

# Orale Verabreichung von Protein- und Peptidwirkstoffen entlang der Vitamin-B<sub>12</sub>-Route

Amanda K. Petrus, Timothy J. Fairchild\* und Robert P. Doyle\*

Biokonjugate · Medizinische Chemie ·

Proteine/Peptide · Vitamin B<sub>12</sub> · Wirkstofftransport

**D**er oralen Verabreichung therapeutischer Peptide und Proteine stehen zwei größere Hindernisse entgegen: der proteolytische Abbau im Magen und ein unzureichender Absorptionsmechanismus für Polypeptide aus dem Darmlumen. Daher müssen Therapeutika auf Proteinbasis über Injektionen verabreicht werden – ein schmerzhafter Vorgang, der auf geringere Zustimmung beim Patienten stößt. Daher war es das Ziel umfangreicher Forschungsarbeiten, diese beiden Hindernisse zu überwinden und die erfolgreiche orale Verabreichung von Peptidtherapeutika zu ermöglichen. Dieser Kurzaufsatz konzentriert sich auf die orale Peptid/Protein-Verabreichung über den bestehenden Aufnahmeweg für Vitamin B<sub>12</sub> aus der Nahrung. Aktuelle Fortschritte auf diesem Gebiet schließen die Verabreichung von Erythropoietin, des Granulocyten stimulierenden Faktors, des Luteinizerungshormon freisetzenden Hormons und von Insulin ein.

## 1. Einführung

Mehrere Faktoren machen die orale Verabreichung von Peptiden und Proteinen zu einem Hauptziel der Wirkstoffaufnahme.<sup>[1]</sup> Um die Herausforderungen zu meistern, die sich aus dem Transport, der Permeabilität, der gastrointestinalen Stabilität und der Größe von Proteinkomplexen ergeben, wurden unterschiedliche Wege untersucht. Im Rahmen dieses Kurzaufsatzen konzentrieren wir uns auf das Aufnahmesystem von Vitamin B<sub>12</sub> (Cobalamin), das in den letzten 10 Jahren verstärkt beachtet wurde. Vitamin B<sub>12</sub> (kurz: B<sub>12</sub>) ist für alle Tiere einschließlich des Menschen ein essenzieller Nahrungsbestandteil und Cofaktor. B<sub>12</sub> ist ein komplexes Molekül, das aus einer Nucleotideinheit und einem planaren porphyrinähnlichen Corrin-Ringsystem mit einem Cobalt(III)-Zentrum besteht (Abbildung 3). Es wird von Bakterien synthetisiert und von Säugetieren über die Nahrungskette auf-

genommen; die produzierenden Mikroorganismen können auch im tierischen Darm oder Pansen vorkommen. In der menschlichen Ernährung bildet die Aufnahme von Fleisch, Leber, Fisch, Eiern und Milch die Hauptquelle für Vitamin B<sub>12</sub>. Erwachsene nehmen täglich durchschnittlich 5–30 µg Vitamin B<sub>12</sub> zu sich, und bei einem gesunden Erwachsenen speichert der Körper normalerweise ca. 2–3 mg (mit einer ständigen Reserve in der Leber von ca. 1 mg). Die Existenz eines enterohepatischen Kreislaufs (1,4 µg pro Tag aus Gallensalzen) gekoppelt mit Körperspeichern erklärt, warum nach der Unterbrechung der B<sub>12</sub>-Absorption jahrelang kein B<sub>12</sub>-Mangel auftritt.

Die Nutzung des komplizierten B<sub>12</sub>-Aufnahmewegs zur Verabreichung von Arzneimitteln wurde schon in den 1970er Jahren erwogen, aber erst Fortschritte in den vergangenen 10 Jahren haben das Interesse an diesem Weg wieder entfacht. Die Verwendung von B<sub>12</sub> für den oralen Wirkstofftransport hängt im Wesentlichen von der Fähigkeit ab, B<sub>12</sub> als effektives Wirkstofftransportmittel anzupassen. Dies ist stark abhängig vom Mechanismus, durch den B<sub>12</sub> geschützt und vom Magen-Darm-Trakt absorbiert wird. Hier werden wir auf dieses Thema nur kurz eingehen; Lit. [2] liefert detaillierte Informationen.

B<sub>12</sub> wird durch Verdauungsenzyme und die acide Umgebung des Magen-Darm-Systems aus der Nahrung herausgelöst. Danach wird es durch zwei Glycoproteine, den Intrinsischen Faktor und Haptocorrin, gebunden und transportiert. Haptocorrin wird von Speicheldrüsen abgesondert und zusätzlich von der Magenschleimhaut abgegeben.

Speichel-Haptocorrin (HC; auch Transcobalamin I (TCI) oder R-Binder) hat bei pH < 3 eine hohe Affinität zu B<sub>12</sub> und

[\*] Prof. T. J. Fairchild

Department of Exercise Science  
Syracuse University, Syracuse NY 13244 (USA)  
E-Mail: [tjfairch@syr.edu](mailto:tjfairch@syr.edu)

A. K. Petrus, Prof. R. P. Doyle  
Department of Chemistry  
Syracuse University, Syracuse, NY 13244-4100 (USA)  
Fax: (+1) 315-443-4070  
E-Mail: [rdoyle@syr.edu](mailto:rdoyle@syr.edu)  
Homepage: <http://www-chem.syr.edu/faculty/doyle.html>

bindet es, wodurch dieses unter sauren Bedingungen vor Hydrolyse geschützt ist. Es reduziert auch das Abfangen durch die Darmfauna. Der HC:B<sub>12</sub>-Komplex wandert vom Magen zum Zwölffingerdarm, wo der erhöhte pH-Wert die Affinität von HC für B<sub>12</sub> verringert. Enzyme der Bauchspeicheldrüse verdauen dort HC und setzen B<sub>12</sub> frei.<sup>[36]</sup> B<sub>12</sub> bindet dann an das zweite der beiden Transporter-Glycoproteine aus dem Magen, den Intrinsischen Faktor (IF, Abbildung 1).

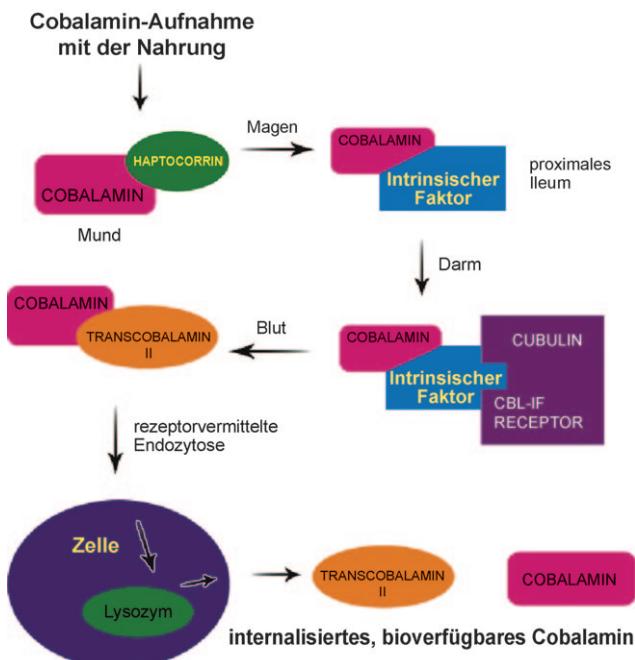


Abbildung 1. Aufnahmeweg für Vitamin B<sub>12</sub> aus der Nahrung.

IF wird sowohl von der Magenschleimhaut als auch von der Bauchspeicheldrüse abgesondert und erleichtert den Transport durch die Enterocyten, der durch rezeptorvermittelte Endozytose über den apikal exprimierten IF-B<sub>12</sub>-Rezeptor (Cubulin) erfolgt. Im Anschluss an die Transcytose – 2.5 bis 4 h nach der Nahrungsaufnahme – erscheint B<sub>12</sub> an Transcobalamin II (TCII; Abbildung 2) gebunden im Blutplasma. B<sub>12</sub> wird dann über den TCII:B<sub>12</sub>-Rezeptor durch

Amanda Petrus wurde 1981 in Flint, Michigan, US geboren und erhielt ihren BS in Chemie 2003 an der SUNY Fredonia. 2002 nahm sie eine NSF-finanzierte REU-Stelle in den Laboratorien von Prof. Jeffery Stuart und Prof. Robert Birge am W. M. Keck Center for Molecular Electronics an der Syracuse University an, wo sie den Photozyklus von Bakteriorhodopsin untersuchte. Gegenwärtig fertigt sie in der Gruppe von Prof. Robert P. Doyle an der Syracuse University ihre Doktorarbeit an. Sie beschäftigt sich mit oralen Verabreichungsformen von Insulin unter Nutzung des Aufnahmewegs für Vitamin B<sub>12</sub>.

Timothy Fairchild promovierte an der University of Western Australia unter der Leitung von Prof. Paul A. Fournier über den Glycogenmetabolismus. Nach Tätigkeiten an der Edith Cowan University und der University of Notre Dame (Australien) wechselte er als Professor of Exercise Physiology an die Syracuse University. Er ist gegenwärtig Direktor des Healthworks Laboratory. Seine Forschungsaktivitäten sind auf Therapieansätze zur Behandlung von Diabetes und Adipositas gerichtet.

Robert Doyle wurde 1976 in Dublin, Irland, geboren. Er erhielt 1998 seinen BA in Naturwissenschaften am Trinity College, Dublin, und promovierte dort 2002 in Chemie unter der Anleitung von Dr. Paul E. Kruger. Nach einem Jahr an der Australian National University trat er als Postdoktorand in die Arbeitsgruppe von Prof. Ann M. Valentine an der Yale University ein. 2005 wechselte er als Assistant Professor an die Syracuse University. Seine Forschungsinteressen konzentrieren sich auf die Rolle von Metallen in Biologie und Medizin und den gezielten Wirkstofftransport zur Behandlung von Diabetes und Adipositas.



Endozytose in die Zellen aufgenommen und nach dem Abbau von TCII durch Lysozym freigesetzt.

## 2. Chemische Aspekte

Unabdingbar ist es, die Bindung zwischen B<sub>12</sub> und jedem der bindenden Proteine zu kennen, da ein potenzielles Therapeutikum idealerweise so mit B<sub>12</sub> verknüpft sein sollte, dass die extrem hohe Affinität (IF, TC und HC:  $K_d \approx 5 \text{ fm}$ ) der unterschiedlichen B<sub>12</sub>-Transportproteine für das modifizierte B<sub>12</sub> unverändert bleibt. Der Mechanismus für die Diskriminierung zwischen B<sub>12</sub> und B<sub>12</sub>-Analoga und den spezifischen B<sub>12</sub>-bindenden Proteinen ist kürzlich untersucht worden.<sup>[3]</sup>

Für eine erfolgreiche Nutzung des B<sub>12</sub>-Wegs ist es besonders wichtig, B<sub>12</sub> und das Peptid/Protein so miteinander zu verknüpfen, dass keine Komponente durch die andere behindert wird. Das Vitamin muss noch durch die an seiner Aufnahme beteiligten Proteine erkannt werden, und das Peptid/Protein muss mit seinem Rezeptor/Target wechsel-

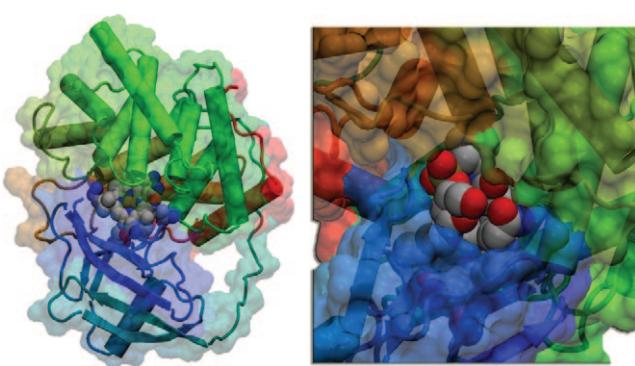
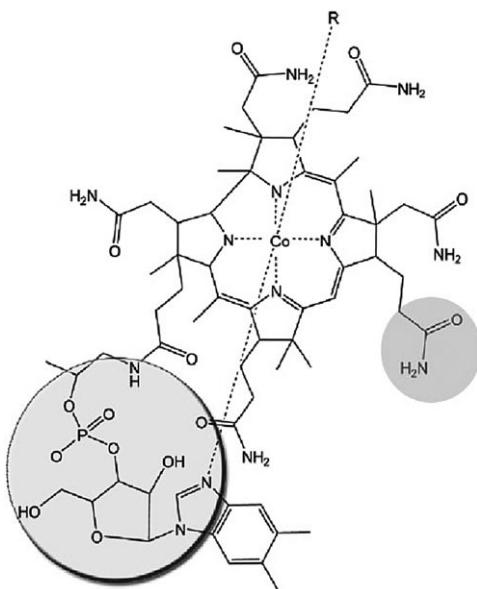


Abbildung 2. Holo-TCII mit gebundenem Vitamin B<sub>12</sub>. Ein für Lösungsmittel zugänglicher Bereich von B<sub>12</sub> um die Riboseeinheit ist rechts gezeigt. Die Bilder wurden von Dr. Damian Allis erstellt.

wirken können, um den gewünschten Effekt hervorzurufen. Um dies zu erreichen, müssen auf beiden Molekülen bestimmte Stellen für die Konjugation ausgewählt werden, die – bekanntermaßen oder postuliert – weder für die Erkennung noch für die Aktivität von Bedeutung sind.

$B_{12}$  und das Peptid/Protein können 1) direkt miteinander gekuppelt werden oder 2) durch einen Abstandhalter von einander getrennt sein; schließlich können 3) Träger mit  $B_{12}$  konjugieren, wobei das gewünschte Peptid/Protein unkonjugiert im Träger enthalten ist. Die Konjugation von Peptiden/Proteinen mit  $B_{12}$  nach diesen Methoden war an drei Stellen erfolgreich: direkte Konjugation des Peptids 1) mit den Propionamidresten in der Peripherie des Corrinrings (es gibt drei, aber die  $\epsilon$ -Position vermeidet eine Störung bei der IF-Aufnahme), 2) über die 5'-Hydroxygruppe der Riboseeinheit am  $\alpha$ -„Ende“ von  $B_{12}$  und 3) mit der Phosphateinheit, ebenfalls am  $\alpha$ -„Ende“ (Abbildung 3).



**Abbildung 3.** Die markierten B<sub>12</sub>-Bereiche eignen sich zur Konjugation, ohne die Affinität für die Transportproteine entscheidend zu beeinträchtigen. R = OH (Hydroxocobalamin); R = CN (Cyanocobalamin); R = Ado (5'-Desoxyadenosylcobalamin).

Jede Stelle kann ausgewählt werden, je nachdem, wie die chemische Synthese am einfachsten ist oder welche Art der chemischen Bindung oder des Abstandhalters gewünscht wird. Eine erfolgreiche Aufnahme wurde für jede der drei Positionen nachgewiesen. Das  $\epsilon$ -Propionamid wird durch Erhitzen in Säure unter Rückfluss in die Carbonsäure umgewandelt, und das gewünschte  $\epsilon$ -Monocarbonsäure- $B_{12}$ -Derivat wird durch Säulenchromatographie isoliert. Zur Kupplung wurden dann gebräuchliche Agentien wie DCC, EDAC, CDI, CDT oder SPDP eingesetzt (siehe Tabelle 1). Eine vierte Konjugationsstelle, die zur Herstellung oral verabreicherbarer niedermolekularer Verbindungen genutzt wurde, ist die  $\beta$ -axiale Position am Cobaltatom von  $B_{12}$ . Dies bedingt normalerweise die Reduktion von  $Co^{III}$  zum stark nucleophilen  $Co^I$  (durch Natriumborhydrid oder  $Zn/HCl$ ) unter

stremem Sauerstoffausschluss und die anschließende Reaktion mit einer Organohalogenverbindung. Die metallorganische Co-C-Bindung ist höchst instabil und lichtempfindlich. In Anbetracht der extremen Reaktionsbedingungen und der resultierenden instabilen Konjugate wurde dieser Weg hinsichtlich der Peptid/Protein-Verabreichung nicht erforscht. Für interessante Beispiele zur Anknüpfung niedermolekularer Verbindungen über das Cobaltzentrum und zum In-vivo-Transport sei der Leser auf Arbeiten von Alberto et al.<sup>[4]</sup> und Grissom et al.<sup>[5]</sup> verwiesen.

Schließlich verwendeten Olesen et al.<sup>[6]</sup> für Rinderse-rumalbumin eine fünfte Stelle, und zwar an der Desoxyadenosylgruppe, wenn 5'-Desoxyadenosylcobalamin als B<sub>12</sub>-Quelle eingesetzt wurde. Diese Reaktion ergab geringe Ausbeuten und lieferte, wie die direkte Konjugation am Cobaltatom, ein stark lichtempfindliches Produkt.

Insgesamt wurde die Konjugation über die  $\beta$ -Ligandposition am Cobaltatom vermieden, statt dessen wurde gewöhnlich die sehr stark bindende Cyanogruppe verwendet, um diese Position während der Konjugation an der Peripherie zu blockieren.

## 2.1. *B<sub>12</sub>-Peptid/Protein-Konjugate*

Die erste Publikation über ein  $B_{12}$ -Protein-Konjugat wurde 1971 veröffentlicht (siehe Tabelle 1).<sup>[6]</sup> In dieser Studie bildeten Olesen et al. Biokonjugate mit Rinderserumalbumin (über Ethyldimethylaminopropylcarbodiimid (EDAC) zur Phosphateinheit von  $B_{12}$  mit Hydroxocobalamin als Ausgangsstoff) und mit succinyliertem  $\gamma$ G-Globulin (unter Verwendung von 5'-Desoxyadenosylcobalamin als Ausgangsstoff, was zur Konjugation mit der Aminogruppe der Desoxyadenosyleinheit führte). Sie untersuchten diese Konjugate nicht hinsichtlich eines Wirkstofftransports, sondern deswegen, weil es 1970 noch schwierig war,  $B_{12}$ -bindende Proteine wie IF und TCII zu isolieren, und sie folgerten, dass die Immobilisierung dieser Konjugate auf Celluloseträgern einen Weg zur Isolierung von Aufnahmeproteinen aus dem Serum durch Affinitätschromatographie eröffnen könnte. Die Forscher isolierten mit einer solchen Vorgehensweise erfolgreich  $B_{12}$ -Proteine aus humanem Magensaft und Serum.

Durch die Herstellung von  $B_{12}$ -Biokonjugaten für Radioimmunassays drangen solche Systeme weiter ins klinische Umfeld vor. Dieses Gebiet wurde während der 1970er Jahre durch die Gruppen von Woldring,<sup>[7-9]</sup> Niswender<sup>[10]</sup> und Ahrenstedt erschlossen.<sup>[11]</sup> Ihr Ansatz umfasste die Konjugation von  $B_{12}$  mit humanem Serumalbumin (HSA), um Antigene herzustellen, zu denen Antikörper erzeugt werden konnten. Eine orale Verabreichung wurde nicht berücksichtigt, sondern eher eine subkutane Injektion.  $B_{12}$  wurde gewöhnlich unter Verwendung von Carbodiimid-Kupplungsreagentien mit oder ohne *N*-Hydroxysuccinimid an HSA konjugiert. Die Injektion mit  $B_{12}$ -HSA-Verbindungen induzierte in Kaninchen eine Antikörperreaktion.

Obwohl schon diese frühen Beiträge zu B<sub>12</sub>-Protein-Konjugaten zur Erforschung von B<sub>12</sub>-Protein-basierten Immunassays führten (siehe zum Beispiel neuere Patente von Bio-Rad Laboratories<sup>[12,13]</sup>), begann sich das Gebiet der B<sub>12</sub>-

**Tabelle 1:** Wichtige  $B_{12}$ -Protein/Peptid-Biokonjugate.<sup>[a]</sup>

Protein/Peptid	Größe [kDa]	Konjugationsstelle	Linker <sup>[d]</sup> (Kupplungsreagens)	Aktivität	Jahr	Lit.
<i>Direkt konjugiert:</i>						
BS-Albumin	66	Phosphat	Phosphat-Amin (EDAC)	n.b. <sup>[e]</sup>	1971	[6]
$\gamma$ G-Globulin	150	Phosphat	Phosphat-Amin (EDAC)	n.b. <sup>[e]</sup>	1971	[6]
HS-Albumin	66	$\epsilon$ -Monocarboxy	GABA (EDAC)	Antikörperantwort	1974	
					1978	[11]
					1979	
IFN-con	22	5'-Ribosehydroxy	Glutaryl (CDI)	24–28 % Aktivität <sup>[b]</sup>	1994	[34]
G-CSF	19.6	$\epsilon$ -Monocarboxy	Disulfid (SPDP)	61–66 % Aktivität <sup>[c]</sup>	1995	[14]
			Amid (EDAC)	29–85 % Aktivität <sup>[c]</sup>		
EPO	34	$\epsilon$ -Monocarboxy	Hydrazid (EDAC)	n.b. <sup>[e]</sup> bis 100 % Aktivität <sup>[c]</sup>	1995	[14]
			Amid (EDAC)	n.b. <sup>[e]</sup> bis 34 % Aktivität <sup>[c]</sup>		
			Hydrazid (EDAC)	17–22 % Aktivität <sup>[c]</sup>		
			(DSS)			
ANTIDE-1	1.6	$\epsilon$ -Monocarboxy	EGS (EDAC)	n.b. <sup>[e]</sup>	1995	[16]
			Amid (EDAC)	30 % IF-Erkennung		
			Disulfid (SPDP)	65 % IF-Erkennung		
			sterisch gehindertes Thiol (SMPT)	54 % IF-Erkennung		
			Thioester (NHS-Ester von Iodessigsäure)	81 % IF-Erkennung		
			Transglutamase-spaltbares Tetrapeptid (EDAC)	60 % IF-Erkennung		
ANTIDE-3	1.6	$\epsilon$ -Monocarboxy	EGS (EDAC)	n.b. <sup>[e]</sup>	1995	[16]
			Amid (EDAC)	n.b. <sup>[e]</sup>		
			Disulfid (2-iminothiolan)	n.b. <sup>[e]</sup>		
			sterisch gehindertes Thiol (SMPT)	37 % IF-Erkennung		
			Thioester (NHS-Ester der Iodessigsäure)	65 % IF-Erkennung		
			Transglutamase-spaltbares Tetrapeptid (EDAC)	48 % IF-Erkennung		
LHRH	1.2	$\epsilon$ -Monocarboxy	Amid (DCC/NHS)	45 % absorbiert	2000	[33]
DP3	0.9	$\epsilon$ -Monocarboxy	Amid (EDAC)	23 % absorbiert	2000	[33]
			Hexyl (EDAC)	42 % absorbiert		
Insulin	5.7	5'-Ribosehydroxy	Amid (CDI, CDT)	26 % Abnahme des Blutglucosespiegels	2007	[30]
<i>Verabreichung von eingeschlossenem Insulin:</i>						
mit $B_{12}$ bedeckte Dextran-Nanopartikel	5.7	$\epsilon$ -Monocarboxy	Amid (CDI)	70–75 % Abnahme der Plasmaglucose	2007	[31]
mit $B_{12}$ bedeckte Dextran-Nanopartikel	5.7	$\epsilon$ -Monocarboxy	Amid (CDI)	70–75 % Abnahme der Plasmaglucose	2007	[32]

[a] Abkürzungen: BS = Rinderserum, HS = humanes Serum, IFN-con = Consensus-Interferon, G-CSF = Granulocytenkolonie-stimulierender Faktor, EPO = Erythropoietin, ANTIDE = N-Ac-d-Nal(2), D-Phe (pCl), D-Pa1(3), Ser, Lys (Nic), D-Lys (Nic), Leu, Lys(iPr), Pro, D-Ala-NH<sub>2</sub>; LHRH = Luteinisierungshormon freisetzendes Hormon, DP3 = Octapeptid (Glu-Ala-Ser-Ala-Ser-Tyr-Ser-Ala), GABA =  $\gamma$ -Aminobuttersäure, EDAC = 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid, CDI = 1,1'-Carbonyldiimidazol, SPDP = N-Succinimidyl-3-(2-pyridylidithio)-propionat, DSS = Disuccinimidylsüberat, SMPT = 4-[(Succinimidyl)oxy]-carbonyl- $\alpha$ -methyl- $\alpha$ -(2-pyridylidithio)toluol, NHS = N-Hydroxysuccinimid, DCC = N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, CDT = 1,1'-Carbonyl-di-(1,2,4-triazol), EGS = Ethylenglycolbis(succinimidylsuccinat). [b] Verglichen mit nativem IFN-con. [c] Verglichen mit nicht-konjugiertem G-CSF und EPO. [d] Der Linker wurde aufgrund höchster Ausbeute und/oder Aktivität gewählt. [e] n.b. = nicht bestimmt.

Protein-Konjugation für die orale Wirkstoffverabreichung erst nach einer grundlegenden Arbeit von Russell-Jones in den 1990er Jahren wirklich zu entfalten.<sup>[35]</sup> 1995 und 1996 erschienene Publikationen, in denen die Synthese und orale Verabreichung des Granulocytenkolonie-stimulierenden Faktors (G-CSF) und von Erythropoietin (EPO; siehe Tabelle 1)<sup>[14,15]</sup> mit nachgewiesener In-vivo-Aktivität beschrieben wurden, wiesen den Weg. G-CSF ist ein Proteinfaktor, der die Produktion der weißen Blutkörperchen im Körper anregt. Amgen verwendet G-CSF zur Herstellung der injizierbaren Wirkstoffe Neupogen (Filgrastim) und Neulasta (Pegfilgrastim), die verwendet werden, um bei Krebspatienten während der Chemotherapie die Zahl der weißen Blutkörperchen im normalen Bereich zu halten. EPO stimuliert

die Reifung von erythroiden Vorläuferzellen zu reifen Erythrocyten. Es wird zur Behandlung von Anämie bei Dialysepatienten eingesetzt. Wie alle Therapeutika, die in dieser Übersicht genannt sind, müssen auch sie parenteral verabreicht werden. Die Publikationen beschrieben Methoden zur Konjugation von G-CSF und EPO mit  $\epsilon$ -Monocarbonsäure-modifiziertem  $B_{12}$ . Die Verwendung von unterschiedlichen Abstandhaltern ermöglichte die Bildung von Biokonjugaten, die signifikante Affinität für den Intrinsischen Faktor behielten und bei In-vivo-Untersuchungen bis zu 85 % des parenteral verabreichten Proteins lieferten (siehe Tabelle 1).

Außerdem haben Russell-Jones und Mitarbeiter das Luteinisierungshormon freisetzende Hormon (LHRH) sowie LHRH-Antagonisten an  $B_{12}$  konjugiert.<sup>[16]</sup> LHRH steuert die

Synthese und Freisetzung von Gonadotropinen der Hypophyse. Es wurden viele LHRH-Analoga entwickelt, die Störungen des Gonadotropinhaushalts behandeln können. Im Allgemeinen muss bei oraler Verabreichung mehr als das 100- bis 1000-fache an LHRH gegeben werden wie bei parenteraler Verabreichung. Klinische LHRH-Antagonisten werden daher gegenwärtig über Injektion oder als Nasenspray verabreicht.<sup>[16]</sup> Eines dieser Analoga ist ANTIDE – N-Ac-d-Nal-(2), d-Phe(pCl), d-Pal(3), Ser, Lys (Nic), d-Lys(Nic), Leu, Lys(iPr), Pro, d-Ala-NH<sub>2</sub> –, das den Eisprung stark hemmt und in männlichen Ratten und Affen einen chemischen Kastrationseffekt hervorruft. Russell-Jones et al.<sup>[16]</sup> konjugierten die Positionen 6 (in ANTIDE-1) und 8 (in ANTIDE-3) über die ε-Monocarboxy-Position mit B<sub>12</sub>. Sie untersuchten eine Reihe nichtspaltbarer und spaltbarer Linker sowie Abstandhalter verschiedener Länge. ANTIDE-1 und ANTIDE-3 wurden über verschiedene Linker mit (2-Aminoethyl)amido-ε-B<sub>12</sub> verknüpft. Unter Verwendung von Anilido-, Ethylenglycolbis(succinimidylsuccinat)(EGS)- oder Disuccinimidylsüberat-Abstandhaltern (siehe Tabelle 1) wurden nichtspaltbare Linker hergestellt. Die Konjugate zeigten eine mit nativem ANTIDE vergleichbare In-vitro-Aktivität, doch ihre In-vivo-Aktivität war stark reduziert. Dies war sehr wahrscheinlich eine Folge sterischer Effekte durch die direkte Bindung des Peptids an das Vitamin oder der schnellen Freigabe durch die B<sub>12</sub>-bindenden Proteine. Biokonjugate mit spaltbaren Linkern mit Disulfidbrücken wirkten in vitro geringfügig schwächer als solche mit Anilido- und EGS-Verknüpfungen, aber Abstandhalter mit Disulfidbrücken zeigten eine deutlich erhöhte Aktivität in vivo (siehe Tabelle 1). Auch Abstandhalter mit γ-Glutamyl-ε-Lysin-Bindungen, die durch Serum-Transglutaminasen gespalten werden, wurden getestet. Die entsprechenden Konjugate zeigten eine passable In-vitro-Aktivität, hatten aber eine stark reduzierte In-vivo-Aktivität. In IF-Bindungsassays wiesen alle Konjugate von ε-B<sub>12</sub> eine mit nichtmodifiziertem B<sub>12</sub> vergleichbare Aktivität auf. Eine geringe Aktivität in vivo war dann höchstwahrscheinlich auf sterische Effekte durch die direkte Bindung des Peptids an das Vitamin zurückzuführen oder auf die schnelle Abgabe durch die B<sub>12</sub>-bindenden Proteine.

Neuere Erfolge von Russell-Jones und Petrus et al. bei In-vivo-Anwendungen mit Insulin werden in Abschnitt 3 beschrieben.

### 3. Biologische Aspekte

Die Verwendung von B<sub>12</sub> zum Transport therapeutischer Peptide hat neue Aufmerksamkeit erlangt, nicht nur weil es die Absorption aus dem Magen-Darm-Trakt fördern kann, sondern auch, weil es die Verweilzeit im Plasma erhöht.<sup>[17]</sup> Die Nutzung von B<sub>12</sub> zum Wirkstofftransport ist jedoch durch die Menge an B<sub>12</sub> begrenzt, die bei einer gegebenen Dosis aus dem Darmlumen absorbiert werden kann. Ob die B<sub>12</sub>-Absorption mit den gesamten Körpervorräten an B<sub>12</sub> variiert, ist unbekannt, aber der absorbierte Anteil sinkt, wenn die orale Dosis erhöht wird.<sup>[18]</sup> Dennoch nimmt die GesamtabSORption an B<sub>12</sub> mit erhöhter Einnahme zu.

Studien zur Messung der B<sub>12</sub>-Absorption beruhen auf der Ganzkörperzählung von radioaktiv markiertem B<sub>12</sub>, der Zählung von radioaktiv markiertem B<sub>12</sub> im Stuhl oder auf beidem. Bei Tiermodellen zum B<sub>12</sub>-Metabolismus besteht zusätzlich die Möglichkeit, Gewebe zu extrahieren und dadurch die Verteilung der Markierung im Gewebe zu quantifizieren. Frühe Beiträge<sup>[19]</sup> ließen jedoch den B<sub>12</sub>-Weg als ein im Menschen einzigartiges Phänomen erscheinen, das in Ratten zu verschieden war, um es zu vergleichen. Diese frühen Studien zur Absorption von radioaktiv markiertem B<sub>12</sub> in Ratten mussten mit hohen Dosen ausgeführt werden, da die spezifische Aktivität des Materials gering war. Mit der Verfügbarkeit von markiertem B<sub>12</sub> mit höherer spezifischer Aktivität ist es jedoch möglich, sehr viel kleinere Testdosen einzusetzen und trotzdem hohe Genauigkeiten zu erzielen. Tatsächlich hat sich das Rattenmodell jetzt als sehr wertvoll für die Evaluierung der B<sub>12</sub>-Absorption und -Exkretion erwiesen; Ratten zeigen ähnliche Reaktionen wie Menschen, sogar wenn nach einer Gastrektomie Human- oder Schweine-IF mitverabreicht werden. Die frühen Befunde in der Ratte<sup>[20]</sup> ergaben eine mittlere Absorption von 52.3 % bei einer Dosis von 1–10 ng, während bei Dosen von 1–2 µg alle Tiere weniger als 10 % absorbierten. Dies bestätigten Moertel et al.,<sup>[19]</sup> die Dosen von 0.01–0.545 µg verwendeten, wovon im Durchschnitt 53.4–8.0 % absorbiert wurden.

Adams et al.<sup>[21]</sup> maßen den absorbierten Anteil an radioaktiv markiertem B<sub>12</sub> im Menschen und zeigten, dass bei einer Dosis von 1 µg fast 50 % gespeichert wurden, 20 % bei einer Dosis von 5 µg und um 5 % bei einer Dosis von 25 µg. Eine zweite B<sub>12</sub>-Dosis, die 4–6 h später verabreicht wurde, wurde genauso gut absorbiert wie die erste.<sup>[22]</sup> Diese Zeitspanne wird allerdings nicht benötigt, da die mittlere Regenerationszeit von Cubilin nur 30 min beträgt.<sup>[23]</sup> Wenn große Dosen an kristallinem B<sub>12</sub> aufgenommen werden, kann bis zu 1 % der Dosis durch Massenwirkung – auch in Abwesenheit von IF – absorbiert werden.<sup>[24]</sup> Diese Massenwirkung tritt wahrscheinlich nicht auf, wenn das relativ kleine B<sub>12</sub> an ein viel größeres therapeutisches Peptid gebunden ist.

Um die Verwendbarkeit von B<sub>12</sub> als Träger für Peptide abzuschätzen, ist es wichtig, die beobachteten Werte der B<sub>12</sub>-Absorption zu den Anforderungen des Peptidtransports in Beziehung zu setzen. Wegen der sehr geringen Absorption über das Darmepithel und den harschen Bedingungen im Magen-Darm-Trakt beträgt die orale Bioverfügbarkeit von Peptidwirkstoffen normalerweise weniger als 1–2 %.<sup>[25–27]</sup> Eine frühe Studie am Menschen mit Insulin zeigte, dass etwa 0.5 % des aktiven Insulins absorbiert werden, wenn es in großer Menge (100 Einheiten pro kg Körpergewicht) direkt in den oberen Leerdarm (Jejunum) eingebracht wird.<sup>[28]</sup> Da diese Art der Verabreichung die Proteolyse im Magen umgeht und die Studie an einem Patienten mit totaler Pankreatektomie ausgeführt wurde, ist anzunehmen, dass der Wert von 0.5 % nahe der oberen Grenze für eine orale Verabreichung von ungeschütztem Insulin liegt. Damit ein Transportsystem wirklich nützlich ist, muss es die Leistungsfähigkeit der Absorption deutlich über dieses Ausgangsniveau von 0.5 % (für Insulin) anheben. Vorausgesetzt, die Effizienz der B<sub>12</sub>-Absorption liegt bei 5–55 %, ist die Verwendung von B<sub>12</sub>, um die Aufnahme von Peptiden zu verbessern,

sicherlich brauchbar. Da dieser Leistungsgrad jedoch nur im oberen Grenzbereich der Absorption (ungefähr bei Dosen von 20–25 µg im Menschen) realisierbar ist, wäre ein Peptid, das nur in geringen Dosen vorhanden ist, ein geeigneter Kandidat für diesen Weg. Alternativ ist es möglich, die Beladung zu erhöhen, sodass jedes einzelne B<sub>12</sub>-Molekül mehrere Peptide entweder direkt oder indirekt gebunden trägt. Eine mehrfache Dosierung von B<sub>12</sub>-Konjugaten könnte ein wichtiger Weg bei zukünftigen Untersuchungen sein.

#### 4. Fortschritte

Da die IF-Bindung für den Erfolg des B<sub>12</sub>-Aufnahmewegs entscheidend ist, muss zunächst die Affinität des modifizierten B<sub>12</sub> gegenüber IF erforscht werden. McEwan et al.<sup>[29]</sup> synthetisierten zwölf biologisch aktive Derivate von Vitamin B<sub>12</sub> mit Abstandhaltern an der 5'-Hydroxygruppe der Ribose-Einheit. Ihr Potenzial, als Transportmittel für Proteine, Nanokügelchen oder Immunogene unter Verwendung des Vitamin-B<sub>12</sub>-Aufnahmesystems zu wirken, wurde durch Bestimmung ihrer Affinität für den Intrinsischen Faktor (IF) und Nicht-IF bewertet. Die Ribose-5'-carbamat-Derivate zeigten ähnliche Affinität für den Intrinsischen Faktor wie die ε-Monocarbonsäure von B<sub>12</sub>. Die Affinität für Nicht-IF war ähnlich derjenigen von nichtmodifiziertem B<sub>12</sub> und sogar höher als für einige der kleineren Derivate. Mit B<sub>12</sub>-5'-Carbamat-Adipinsäuredihydrazid derivatisierte Nanopartikel wurden deutlich besser von Caco-2-Zellen aufgenommen als nichtmodifizierte Partikel.<sup>[29]</sup>

Nach diesen Befunden mit IF untersuchten Russell-Jones und Mitarbeiter durch Radiomarkierung mit <sup>57</sup>Co und <sup>125</sup>I das Ausmaß, in dem B<sub>12</sub>-gebundene Peptide absorbiert wurden.<sup>[33]</sup> In einer Versuchsreihe wurden die Bindung der B<sub>12</sub>-Peptid-Biokonjugate an IF, die Bindung von IF-B<sub>12</sub>-Peptid-Komplexen an spezifische zelluläre Rezeptoren (IFCR) auf der Oberfläche von Caco-2-Monoschichten und die Transcytose von B<sub>12</sub>-Peptiden über Endothelbarrieren erforscht. Außerdem wurde versucht, die Ergebnisse durch In-vivo-Messungen im Rattenmodell zu bestätigen. Alle B<sub>12</sub>-Peptid-Biokonjugate banden an IF und wurden durch IFCR-Rezeptoren auf Caco-2-Monoschichten erkannt. Die Bindung zeigte Sättigungsverhalten und konnte durch Zugabe eines 20-fachen Überschusses von B<sub>12</sub>-IF inhibiert werden. In-vivo-Studien an Ratten ergaben 53, 45, 42 und 23 % Absorption der eingesetzten Radioaktivität bei B<sub>12</sub>, B<sub>12</sub>-LHRH, B<sub>12</sub>-Hex-DP3 bzw. B<sub>12</sub>-DP3. Mit einem mehr als 10<sup>5</sup>-fachen Überschuss an B<sub>12</sub> fiel die Absorption unter 4 %, und die Konjugate zeigten eine ähnliche Verteilung im Gewebe wie normales B<sub>12</sub>.

Petrus et al.<sup>[30]</sup> nutzten kürzlich den B<sub>12</sub>-Aufnahmeweg, um oral Insulin zu verabreichen, das direkt an die 5'-O-Position der Ribose-Einheit von B<sub>12</sub> gebunden war. Der Lysinrest an Position 29 der B-Kette von Rinderinsulin wurde über CDT-Kupplung konjugiert (Abbildung 4). Das Reaktionsprodukt wurde durch Ionenaustauschchromatographie gereinigt und nach Ultrazentrifugieren als eine monodisperse Spezies identifiziert. Lys29 wurde als Anknüpfungspunkt gewählt, weil die beiden anderen Lysinreste von Insulin se-

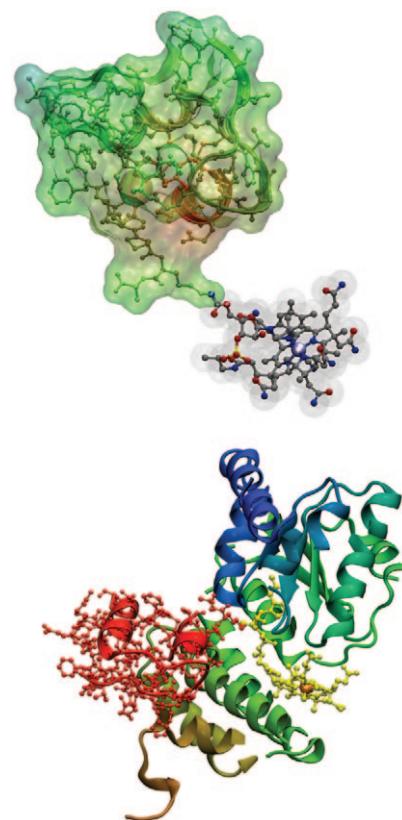


Abbildung 4. Oben: B<sub>12</sub>-Insulin-Konjugat mit Bindung zwischen dem Lysinrest des Insulin-B-Strangs (Lys29) und der Hydroxygruppe der B<sub>12</sub>-Riboseeinheit. Unten: Das gleiche Konjugat gebunden an TCII. Insulin ist rot, B<sub>12</sub> gelb dargestellt.

lektiv geschützt werden können und weil bekannt ist, dass Lys29 an der Oligomerisierung beteiligt ist, bezüglich der Aktivität aber keine Rolle spielt. Spektrophotometrische Studien zur Bindung des Intrinsischen Faktors zeigten, dass das B<sub>12</sub>-Insulin-Biokonjugat vom Intrinsischen Faktor erkannt wurde.<sup>[30]</sup> Um die In-vivo-Wirksamkeit des B<sub>12</sub>-Insulin-Konjugats zu prüfen, wurde Blut des STZ-induzierten Diabetes-Rattenmodells vor und nach der oralen Verabreichung des Konjugats über einen Zeitraum von 5 Stunden untersucht und mit dem Verlauf des Blutzuckerspiegels nach Verabreichung einer Lösung mit einer äquimolaren Menge freien Insulins verglichen. Vor der Verabreichung bestätigten Messungen des Blutzuckerspiegels im nüchternen (> 4 h) Zustand hyperglykämische Werte ( $15.6 \pm 0.8 \text{ mmol L}^{-1}$ ) und somit einen Insulinmangelzustand. Das B<sub>12</sub>-Insulin-Konjugat ergab eine 4.7-fach größere Abnahme des Bereichs unter der Blutzuckerkurve ( $p = 0.056$ ) als bei Verabreichung von freiem Insulin.<sup>[30]</sup> Um herauszufinden, ob die entsprechende Änderung in der Blutzuckerkonzentration über einen B<sub>12</sub>-abhängigen Aufnahmeweg vermittelt wurde, untersuchte man die Blutzuckerkonzentration als Reaktion auf das B<sub>12</sub>-Insulin-Konjugat, das in Gegenwart eines 10<sup>5</sup>-fachen Überschusses an „freiem“ B<sub>12</sub> verabreicht wurde. Eine signifikant schwächere Reaktion des Blutzuckerspiegels deutete in diesem Fall darauf hin, dass das „freie“ B<sub>12</sub> den Aufnahmeweg gesättigt hatte und den Transport des B<sub>12</sub>-Insulin-Konjugats verhinderte.<sup>[30]</sup>

Die Experimente von Petrus et al. wichtig sind, doch die absolute Senkung des Blutzuckerspiegels (um ungefähr 30 % des Anfangswerts) erreicht noch nicht die in der klinischen Praxis erforderlichen Werte (ca. 75 %). Da die Forscher eine Dosis oral verabreichten, die die Obergrenze der Absorption über den  $B_{12}$ -Aufnahmeweg überschritt, stellt die Senkung des Blutzuckerspiegels um ca. 30 % des Anfangswerts vermutlich eine Obergrenze für den Insulintransport über den  $B_{12}$ -Aufnahmeweg dar, wenn man von Konjugaten mit einem Insulin/ $B_{12}$ -Verhältnis von 1:1 ausgeht.

Um diesen Maximalwert zu erhöhen, hat die Arbeitsgruppe von Jain und Russell-Jones<sup>[31,32]</sup>  $B_{12}$ -Nanokügelchen zum Insulintransport getestet. Die  $B_{12}$ -Nanokügelchen wurden durch Modifizierung der Oberfläche von Nanopartikeln (NPs) mit Bernsteinsäureanhydrid und Konjugation mit Amino- $B_{12}$ -Derivaten über eine Carbamatbindung hergestellt. Die prozentuale pharmakologische Verfügbarkeit der 70K-Nanopartikel (NPs) mit 2, 3 und 4 Gew.-% Insulin war 1.1-, 1.9- bzw. 2.6-mal höher als mit NPs ohne  $B_{12}$ ; dies ist in Einklang mit der Hypothese, dass die Aufnahme der NPs durch  $B_{12}$  vermittelt wurde. Nach der oralen Verabreichung dieser Transportsysteme (20 IU kg<sup>-1</sup>) erreichten die Glukosekonzentrationen im Plasma nach 5 h einen Tiefpunkt bei 70–75 % der Grundwerte. Die Blutzuckerspiegel blieben danach bis zu 54 h stabil, wenn auch weniger stark gesenkt. Zu bemerken ist, dass die Tiere in dieser Studie erst eine Stunde vor der Verabreichung nüchtern gehalten wurden. Daher können sich die Grundwerte infolge einer Nahrungsaufnahme in den 4 h vor Versuchsbeginn erhöht haben, was nicht kontrolliert wurde. Außerdem gibt es bei dieser Methode Probleme mit der Formulierung, etwa durch Unterschiede in der Dispersität der Proteine und der Menge an eingebettetem Protein. Dennoch zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass mit den  $B_{12}$ -Nanokügelchen klinisch relevante Senkungen des Glucosespiegels erzielt werden können. Dies hat zur Entwicklung des Medikaments Oradel (Apollo Life Sciences) geführt, das demnächst in die Phase I der klinischen Prüfung eintritt.

## 5. Ausblick

Die Synthese und In-vivo-Aktivität von  $B_{12}$ -Nanokügelchen hat ein beträchtliches Potenzial für die orale Verabreichung von Peptiden oder Proteinen. Es sind jedoch noch Schwierigkeiten beim Design von Nanopartikeln zu überwinden; dazu gehören die Herstellungskosten, mögliche Komplikationen durch eine Toxizität der Nanopartikel, Unstimmigkeiten bei den verabreichten Peptidmengen sowie Formulierungs- und Polydispersitätsprobleme. Für bestimmte Proteine aber – einschließlich jener, bei denen der  $B_{12}$ -Weg die Aufnahme einer klinisch relevanten Dosis nicht ermöglicht – kann dieser Route möglicherweise gangbar sein.

Die direkte Konjugation von Peptiden/Proteinen und  $B_{12}$  wäre jedoch die ideale Nutzung dieses Transportmechanismus. Wir sind der Meinung, dass dies auf zwei Arten gelingen kann: Erstens, indem der Transportweg für Peptide/Proteine genutzt wird, die nur in sehr niedrigen Konzentrationen im Serum auftreten, und zweitens durch Anknüpfen einer Kette

von Peptiden mit spaltbaren Linkern an das  $B_{12}$ -Molekül. Es wird notwendig sein, die optimale Kettenlänge zu bestimmen, da mit zunehmender Kettenlänge voraussichtlich die schützende Wirkung durch  $B_{12}$  und seine Aufnahmeproteine abnehmen wird. Arbeiten der Autoren in Zusammenarbeit mit Shimadzu Scientific Instruments (Maryland, US) deuten darauf hin, dass  $B_{12}$  allein Proteasen wie Trypsin nicht davon abhält, Insulin zu verdauen. Folglich wurden bioabbaubare Polymersysteme verwendet, um das Protein zusätzlich zu schützen. Wird das System so gewählt, dass das Polymer auch an das  $B_{12}$ -Protein-Konjugat gebunden wird und die expolierten Proteinfelder umhüllt, kann ein besserer Schutz gegen die Proteolyse im Magen erreicht werden.<sup>[38]</sup>

Obwohl die orale Gabe von Wirkstoffen die gebräuchlichste Methode ist, werden Peptid/Protein-Verabreichungstechniken bislang den Erwartungen noch nicht gerecht. Neue Transportstrategien mit nur kleinen Verbesserungen bei der Wirkstoffaufnahme könnten aber schon zu signifikanten Unterschieden in der Patientenakzeptanz oder bei klinischen Ergebnissen führen. Die erfolgreiche orale Verabreichung von Proteinen würde zudem die Entwicklung entsprechender Impfstoffe nach sich ziehen, die eine stark erhöhte Immunantwort an der wichtigsten Eintrittsstelle für Krankheitserreger, nämlich der Magen- und Darmschleimhaut, ermöglichen würden. Die Entwicklung eines oralen Transportmechanismus für Vakzine und andere therapeutische Peptide wäre ein bedeutender Beitrag für die medizinische Versorgung in Entwicklungsländer. Dies ist ein starker Anreiz, den  $B_{12}$ -Aufnahmeweg für die orale Verabreichung von Wirkstoffen weiter zu verfolgen.

*Die Autoren danken Dr. Damian Allis für die Anfertigung der Abbildungen. Die Bilder wurden mit VMD<sup>[37]</sup> und POVray (persistance of vision ray tracer) v.3.6.1 erstellt. Wir danken für die finanzielle Unterstützung durch die Syracuse University und einen Initiative Award der Ewing Marion Kauffman Foundation (Kansas City, MO, USA).*

Eingegangen am 22. Februar 2008  
Online veröffentlicht am 12. Dezember 2008

Übersetzt von Dr. Margit Knauer, Bensheim

- 
- [1] W. C. Shen, *Drug Discovery Today* **2003**, 8, 607.
  - [2] *Chemistry and Biochemistry of  $B_{12}$*  (Hrsg.: R. Banerjee), Wiley, New York, 1999.
  - [3] S. N. Fedosov, N. U. Fedosova, B. Kräutler, E. Nex, T. E. Petersen, *Biochemistry* **2007**, 46, 6446.
  - [4] S. Mundwiler, B. Spingler, P. Kurz, S. Kunze, R. Alberto, *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 4089.
  - [5] J. D. Bagnato, A. L. Eilers, R. A. Horton, C. B. Grissom, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 8987.
  - [6] H. Olesen, E. Hippe, E. Haber, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct.* **1971**, 243, 66.
  - [7] D. F. van de Wiel, J. A. de Vries, M. G. Woldring, H. O. Nieweg, *Clin. Chim. Acta* **1974**, 55, 155.
  - [8] D. F. van de Wiel, W. T. Goedemans, M. G. Woldring, *Clin. Chim. Acta* **1974**, 56, 143.
  - [9] D. F. van de Wiel, L. K. L. Koster-Otte, W. T. Goedemans, M. G. Woldring, *Clin. Chim. Acta* **1974**, 56, 131.

- [10] D. B. Endres, K. Painter, G. D. Niswender, *Clin. Chem.* **1978**, *24*, 460.
- [11] S. S. Ahrenstedt, J. I. Thorell, *Clin. Chim. Acta* **1979**, *95*, 419.
- [12] K. Newman, J. Schmidt, P. Wegfahrt, Bio-Rad Laboratories, Inc., US-Patent 6942977, **1993**.
- [13] M. I. Watkins, C. R. Bartlet, E. T. Liang, J. M. Pocekay, M. A. Staples, Bio-Rad Laboratories, Inc., US-Patent 5187107, **1991**.
- [14] G. J. Russell-Jones, S. W. Westwood, A. D. Habberfield, *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 459.
- [15] A. D. Habberfield, K. Jensen-Pippo, L. Ralph, S. W. Westwood, G. J. Russell-Jones, *Int. J. Pharm.* **1996**, *145*, 1.
- [16] G. J. Russell-Jones, S. W. Westwood, P. G. Farnworth, J. K. Findlay, H. G. Burger, *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 34.
- [17] Y. Shechter, H. Tsubery, M. Mironchik, M. Rubinstein, M. Fridkin, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 2439.
- [18] *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B<sub>6</sub>, Folate, Vitamin B<sub>12</sub>, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*, The National Academies Press, **1998**, S. 306.
- [19] C. G. Moertel, H. H. Scudamore, C. A. Owen, Jr., J. L. Bollman, *Am. J. Physiol.* **1959**, *197*, 347.
- [20] K. B. Taylor, B. J. Mallett, G. H. Spray, *Clin. Sci.* **1958**, *17*, 647.
- [21] J. F. Adams, S. K. Ross, L. Mervyn, K. Boddy, P. King, *Scand. J. Gastroenterol.* **1971**, *6*, 249.
- [22] R. M. Heyssel, R. C. Bozian, W. J. Darby, M. C. Bell, *Am. J. Clin. Nutr.* **1966**, *18*, 176.
- [23] S. Bose, S. Seetharam, N. M. Dahms, B. Seetharam, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 3538.
- [24] H. Berlin, R. Berlin, G. Brante, *Acta Med. Scand.* **1968**, *184*, 247.
- [25] G. M. Pauletti, S. Gangwar, G. T. Knipp, M. M. Nerurkar, F. W. Okumu, K. Tamura, T. J. Sahaan, R. T. Borchardt, *J. Controlled Release* **1996**, *41*, 3.
- [26] G. L. Amidon, H. J. Lee, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1994**, *34*, 321.
- [27] M. J. Humphrey, P. S. Ringrose, *Drug Metab. Rev.* **1986**, *17*, 283.
- [28] C. W. Crane, G. R. Luntz, *Diabetes* **1968**, *17*, 625.
- [29] J. F. McEwan, H. S. Veitch, G. J. Russell-Jones, *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 1131.
- [30] A. K. Petrus, A. R. Vortherms, T. J. Fairchild, R. P. Doyle, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1717.
- [31] K. B. Chalasani, G. J. Russell-Jones, A. K. Jain, P. V. Diwan, S. K. Jain, *J. Controlled Release* **2007**, *122*, 141.
- [32] K. B. Chalasani, G. J. Russell-Jones, S. K. Yandrapu, P. V. Diwan, S. K. Jain, *J. Controlled Release* **2007**, *117*, 421.
- [33] J. Alsenz, G. J. Russell-Jones, S. Westwood, B. Levet-Trafit, P. C. de Smidt, *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 825.
- [34] A. D. Habberfield, O. B. Kinstler, C. G. Pitt, WOW09428015, **1994**.
- [35] G. J. Russell-Jones, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1998**, *15*, 557–586.
- [36] D. Watkins, D. S. Rosenblatt, *Endocrinologist* **2001**, *11*, 98–104.
- [37] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *J. Mol. Graphics* **1996**, *14*, 27–28.
- [38] R. P. Doyle, T. J. Fairchild, A. K. Petrus, D. G. Allis, R. P. Smith, *ChemMedChem* **2009**, DOI: 10.1002/cmde.200800346.