadiazin-Derivat mit einer Triazengruppe als aktive Spezies; dieser Stoff wird im Tumor angereichert.
- [52] Vgl. S. Neidle, Nature 268, 196 (1977).
- [53] H. Ringsdorf in [40a], S. 197.
- [54] Vgl. z. B. a) K. F. Mück, O. Christ, H. M. Kellner, Makromol. Chem. 178, 2785 (1977); b) V. Hofmann, H. Ringsdorf, E. Schaumlöffel, ibid. 181, 351 (1980); c) L. Šprinc, J. Exner, V. Šterba, J. Kopeček, J. Biomed. Mater. Res. 10, 953 (1976); d) G. Lindblad, J. Falk, Infusionstherapie 3, 301 (1976).
- [55] S. I. Rapoport: *Blood-Brain Barrier in Physiology and Medicine*. Raven Press, New York 1976.
- [56] Vgl. z. B. G. Hecht, Ther. Ber. 10, 264 (1956).
- [57] Vgl. z. B. E. Grundmann, Fortschr. Staublungenforsch. 2, 223 (1967).
- [58] K. F. Mück, H. Rolly, K. H. Burg, Makromol. Chem. 178, 2773 (1977).
- [59] W. C. Shen, H. J. P. Ryser, Mol. Pharmacol. 16, 614 (1979).
- [60] a) H. Morawetz, J. Macromol. Sci. Chem. 13, 311 (1979); b) M. A. Kraus, A. Patchornik, J. Polym. Sci. Macromol. Rev. 15, 55 (1980), speziell S. 90 ff.
- [61] J. Heller, R. W. Baker, R. M. Gale, J. O. Rodin, J. Appl. Polym. Sci. 22, 1991 (1978).
- [62] a) K. J. Netter, H. Ringsdorf, H. C. Wilk, Makromol. Chem. 177, 3527 (1976); b) J. Kálal, J. Drobnik, J. Kopeček, J. Exner, Br. Polym. J. 10, 111 (1978); c) J. Kálal, J. Drobnik, J. Kopeček, J. Exner in [42], S. 131.
- [63] E. Hurwitz, R. Maron, A. Bernstein, M. Wilchek, M. Sela, R. Arnon, Int. J. Cancer 21, 747 (1978).
- [64] a) J. Vidal-Gomez, L. Hammarström, C. I. E. Smith, Scand. J. Immunol. 8, 313 (1978); J. Vidal-Gomez, ibid. 8, 323 (1978); b) R. Schnee, Dissertation, Universität Mainz 1980; c) L. Gros, J. B. Lloyd, H. Ringsdorf, E. Rude, R. Schnee, H. U. Schorlemmer, H. Stötter, IUPAC Int. Symp. Macromol., Florenz 1980, Preprints 4, 65 (1980).
- [65] a) C. E. Hall, O. Hall [Experientia 18, 38 (1962)] beschreiben z. B. das Auftreten von arteriellem Hochdruck („macromolecular hypertension“) und der Vergrößerung von Organen als Folge der subcutanen Injektion von Poly(vinylalkohol)-Lösungen. Die Körperverträglichkeit von Polymeren diskutieren z. B. b) J. Kálal, Makromol. Chem. Suppl. 2, 215 (1979); c) S. D. Bruck, Pure Appl. Chem. 46, 221 (1976).
- [66] Vgl. z. B. a) [62c], S. 149; b) P. Ferruti, M. C. Tanzi, F. Vaccaroni, Makromol. Chem. 180, 375 (1979).
- [67] E. D. Korn, MTP Int. Rev. Sci. Biochem. Ser. I, 2, 1 (1975).
- [68] a) H. J. P. Ryser, Proc. Int. Congr. Pharmacol. 4th 3, 96 (1970); b) Science 159, 390 (1968).
- [69] a) Z. A. Cohn, E. Parks, J. Exp. Med. 125, 213 (1967); b) H. J. P. Ryser, Nature 215, 934 (1967); c) H. J. P. Ryser, M. P. Gabathuler, A. B. Roberts, Biomembranes 2, 197 (1971); d) C. J. van Oss, C. F. Gillman, A. W. Neumann: *Phagocytotic Engulfment and Cell Adhesiveness*. Marcel Dekker, New York 1975; e) T. Kooistra, A. M. Duursma, J. M. W. Bouma, M. Gruber, Biochim. Biophys. Acta 587, 282 (1980); f) T. Kooistra, A. M. Duursma, M. K. Bijsterbosch, J. M. W. Bouma, M. Gruber, ibid. 587, 298 (1980); g) J. Quintart, M. A. Leroy-Houyet, A. Trouet, P. Baudhuin, J. Cell Biol. 82, 644 (1979).
- [70] A. J. Sbarra, W. Shirley, W. A. Bardawil, Nature 194, 255 (1962).
- [71] A. Trouet in [40a], S. 157.
- [72] a) C. de Duve, Th. de Varsy, B. Poole, A. Trouet, P. Tulkens, F. van Hoof, Biochem. Pharmacol. 23, 2495 (1974); b) P. Couvreur, B. Kante, M. Roland, J. Pharm. Belg. 35, 51 (1980).
- [73] a) D. S. Breslow, Pure Appl. Chem. 46, 102 (1976); b) P. Pucetti, A. Giampetri, Pharmacol. Res. Commun. 10, 489 (1978).
- [74] T. C. Merigan, M. S. Finkelstein, Nature 214, 416 (1968).
- [75] L. G. Donaruma, R. M. Ottenbrite, O. Vogl: *Anionic Polymeric Drugs*. Wiley, New York 1980.
- [76] Vgl. [28a], S. 370.
- [77] a) R. E. Falk, L. Makowka, N. Nossal, J. A. Falk, J. E. Fields, S. S. Asculai, Br. J. Surg. 66, 861 (1979); b) Br. Pat.-Anm. GB 2040951 A.
- [78] R. E. Falk, L. Makowka, L. E. Roitstein, R. A. Bugala, J. A. Falk, N. Nossal, U. Ambus, noch unveröffentlicht.
- [79] R. Bierling, G. D. Wolf, B. Bömer, Naturwissenschaften 67, 366 (1980).
- [80] M. Przybylski, E. Fell, H. Ringsdorf, D. Zaharko, Makromol. Chem. 179, 1719 (1978).
- [81] M. Przybylski, D. S. Zaharko, M. A. Chirigos, R. H. Adamson, R. M. Schultz, H. Ringsdorf, Cancer Treat. Rep. 62, 1837 (1978).
- [82] M. Przybylski, W. P. Fung, H. Ringsdorf, R. H. Adamson, D. Zaharko, 69th Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res. 1978, Proc. Vol. 19, S. 2.
- [83] W. P. Fung, M. Przybylski, H. Ringsdorf, D. S. Zaharko, J. Natl. Cancer Inst. 62, 1261 (1979).
- [84] a) Vgl. [59]; b) vgl. auch M. Szekerke, J. S. Driscoll, Eur. J. Cancer 13, 529 (1977).
- [85] D. L. Hill: *A Review of Cyclophosphamide*. C. C. Thomas, Springfield 1975.
- [86] H. G. Bätz, H. Ringsdorf, H. Ritter, Makromol. Chem. 175, 2229 (1974).
- [87] a) N. Brock, H. J. Hohorst, Naturwissenschaften 49, 610 (1962); b) umfassende Übersicht: N. Brock, H. J. Hohorst, Z. Krebsforsch. 88, 185 (1977).
- [88] a) T. A. Connors, P. J. Cox, P. B. Farmer, A. B. Foster, M. Jarman, Biochem. Pharmacol. 23, 115 (1974); b) P. J. Cox, B. J. Phillips, P. Thomas, Cancer Res. 35, 3755 (1975).

- [89] A. Takamizawa, S. Matsumoto, T. Iwata, K. Katagiri, Y. Tochino, K. Yamaguchi, J. Am. Chem. Soc. 95, 985 (1973).
- [90] G. Peter, T. Wagner, H. J. Hohorst, Cancer Treat. Rep. 60, 429 (1976).
- [91] a) T. Hirano, W. Klesse, H. Ringsdorf, Makromol. Chem. 180, 1125 (1979); b) T. Hirano, W. Klesse, J. H. Heusinger, G. Lambert, H. Ringsdorf, Tetrahedron Lett. 1979, 883; c) T. Hirano, H. Ringsdorf, D. S. Zaharko, Cancer Res. 40, 2263 (1980).
- [92] P. Molz, H. Ringsdorf, G. Abel, P. Cox, Int. J. Biol. Macromol. 2, 245 (1980).
- [93] Überblick: M. Wilchek, Makromol. Chem. Suppl. 2, 207 (1979).
- [94] C. F. Rowland, G. J. O'Neill, D. A. L. Davies, Nature 255, 487 (1975); vgl. auch in Chemotherapy 8, 11 (1976).
- [95] G. F. Rowland, Eur. J. Cancer 13, 593 (1977).
- [96] Vgl. auch P. Franchimont, P. F. Zangerle, Eur. J. Cancer 13, 637 (1977).
- [97] F. M. Schabel, Jr., D. P. Griswold, Jr., W. R. Laster, Jr., T. H. Corbett, H. H. Lloyd, Pharmacol. Ther. Part A, 1, 411 (1977).
- [98] a) D. W. Weiss, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 89, 1 (1980); b) R. B. Herberman, Biochim. Biophys. Acta 473, 93 (1977); c) M. Herlyn, Z. Stieplewski, D. Herlyn, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1438 (1979); d) J. Schlom, D. Wunderlich, Y. A. Tlramoto, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6841 (1981).
- [99] L. J. Old, Sci. Am. 236 (5), 62 (1977).
- [100] a) G. Poste, A. C. Allison, Biochim. Biophys. Acta 300, 421 (1973); b) J. A. Lucy, J. Reprod. Fertil. 44, 193 (1975).
- [101] S. Sell: Immunologie, Immunpathologie und Immunität. Verlag Chemie, Weinheim 1977, S. 199.
- [102] a) D. Papahadjopoulos, W. J. Vail, K. Jacobson, G. Poste, Biochim. Biophys. Acta 394, 483 (1975); b) D. Papahadjopoulos, S. Hui, W. J. Vail, G. Poste, ibid. 448, 245 (1976).
- [103] a) G. Poste in [29b], S. 107; b) F. Szoka, K. Jacobson, D. Papahadjopoulos, Biochim. Biophys. Acta 551, 295 (1979); c) G. Gregoriadis in [29b], S. 36.
- [104] a) Y. Okahata, F. Murayama, K. Yamada, Virology 28, 115 (1966); b) G. Poste, C. A. Pasternak, Cell Surf. Rev. 5, 305 (1978).
- [105] a) J. Larsman, D. H. Haynes, Biochim. Biophys. Acta 394, 335 (1975); b) D. Papahadjopoulos, Cell Surf. Rev. 5, 766 (1978).
- [106] a) U. Zimmermann, J. Vienken, G. Pilwat, Bioelectrochem. Bioenerg. 7, 332 (1980); b) U. Zimmermann, B. Scheurich, Planta 151, 26 (1981); c) siehe U. Zimmermann, Angew. Chem. 93, 332 (1981); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 20, Nr. 4 (1981).
- [107] a) J. Ross McDougall in [29b], S. 340; b) G. Gregoriadis in [29b], S. 34; c) G. Poste in [29b], S. 105.
- [108] D. A. Tyrrell, T. D. Heath, C. M. Colley, B. E. Ryman, Biochim. Biophys. Acta 457, 259 (1976).
- [109] F. Martin, R. MacDonald, Nature 252, 161 (1974).
- [110] G. Scherphof, F. Roerdink, D. Hoekstra, J. Zborowski, E. Wisse in [29b], S. 179.
- [111] S. J. Singer, G. L. Nicolson, Science 175, 720 (1972).
- [112] F. S. Sjöstrand in S. Garattini, G. Franchi: Chemotherapy of Cancer Dissemination and Metastasis. Raven Press, New York 1973, S. 4.
- [113] S. J. Singer in G. Weissmann, R. Clairborne: Cell Membranes - Biochemistry, Cell Biology and Pathology. HP Publishing, New York 1975, S. 44.
- [114] a) B. Pearse, Trends Biochem. Sci. Pers. Ed. 1980, 131; b) C. D. Ockelford, A. Whyte: Coated Vesicles. Cambridge University Press, London 1980.
- [115] A. L. Lehninger, Biochemistry, Worth, New York 1970, S. 232; Biochemie. 2. Aufl. Verlag Chemie, Weinheim 1977.
- [116] J. Klein, Kontakte 3, 29 (1980).
- [117] C. M. Gupta, C. E. Costello, H. G. Khorana, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3139 (1979).
- [118] E. Sackmann, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 78, 929 (1974).
- [119] G. L. Gaines: Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces. Interscience, New York 1966.
- [120] H. C. Tien: Bimolecular Lipid Membranes, Theory and Practice. Marcel Dekker, New York 1974.
- [121] H. C. Huang, Biochemistry 8, 344 (1969).
- [122] G. Nöll, Biol. Unserer Zeit 6, 65 (1976).
- [123] A. Akimoto, K. Dorn, L. Gros, H. Ringsdorf, H. Schupp, Angew. Chem. 93, 108 (1981); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 20, 90 (1981).
- [124] J. H. Fendler, Acc. Chem. Res. 13, 7 (1980).
- [125] a) T. Kunitake, Y. Okahata, Chem. Lett. 1977, 1337; b) T. Kunitake, J. Macromol. Sci. Chem. 13, 587 (1979).
- [126] a) J. Fuhrhop, Nachr. Chem. Tech. Lab. 28, 792 (1980); b) E. Baumgartner, J. H. Fuhrhop, Angew. Chem. 92, 564 (1980); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 19, 550 (1980).
- [127] Y. Okahata, T. Kunitake, J. Am. Chem. Soc. 101, 5231 (1979).
- [128] S. L. Regen, B. Czech, A. Singh, J. Am. Chem. Soc. 102, 6638 (1980).
- [129] H. Bader, Diplom-Arbeit, Universität Mainz 1981.
- [130] B. Hupfer, H. Ringsdorf, H. Schupp, Makromol. Chem. 182, 247 (1981).
- [131] D. S. Johnston, S. Sanghera, M. Pons, D. Chapman, Biochim. Biophys. Acta 602, 57 (1980).
- [132] D. Day, H.-H. Hub, H. Ringsdorf, Isr. J. Chem. 18, 325 (1979).
- [133] K. Aliev, noch unveröffentlicht.
- [134] H. Koch, H. Ringsdorf, Makromol. Chem. 182, 255 (1981).
- [135] D. Tabor, J. Colloid Interface Sci. 75, 240 (1980).
- [136] L. Langmuir, J. Am. Chem. Soc. 39, 1848 (1917).
- [137] H.-H. Hub, B. Hupfer, H. Koch, H. Ringsdorf, J. Macromol. Sci. Chem., im Druck.
- [138] a) M. C. Phillips, D. Chapman, Biochim. Biophys. Acta 163, 301 (1968); b) R. E. Pagano, N. L. Gershfeld, J. Colloid Interface Sci. 44, 382 (1973); c) H.-D. Dörfler, W. Rettig, Colloid Polym. Sci. 258, 839 (1980).
- [139] a) E. Gorter, F. Grendel, J. Exp. Med. 41, 439 (1925); b) Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch. 29, 314 (1927).
- [140] a) T. Wiedmer, U. Brodbeck, P. Zahler, B. W. Fulpius, Biochim. Biophys. Acta 506, 161 (1978); b) B. D. Read, R. A. Demel, H. Wiegandt, L. L. M. van Deenen, ibid. 470, 325 (1977); c) Y. London, R. A. Demel, W. S. M. Geurts van Kessel, P. Zahler, L. L. M. van Deenen, ibid. 332, 69 (1974); d) G. Colacicco, M. M. Rapport, D. Shapiro, J. Colloid Interface Sci. 25, 5 (1967); e) D. Papahadjopoulos, M. Cowden, H. Kimelberg, Biochim. Biophys. Acta 330, 8 (1973).
- [141] R. A. Demel, W. S. M. Geurts van Kessel, R. F. A. Zwaal, B. Roelofs, L. L. M. van Deenen, Biochim. Biophys. Acta 406, 97 (1975).
- [142] a) [119], S. 281; b) D. J. Crisp in: Surf. Chem. Proc. Joint Meet. Faraday Soc. Chem. Phys., Butterworths, London 1967, S. 1944.
- [143] a) P. Schlieper, P. K. Medda, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 310, 195 (1980); b) M. A. Singer, Biochem. Pharmacol. 29, 2651 (1980).
- [144] A. Blume, Biochim. Biophys. Acta 557, 32 (1979).
- [145] D. Naegele, H. Ringsdorf in H.-G. Elias: Polymerization in Organized Systems. Midl. Macromol. Monogr. Vol. 3. Gordon and Breach, New York 1977, S. 79.
- [146] R. Ackermann, O. Inacker, H. Ringsdorf, Kolloid Z. Z. Polym. 249, 1118 (1971).
- [147] a) S. A. Letts, T. Fort, Jr., J. B. Lando, J. Colloid Interface Sci. 56, 64 (1976); b) M. Hatada, M. Nishii, J. Polym. Sci. 15, 927 (1977); c) D. Naegele, H. Ringsdorf, B. Tieke, G. Wegner, D. Day, J. B. Lando, Chem.-Ztg. 100, 426 (1976); d) D. Day, H. Ringsdorf, J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed. 16, 205 (1978); e) H. Ringsdorf, H. Schupp, Coat. Plast. Repr. Pap. Meet. Am. Chem. Soc. Div. Org. Coat. Plast. Chem. 42, 379 (1980).
- [148] a) D. Day, H. Ringsdorf, Makromol. Chem. 180, 1059 (1979); b) H.-H. Hub, Dissertation, Universität Mainz 1981.
- [149] a) G. Wegner, Makromol. Chem. 154, 35 (1972); b) R. H. Baughman, J. Appl. Phys. 43, 4362 (1972).
- [150] B. Tieke, G. Lieser, G. Wegner, J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed. 17, 1631 (1979).
- [151] G. N. Patel, J. D. Witt, Y. P. Khanna, J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed. 18, 1383 (1980).
- [152] A. D. Bangham, M. M. Standish, J. C. Watkins, J. Mol. Biol. 13, 238 (1965).
- [153] H. Bodemann, H. Passow, J. Membr. Biol. 8, 1 (1972).
- [154] a) J. N. Weinstein, S. Yoshikami, P. Heukart, R. Blumenthal, W. A. Hagins, Science 195, 489 (1977); b) H.-H. Hub, B. Hupfer, H. Koch, H. Ringsdorf, Angew. Chem. 92, 962 (1980); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 19, 938 (1980).
- [155] J. M. Gebicki, M. Hicks, Chem. Phys. Lipids 16, 142 (1976).
- [156] H. Schupp, Dissertation, Universität Mainz 1981.
- [157] W. Praß, Staatsexamensarbeit, Universität Mainz 1981.
- [158] G. Gregoriadis in [29b], S. 166.
- [159] C. M. Cohen, G. Weissmann, S. Hoffstein, Y. Awasthi, S. K. Srivastava, Biochemistry 15, 452 (1976).
- [160] G. Gregoriadis, E. D. Neerunjun, Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 537 (1975).
- [161] V. P. Torchilin, B. A. Khaw, V. N. Smirnov, E. Haber, Biochem. Biophys. Res. Commun. 89, 1114 (1979).
- [162] S. Roseman in [113], S. 55.
- [163] I. J. Goldstein: Carbohydrate-Protein Interaction. ACS Symp. Ser. 88 (1979).
- [164] a) G. A. Orr, R. R. Rando, F. W. Bangerter, J. Biol. Chem. 254, 4721 (1979); b) R. Y. Hampton, R. W. Holz, I. J. Goldstein, ibid. 255, 6766 (1980).
- [165] H. Bader, H. Ringsdorf, J. Skura, Angew. Chem. 93, 109 (1981); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 20, 91 (1981).
- [166] a) C. Milstein, Spektr. Wissensch. 1980 (12), 96; b) A. Huang, L. Huang, S. J. Kennel, J. Biol. Chem. 255, 8015 (1980).
- [167] R. Andreesen, M. Modolell, H. U. Weitzen, H. J. Eibl, H. H. Common, G. W. Löhr, P. G. Munder, Cancer Res. 38, 3894 (1978); vgl. auch: M. H. Runge et al., J. Natl. Cancer Inst. 64, 1301 (1980).
- [168] a) G. Valet, W. Opferkuch, J. Immunol. 115, 1028 (1975); b) E. R. Podack, G. Biesecker, H. J. Müller-Eberhard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 897 (1979).
- [169] K. Kano, Y. Tanaka, T. Ogawa, M. Shimomura, J. Okahata, T. Kunitake, Chem. Lett. 1980, 421.
- [170] M. B. Yatvin, W. Kreutz, B. A. Horwitz, M. Shinitzky, Science 210, 1253 (1980).
- [171] J. N. Weinstein, R. L. Magin, M. B. Yatvin, D. S. Zaharko, Science 204, 188 (1979).
- [172] D. G. Whitten, Angew. Chem. 91, 472 (1979); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 18, 440 (1979).
- [173] Vgl. R. Breslow, Acc. Chem. Res. 13, 170 (1980).
- [174] a) M. Grätzel, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 84, 981 (1980); b) K. Monserat, M. Grätzel, P. Tundo, J. Am. Chem. Soc. 102, 5527 (1980); c) H. Tien, Sep. Sci. Technol. 15, 1035 (1980).

- [175] Vgl. a) T. Shimidzu, *Adv. Polym. Sci.* 23, 55 (1977); b) H. J. Fendler, E. J. Fendler: *Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems*. Academic Press, New York 1975. c) R. A. Moss, Y. S. Lee, K. W. Alwis, *J. Am. Chem. Soc.* 102, 6646 (1980).
- [176] a) T. S. Chang, *Science* 146, 524 (1964); b) J. Kreuter, *Pharm. Acta Helv.* 53, 33 (1978); c) Y. T. Yu, T. M. S. Chang, *Biomater., Med. Devices, Artif. Organs* 8, 273 (1980); d) M. F. Lim, A. M. Sun, *Science* 210, 908 (1980); e) N. Sliwka, *Angew. Chem.* 87, 556 (1975); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 14, 539 (1975).
- [177] G. Weissmann, R. Claiborne: *Cell Membranes - Biochemistry, Cell Biology and Pathology*. H. P. Publishing, New York 1975.
- [178] H. Fischer, E. Rüde, D. Sellin, *Naturwissenschaften* 57, 507 (1970).
- [179] K. Dose, Th. Nawroth, N. Wagner, persönliche Mitteilung.
- [180] U. Zimmermann, J. Schultz, G. Pilwat, *Biophys. J.* 13, 1005 (1973).
- [181] P. Scheurich, U. Zimmermann, M. Mischel, J. Lamprecht, *Z. Naturforsch. C* 35, 1081 (1980).
- [182] N. J. Harper, *J. Med. Pharm. Chem.* 1, 467 (1959).
- [183] Für die freundliche Überlassung des Originals danken wir Professor H. von Saalfeld vom Fachbereich Kunsterziehung der Universität Mainz recht herzlich.

Zellen mit manipulierten Funktionen: Neue Perspektiven für Zellbiologie, Medizin und Technik

Von Ulrich Zimmermann, Peter Scheurich, Günter Pilwat und Roland Benz^[*]

Die elektrische Leitfähigkeit und Permeabilität einer Zellmembran, die den Stoff- und Informationsaustausch zwischen Zelle und Umgebung reguliert und steuert, läßt sich durch elektrische Felder reversibel erhöhen. Wenn Zellmembranen (oder auch künstliche Lipidmembranen) einem Feldpuls hoher Intensität und kurzer Dauer (ns bis μ s) ausgesetzt werden, kommt es zu einem lokalen elektrischen Durchbruch der Membran. Der elektrische Durchbruch ist mit einer so großen Permeabilitätsänderung der Membran verbunden, daß normalerweise membran-impermeable Substanzen und Teilchen (bis zur Größe von Genen) in die Zelle geschleust werden können. Die ursprünglichen Eigenschaften der Membran regenerieren sich – je nach Bedingungen – innerhalb von μ s bis min. Der elektrische Durchbruch in der Membrankontaktzone von Zellen (oder Lipidvesikeln), die durch Einwirkung schwacher, inhomogener elektrischer Wechselfelder aneinandergelagert worden sind, führt zur Verschmelzung (Fusion) dieser Zellen. Dabei bildet sich eine Zelle mit neuen funktionellen Eigenschaften. Das Fusionsverfahren ist sehr schonend, und die Ausbeute an fusionierten Zellen ist hoch. Die elektrisch induzierte Fusion und die Einschleusung von membran-impermeablen Substanzen und Genen in Zellen ermöglichen es, eine Vielfalt von Zellen mit manipulierten Funktionen zu gewinnen, mit denen viele Probleme der Zellbiologie, Medizin und Technik gelöst werden können (oder bereits gelöst worden sind). Diskutiert werden die Anwendungen des elektrischen Durchbruches der Membran für die klinische Diagnostik, die Entwicklung von zellulären Trägersystemen für den selektiven Transport von Pharmaka zu einem Wirkungsort im Organismus und die potentiellen Möglichkeiten der elektrisch induzierten Fusion zur Züchtung von salztoleranten Kulturpflanzen, zur Umwandlung von Kohlendioxid und Wasser mit Sonnenenergie in Ethanol, zur Synthese von Naturstoffen und zur Genmanipulation.

1. Einleitung

Die zunehmende Nachfrage nach hochwertigen Naturstoffen und Pharmaka für medizinische und technische Anwendungen sowie die immer drängender werdenden Probleme einer ausreichenden Ernährung und Energieversorgung der Weltbevölkerung haben in den letzten Jahren dazu geführt, verstärkt nach neuen Technologien unter Verwendung von biologischen Systemen zu suchen. Dieses interdisziplinäre Forschungsgebiet, das Teilbereiche aus Chemie, Physik,

Biologie und Medizin umfaßt, wird als Biotechnologie bezeichnet. Die industrielle Anwendung von Mikroorganismen für die Herstellung von medizinisch und technisch interessanten Wirkstoffen und Pharmaka hat bereits beachtliche Erfolge zu verzeichnen, obgleich dieses Gebiet sicherlich noch in den Anfängen steckt^[1].

Die Entwicklung der Photosynthese im Verlauf der Evolution ermöglicht es pflanzlichen Zellen, solare Energie mit einem hohen Wirkungsgrad in chemische Energie umzuwandeln, die ihrerseits von anderen Zellen und Organismen in osmotische, mechanische und elektrische Arbeit umgewandelt werden kann. Technisch sind wir jedoch vom Ziel der Sonnenenergiekonversion noch weit entfernt.

Viele Organismen wie Algen und Bakterien haben das Problem gelöst, in salzhaltiger Umgebung optimal zu leben, d. h., zu wachsen und sich zu vermehren. Die Salzadaptation von Kulturpflanzen in Verbindung mit einer Bewässerung

[*] Prof. Dr. U. Zimmermann, Dr. P. Scheurich, Dr. G. Pilwat
Arbeitsgruppe Membranforschung am Institut für Medizin
der Kernforschungsanlage
Postfach 1913, D-5170 Jülich 1
Priv.-Doz. Dr. R. Benz
Fakultät für Biologie der Universität
D-7750 Konstanz