

Mit Glycopeptid-Antigenen und T-Zell-Epitopen verknüpfte wasserlösliche Polymere als potenzielle Antitumor-Vakzine**

Lutz Nuhn, Sebastian Hartmann, Björn Palitzsch, Bastian Gerlitzki, Edgar Schmitt, Rudolf Zentel* und Horst Kunz*

Professor Manfred Reetz zum 70. Geburtstag gewidmet

Eine Tumor-Immuntherapie wird als vielversprechend für die Krebsbehandlung angesehen.^[1] Viele epitheliale Tumorge- webe unterscheiden sich vom gesunden Gewebe im verän- derten Glycosylierungsmuster des Zellmembran-Mucins MUC1.^[2–4] Wegen veränderter Aktivität von Glycosyltrans- ferasen im Tumor mangelt es dem tumorassoziierten MUC1 an langen verzweigten Glycanen. Stattdessen überwiegen verkürzte tumorassoziierte Kohlenhydratantigene (TACAs) auf dem Peptidrückgrat.^[2,4,5] Dadurch werden Peptidepitope in der „Tandem-Repeat“-Region des MUC1 für das Im- munsystem zugänglich, welche auf normalen Zellen durch die großen Kohlenhydratseitenketten abgeschirmt sind. Daher sind „Tandem-Repeat“-Glycopeptide mit TACA-Seitenket- ten vielversprechende Zielstrukturen für Antitumor-Vakzi- ne.^[6] Allerdings sind die endogenen Antigene wenig immu- nogen. Deshalb wurden synthetische MUC1-Glycopeptide mit immunstimulierenden T-Helferzell-Epitope enthaltenden Komponenten verknüpft, um eine humorale Immunantwort in Mäusen auszulösen.^[7] Beispielsweise riefen synthetische Zwei- oder Dreikomponentenvakzine aus tumorassoziierten MUC1-Sequenzen, T-Zell-Epitopen und Liganden (Pam₃CysSerK₄) des „Toll-like“-Rezeptors 2 (TLR2) starke Immunantworten hervor.^[8] Besonders durch die Anbindung an Tetanus-Toxoid als Träger wurden außerordentlich hohe Antikörpertiter mit hoher Bindungsaffinität gegenüber hu- manen Krebszelllinien (z. B. MCF-7) erhalten.^[9] Diese prot- eingebundenen Vakzine ähneln in ihrer Größe nanopartiku- lären Fragmenten, die das Immunsystem im Zuge der nor-

malen Immunabwehr prozessiert (z. B. bakterielle Kompar- timente). Vor diesem Hintergrund erscheint es interessant zu untersuchen, ob eine Kombination dieser MUC1-Antigene mit künstlichen Trägern im Nanometermaßstab ebenfalls wirksame Vakzine ergibt.^[10]

Nanopartikel haben interessante Eigenschaften für me- dizinische Anwendung,^[11,12] so u. a. Poly(*N*-(2-hydroxypro- pyl)methacrylamid P(HPMA) in den ersten Polymer-Wirk- stoff-Konjugaten in klinischen Studien.^[13] P(HPMA) ist nicht immunogen^[14] und kann als multivalenter Träger für den Transport von Antigenen und Adjuvantien dienen.^[15] Im Gegensatz zu Trägerproteinen löst es keine störenden Im- munreaktionen gegen Trägerepitope aus und bietet Vorteile wegen seiner Polymerkettenstruktur: Nach dem Rings- dorf'schen Konzept pharmakologisch aktiver Polymere können über orthogonal reaktive Funktionen Wirkstoffe oder Liganden an die Polymerkette gebunden werden.^[16] Darüber hinaus können zusätzliche Komponenten an das P(HPMA)- Polymer geknüpft werden, die Selbstagglomeration zu nano- dimensionalischen Objekten und so die Wechselwirkung mit dem Immunsystem fördern. Solche Polymere sind in definierter Form unter kontrollierten Bedingungen zugänglich.^[17]

Unseres Wissens sind synthetische Polymer-Glycopeptid- Konjugate bisher nicht beschrieben worden. Um wirksame Vakzine zu erhalten, wurden ein tumorassoziiertes MUC1- „Tandem-Repeat“-Glycopeptid (PAHGVTSAPDTRPAPG- STAP) als B-Zell-Epitop und ein T-Helferzell-Epitop an ein P(HPMA)-Polymer gebunden. Aktuelle Studien zeigen, dass Anti-MUC1-Autoantikörper aus Seren von Patienten^[18] be- vorzugt an zwei immundominante Motive (PDTRP^[19] und GSTAP)^[19,20] in der MUC1-„Tandem-Repeat“-Sequenz binden. Außerdem wurde gefunden, dass Glycane innerhalb der STAPPA-Sequenz (Ser17, Thr18) starken Einfluss auf die Peptidkonformation haben.^[21] Da die Konformation des Glycopeptids entscheidend für die Tumorselektivität ist,^[22] ist die Untersuchung eines 22meren Peptids, das die intakte STAPPA-Sequenz mit T_N-Antigen an Thr18 und beide im- mundominanten Motive enthält, besonders interessant.^[9b] Als zweite Komponente wurde das in Mensch und Maus wirksa- me T-Zell-Epitop P2 (QYIKANSKFIGITEL) aus Tetanus- Toxoid^[23] gewählt, da dessen Konjugate mit MUC1-Glyco- peptiden und dem Lipopeptid Pam₃CysSK₄ starke Immun- antworten induziert hatten.^[8c]

Die funktionellen P(HPMA)-Polymere werden durch RAFT-Polymerisation von Pentafluorphenylmethacrylat und nachfolgende Aminolyse mit 1-Amino-2-propanol erhal- ten.^[17] Verschiedene Homo-, statistische und Block-Copoly-

[*] L. Nuhn,^[†] S. Hartmann,^[†] B. Palitzsch, Prof. Dr. R. Zentel, Prof. Dr. H. Kunz
Institut für Organische Chemie
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Duesbergweg 10-14, 55128 Mainz (Deutschland)
E-Mail: zentel@uni-mainz.de
hokunz@uni-mainz.de

Dr. B. Gerlitzki, Prof. Dr. E. Schmitt
Universitätsmedizin-Institut für Immunologie
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Langenbeckstraße 1, Geb. 708, 55101 Mainz (Deutschland)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[**] Wir danken Prof. Dr. Manfred Schmidt, der uns seine Lichtstreu- anlage zur Verfügung gestellt hat. Weiterhin möchte sich L.N. beim Fonds der Chemischen Industrie und dem Max Planck Graduate Center mit der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (MPGC) für die Förderung dieser Arbeit bedanken.

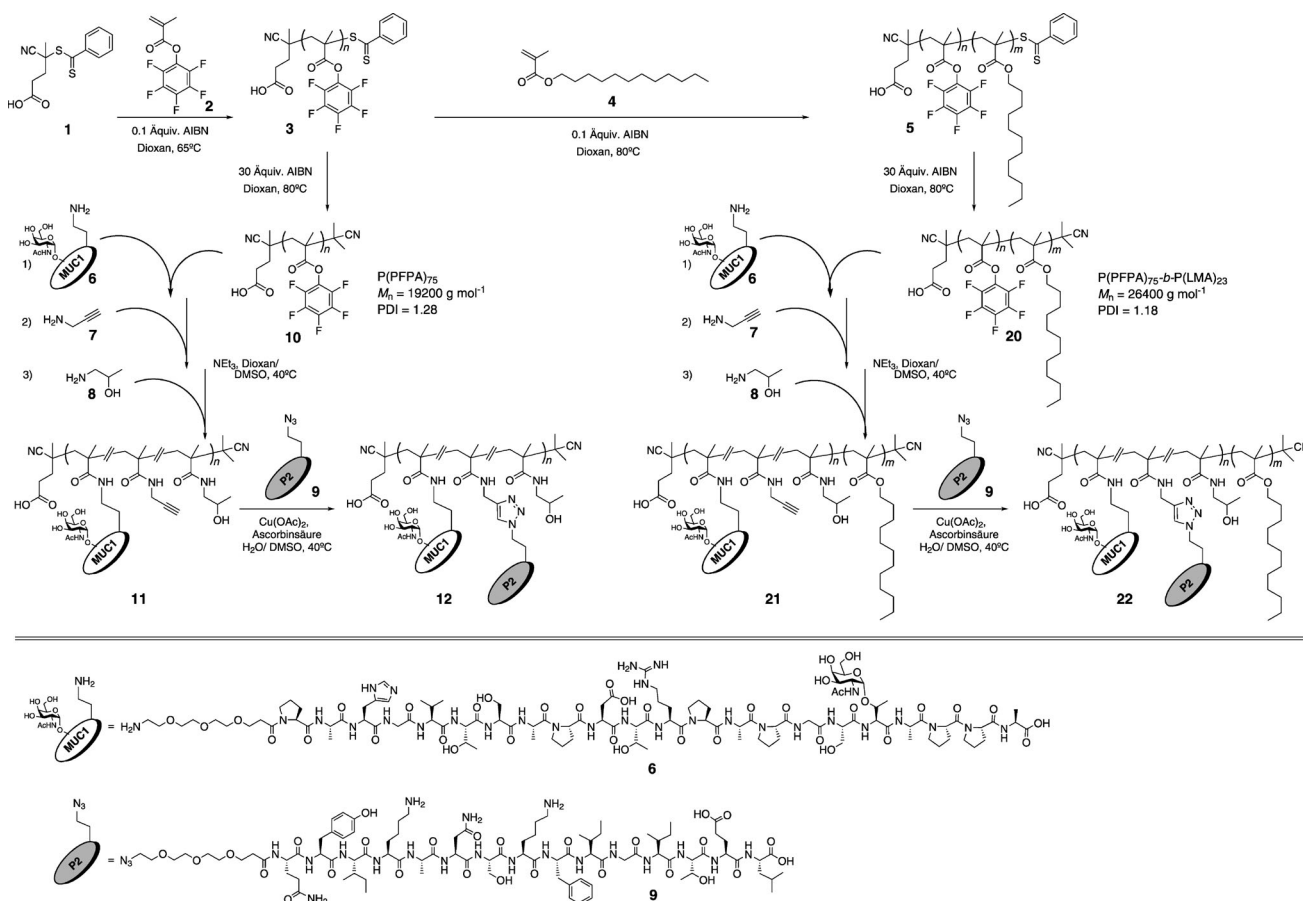
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201304212> zu finden.

mere mit Laurylmethacrylat waren bezüglich ihres Selbstaggregationsverhaltens^[17a,24] und ihrer biologischen Verteilung im Körper bekannt.^[17c,25] Zusätzliche funktionelle Gruppen können über primäre Amine durch polymeranaloge Umsetzung der Reaktivester an das Polymer gebunden werden.^[26] Innerhalb des hier vorgestellten Vakzin-Konzepts erfüllt das tumorassoziierte MUC1-Glycopeptid diese Funktion. Es trägt nur ein primäres Amin am N-Terminus, welches zur Aminolyse der polymeren Pentafluorphenylester fähig ist.^[8b,c] Die P2-Sequenz enthält aber Lysine mit ϵ -Aminogruppen. Daher kam die Kupfer-katalysierte Klick-Cycloaddition^[27] als alternative Ligationsmethode zum Einsatz. Dazu wurde die P2-Sequenz über einen Spacer mit einer Azidgruppe versehen^[28] und der polymere Reaktivester mit Propargylamin umgesetzt, um Alkinfunktionen am P(HPMA) zu verankern (Schema 1). Pentafluorphenylmethacrylat **2** wurde durch RAFT-Polymerisation mit dem Kettentransferreagens 4-Cyan-4-(phenylthiocarbonylthio)pentansäure **1** polymerisiert und ergab das Reaktivesterpolymer **3** in enger Dispersität. Mit seiner Dithiobenzoat-Endgruppe kann es RAFT-Blockcopolymerisation mit Laurylmethacrylat **4** eingehen, wobei ein Alkylblock an **5** für weitere Modifikationen angebracht wird. Zur Vermeidung von Nebenreaktionen während der polymeranalogen Umsetzung wurde die Dithiobenzoat-Endgruppe mit Überschuss an AIBN entfernt. Die Reaktiv-

ester-Polymere **10** (MW 19.200 g mol⁻¹, PDI 1,28) und **20** (MW 26.400 g mol⁻¹, PDI 1,18) wurden durch NMR-Spektroskopie und Größenausschlusschromatographie (GPC) in THF charakterisiert.

Das MUC1-Glycopeptid **6** und das T-Helferzell-Epitop P2 **9** wurden an fester Phase nach dem Fmoc-Protokoll synthetisiert.^[9a,29] Die Kupplung der Glycosylaminosäuren sowie der zwei funktionellen Spacer geschah unter modifizierten Bedingungen (siehe die Hintergrundinformationen). Die Abspaltung von **6** vom Harz und der Aminosäure-Schutzgruppen gelang mit Trifluoressigsäure (TFA)/Triisopropylsilan (TIS) und Wasser. Nach Reinigung durch semipräparative HPLC wurden die Kohlenhydrat-Schutzgruppen bei pH < 10 mit Natriummethanolat in Methanol entfernt. Peptid **9** wurde ohne Zusatz von TIS vom Harz und seinen Schutzgruppen befreit, um eine Reduktion des Azids zu vermeiden. Vor Anbindung an das Polymer wurden die vollständig deblockierten Peptide durch semipräparative HPLC gereinigt, was zu den Verbindungen **6** und **9** im Multimilligramm-Maßstab führte.

Anschließend wurde Glycopeptid **6** in stufenweiser Synthese an Homopolymer **10** und Blockcopolymer **20** gebunden. Zunächst wurde selektive Aminolyse der Pentafluorphenylester mit 0.15 Äquiv. Glycopeptid in absolutem Dioxan/Dimethylsulfoxid und Triethylamin durchgeführt. Nach fünf



Schema 1. Polymere Pentafluorphenylmethacrylat-Reaktivester Homo- **10** und Blockcopolymer **20** und deren sequenzielle Modifizierung mit dem tumorassoziierten MUC1-Glycopeptid **6** und dem T-Helferzell-Epitop P2 **9** zur Synthese der auf HPMA basierenden Polymer-Glycopeptid-Konjugat-Vakzine P(HPMA-MUC1-P2) **12** und P(HPMA-MUC1-P2)-b-P(LMA) **22**.

Tagen Rühren bei 40°C wurden 0.1 Äquiv. Propargylamin **7** zugefügt und 24 h später die restlichen Estergruppen mit 1-Amino-2-propanol umgesetzt. Die stufenweise Umsetzung wurde dabei durch ^{19}F -NMR-Messung verfolgt, die die sequenzielle Anbindung aller Komponenten an die Polymerkette anzeigte (siehe die Hintergrundinformationen). Nach semipräparativer GPC wurden die Glycopeptid-Polymerkonjugate **11** und **21** durch NMR und GPC in Hexafluor-2-propanol (HFIP) charakterisiert. Die Alkinreste des Polymers wurden mit dem Azidgruppen enthaltenden P2-Peptid **9** durch Einwirkung von Kupferacetat und Ascorbinsäure verbunden. Die Reaktion lief in entgastem Wasser/DMSO binnen vier Tagen bei 40°C ab. Nach semipräparativer GPC wurden die difunktionellen Polymerkonjugate **12** und **22** isoliert und durch NMR-Spektroskopie und GPC in HFIP charakterisiert. So zeigt das ^1H -NMR-Spektrum von **11** Signale für die aromatischen Histidin-Protonen von Peptid **6** (Abbildung 1).

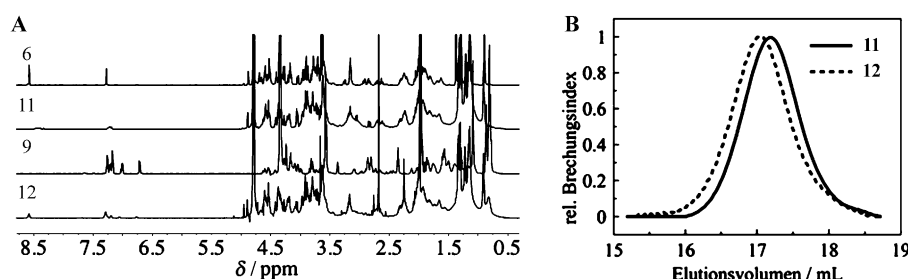


Abbildung 1. A) ^1H -NMR-Spektren von **6**, **9**, **11** und **12**. B) GPC-Elugramme der Homopolymere **11** und **12** (Laufmittel: HFIP).

Das Spektrum von **12** weist zusätzlich aromatische Phenylalanin- und Tyrosin-Signale von **9** auf. Außerdem verschiebt sich im GPC-Elugramm das Elutionsvolumen von **12** verglichen mit **11** zu höheren Molekulargewichten. Darüber hinaus belegen alle HSQC-Spektren, dass die α -glycosidische Bindung (^1H : $\delta = 4.89\text{ ppm}$ $J_{\text{H}_1-\text{H}_2} = 3.9\text{ Hz}$; ^{13}C : $\delta = 98.6\text{ ppm}$) über alle Kupplungsschritte hinweg stabil bleibt (siehe die Hintergrundinformationen).

Dynamische Lichtstreuung (DLS) an den Polymervakzinen in PBS-Pufferlösung ergab für Homopolymer **11** einen z-gemittelten hydrodynamischen Radius von 5.5 nm und eine enge Verteilung ($\mu_2 = 0.04$), was einer molekular gelösten Polymerstruktur entspricht (Tabelle 1). Sein Blockcopolymer-Derivat **21** mit dem hydrophoben Laurylmethacrylat-Block hingegen assoziiert zu eng verteilten Überstrukturen mit Größen von 64.5 nm ($\mu_2 = 0.06$). Ähnliche Ergebnisse wurden bereits für P(HPMA)-*b*-P(LMA)-Copolymere berichtet, bei denen die hydrophoben Blöcke zu definierten nanometergroßen Aggregaten führten.^[17a,24]

Tabelle 1: Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung für die HPMA-basierten Homopolymer- und Blockcopolymer-Glycopeptidkonjugate.

	Zusammensetzung	$R_h = \langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$ [nm]	μ_2
11	P(HPMA-MUC1)	5.5 ^[a]	0.04 ^[a]
12	P(HPMA-MUC1-P2)	52.1 ^[b]	0.08 ^[b]
21	P(HPMA-MUC1)- <i>b</i> -P(LMA)	64.5 ^[b]	0.06 ^[b]
22	P(HPMA-MUC1-P2)- <i>b</i> -P(LMA)	86.2 ^[b]	0.11 ^[b]

[a] Ermittelt bei 1.0 g L^{-1} in PBS. [b] Ermittelt bei 0.1 g L^{-1} in PBS.

Überraschenderweise induzierte auch die Konjugation des T-Helferzell-Epitops P2 **9** an Homopolymer **11** eine Selbstaggregation. Die DLS-Daten des difunktionellen Homopolymers **12** zeigten einen z-gemittelten hydrodynamischen Radius von rund 52.1 nm ($\mu_2 = 0.08$), welcher sich in einem ähnlichen Bereich befindet wie der des monofunktionalisierten Blockcopolymers **21**. Die Kombination aus P2-Sequenz und P(LMA)-Block in dem difunktionellen Blockcopolymer **22** erhöht die Aggregation auf ca. 86.2 nm (mit breiteren Verteilungen von $\mu_2 = 0.11$).

Zur immunologischen Evaluierung wurden die nanoskaligen Polymervakzine **12** und **22** jeweils drei Wildtyp-(Balb/c)-Mäuse mit komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) appliziert. In Intervallen von 21 Tagen wurden zwei Auffrischungsimpfungen mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans durchgeführt. Fünf Tage nach der zweiten Auffrischung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen. Jedes der Seren wurde ELISA-Bindungstests unterzogen, um die induzierten Antikörper gegen die tumorassoziierten MUC1-Epitope zu quantifizieren. Die Mikrotiterplatten wurden dafür mit Glycopeptid **6**-BSA beschichtet (siehe die Hintergrundinformationen). Die Seren aller Mäuse zeigten Immunantworten mit signifikanten Antikörpertitern an. Wegen der strukturellen Ähnlichkeit von Homo- **12** und Blockcopolymer-Vakzine **22** war kein Unterschied in der Höhe der Titer zu beobachten (nur Maus 3,

mit **12** immunisiert, zeigte höhere Titer; Abbildung 2). Die Bestimmung der Subtypen der induzierten Antikörper ergab überwiegend IgG, was für MHC-II-vermittelte Immunantworten spricht. Die mit **12** vakzinierter Maus 3 wies höhere Titer und überwiegend IgG2a-Antikörper als Subtypen auf.

Um die Bindung der induzierten Antikörper an Tumorzellen zu prüfen, wurden Zellen der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7^[30] mit den induzierten Antiseren inkubiert und die Erkennung der Tumorzellen durch Durchflusszytometrie (FACS) ermittelt.^[9] Alle Antiseren zeigten deutliche Bindung an Tumorzellen (siehe Abbildung 2C und die Hintergrundinformationen). Das FACS zeigte auch, dass das durch Blockcopolymer-Konjugat **22** induzierte Serum die stärkste Affinität zu Tumorzellen innerhalb dieses Konzepts der polymeren Vakzine aufwies. Während die P2-Epitope im Homopolymer **12** die nanopartikuläre Aggregation verursachen (Tabelle 1) und daher im Inneren fixiert sind, stabilisieren im Blockcopolymer **22** hauptsächlich die Laurylmethacrylat-Domänen diese micelläre Aggregation. Folglich sind die MUC1- und P2-Epitope besser zugänglich und flexibler. Dies hat auch Einfluss auf die bevorzugte Konformation der MUC1-Epitope, welche in **22** leichter Strukturen annehmen, die denen auf Tumorzelloberflächen entsprechen.

Hier werden erste Beispiele nanodimensionaler polymergebundener Vakzine beschrieben, die durch Kupplung von tumorassoziierten MUC1-Glycopeptiden und T-Zell-Epitopen an wasserlösliche Methacrylamid-Polymere durch Aktivesteraminolyse und Huisgen-Cycloaddition als ortho-

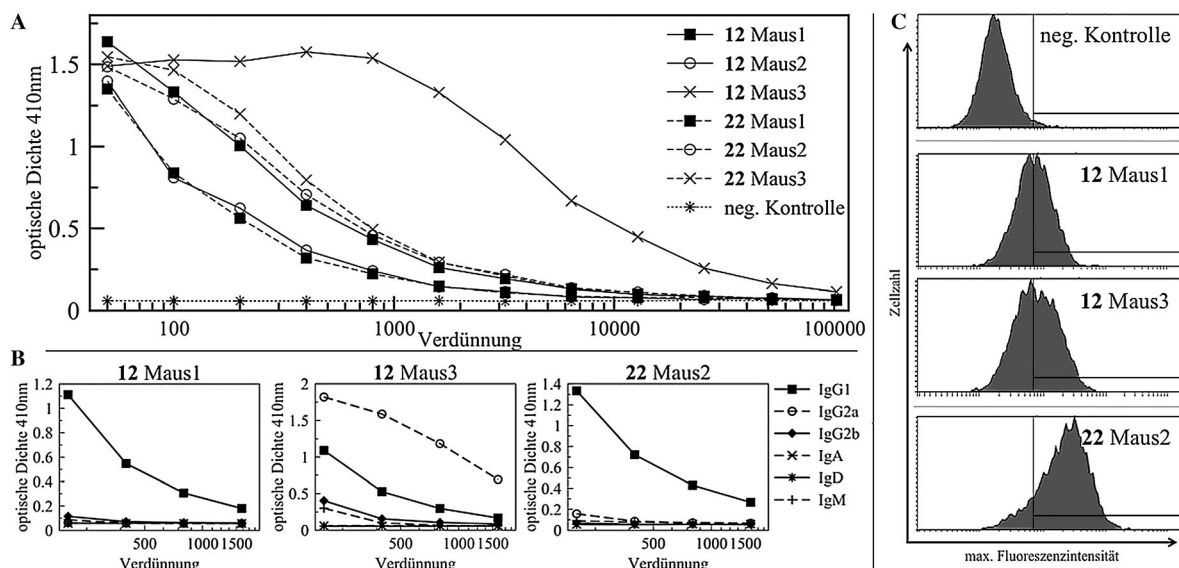


Abbildung 2. A) ELISA: Bindung der durch die Vakzine 12 und 22 induzierten Antiseren an ein immobilisiertes BSA-Konjugat des MUC1-Glycopeptids 6. B) Antikörpersubtypenanalyse der durch die Vakzine 12 (in Maus 1 und Maus 3) und 22 (in Maus 2) gewonnenen Antiseren durch Bindung an ein immobilisiertes BSA-Konjugat des MUC1-Glycopeptids 6. C) Durchflusszytometrische Analyse der Bindung der durch die Vakzine 12 und 22 induzierten Antiseren an MCF-7-Zellen. Oben: mit PBS behandelt (Negativkontrolle); Mitte: Antiseren aus Maus 1 und Maus 3, mit 12 immunisiert; unten: Antiserum aus Maus 3, mit 22 immunisiert.

gonale Konjugationsmethoden synthetisiert wurden. Die Anbindung des Tetanus-Toxoid-T-Zell-Epitops P2 an die hydrophilen Polymervakzine verursacht Selbstaggregation zu Objekten im Nanometerbereich. Das neue Vakzinkonzept wurde um Blockcopolymere aus hydrophilen und hydrophoben Abschnitten erweitert, bei denen letztere ebenfalls die Bildung von micellaren Nanopartikeln fördern. Die neuen polymergebundenen Glycopeptid-Vakzine induzieren signifikante MHC-II-vermittelte Immunreaktionen in Mäusen und induzieren IgG-Antikörper, die MCF-7-Tumorzellen erkennen. Vor allem das Blockcopolymer 22 mit der Nanostruktur fördernden Domäne induzierte Antikörper, die hohe Affinität zu Tumorzellen zeigen. Bedenkt man die vielen Möglichkeiten zur Strukturmodifikation, könnte dieses neuartige Vakzinkonzept neue Wege für die Entwicklung effizienter Immuntherapeutika eröffnen, wie eben von Antitumor-Vakzinen.

Eingegangen am 16. Mai 2013

Online veröffentlicht am 26. August 2013

Stichwörter: Antitumor-Vakzine · HPMA · MUC1-Glycopeptide · Polymer-Glycopeptid-Konjugate · T-Helferzell-Epitop-Peptide

- [1] J. N. Blattman, P. D. Greenberg, *Science* **2004**, 305, 200.
- [2] a) J. Arklie, J. Taylor-Papadimitriou, W. Bodmer, M. Egan, R. Millis, *Int. J. Cancer* **1981**, 28, 23; b) S. Gendler, J. Taylor-Papadimitriou, T. Duhig, J. Rothbard, J. Burchell, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 12820; c) R. E. Beatson, J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, *Immunotherapy* **2010**, 2, 305, zit. Lit.
- [3] a) F.-G. Hanisch, J. Peter-Katalinic, H. Egge, U. Dabrowski, G. Uhlenbruck, *Glycoconjugate J.* **1990**, 7, 525; b) F.-G. Hanisch, T. Stadie, K. Boßlet, *Cancer Res.* **1995**, 55, 4036; c) T. Ninkovic, L.

Kinarsky, K. Engelmann, V. Pisarev, S. Sherman, O. J. Finn, F.-G. Hanisch, *Mol. Immunol.* **2009**, 47, 131.

- [4] A. L. Sørensen, C. A. Reis, M. A. Tarp, U. Mandel, K. Ramachandran, V. Sankaranarayanan, T. Schwientek, R. Graham, J. Taylor-Papadimitriou, M. A. Hollingsworth, J. Burchell, H. Clausen, *Glycobiology* **2006**, 16, 96.
- [5] a) S. Müller, F.-G. Hanisch, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 26 103; b) S. Wilkie, G. Picco, J. Foster, D. M. Davies, S. Julien, L. Cooper, S. Arif, S. J. Mather, J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, J. Maher, *J. Immunol.* **2008**, 180, 4902.
- [6] N. Gaidzik, U. Westerlind, H. Kunz, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 4421.
- [7] a) S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 7803; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7630; b) H. Cai, M.-S. Chen, Z.-Y. Sun, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 6222; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 6106.
- [8] a) V. Lakshminarayanan, P. Thompson, M. A. Wolfert, T. Buskas, J. M. Bradley, L. B. Pathangey, C. S. Madsen, P. A. Cohen, S. J. Gendler, G.-J. Boons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109, 261; b) B. L. Wilkinson, L. R. Malins, C. K. Y. Chun, R. J. Payne, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 6249; c) B. L. Wilkinson, S. Day, R. Chapman, S. Perrier, V. Apostolopoulos, R. J. Payne, *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 16540; d) B. L. Wilkinson, S. Day, L. R. Malins, V. Apostolopoulos, R. J. Payne, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 1673; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 1635; e) H. Cai, Z.-Y. Sun, Z.-H. Huang, L. Shi, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 1962.
- [9] a) A. Hoffmann-Röder, A. Kaiser, S. Wagner, N. Gaidzik, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 8676; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 8498; b) N. Gaidzik, A. Kaiser, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, H. P. Sinn, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 10153; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 9977.
- [10] a) L. J. Peek, C. R. Middaugh, C. Berkland, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, 60, 915; b) Y. Krishnamachari, S. M. Geary, C. D. Lemke, A. K. Salem, *Pharm. Res.* **2011**, 28, 215; c) J. Leleux, K. Roy, *Adv. Healthcare Mater.* **2013**, 2, 72; d) A. E. Gregory, R.

- Titball, D. Williamson, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2013**, vol. 3, article 13; DOI: 10.3389/fcimb.2013.00013.
- [11] a) R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, 2, 347; b) R. A. Petros, J. M. DeSimone, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, 9, 615.
- [12] a) M. Ferrari, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, 5, 161; b) K. Riehemann, S. W. Schneider, T. A. Luger, B. Godin, M. Ferrari, H. Fuchs, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 886; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 872.
- [13] a) R. Duncan, L. W. Seymour, K. B. O'Hare, P. A. Flanagan, S. Wedge, I. C. Hume, K. Ulbrich, J. Strohalm, V. Subr, F. Spreafico, M. Grandi, M. Ripamonti, M. Farao, A. Suarato, *J. Controlled Release* **1992**, 19, 331; b) L. W. Seymour, D. R. Ferry, D. Anderson, S. Hesslewood, P. J. Julian, R. Poyner, J. Doran, A. M. Young, S. Burtles, D. J. Kerr, *Clin. Oncol.* **2002**, 20, 1668.
- [14] a) B. Rihová, J. Kopecek, K. Ulbrich, V. Chytrý, *Makromol. Chem.* **1985**, 9, 13; b) B. Rihová, M. Bilej, V. Vetvicka, K. Ulbrich, J. Strohalm, J. Kopecek, R. Duncan, *Biomaterials* **1989**, 10, 335; c) B. Rihová, M. Kovár, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2010**, 62, 184.
- [15] S. M. Morgan, V. Subr, K. Ulbrich, J. F. Woodley, R. Duncan, *Int. J. Pharm.* **1996**, 128, 99.
- [16] a) H. Ringsdorf, *J. Polym. Sci. Part C* **1975**, 51, 135; b) L. Gros, H. Ringsdorf, H. Schupp, *Angew. Chem.* **1981**, 93, 311; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1981**, 20, 305.
- [17] a) M. Barz, M. Tarantola, R. Luxenhofer, K. Fischer, M. Schmidt, A. Janshoff, P. Theato, R. Zentel, *Biomacromolecules* **2008**, 9, 3114; b) M. Barz, R. Luxenhofer, R. Zentel, A. V. Kabanov, *Biomaterials* **2009**, 30, 5682; c) M. Herth, M. Barz, D. Moderegger, M. Allemroth, O. Thews, R. Zentel, F. Rösch, *Biomacromolecules* **2009**, 10, 1697.
- [18] O. Blixt, E. Cló, A. S. Nudelman, K. Kildegaard Sørensen, T. Clausen, H. H. Wandall, P. O. Livingston, H. Clausen, K. J. Jensen, *J. Proteome Res.* **2010**, 9, 5250.
- [19] a) J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, M. Boshell, S. Gendler, T. Duhig, *Int. J. Cancer* **1989**, 44, 691; b) M. A. Tarp, A. L. Sørensen, U. Mandel, H. Paulsen, J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, H. Clausen, *Glycobiology* **2007**, 17, 209.
- [20] U. Westerlind, H. Schröder, A. Hobel, N. Gaidzik, A. Kaiser, C. M. Niemeyer, E. Schmitt, H. Waldmann, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 8413; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 8263.
- [21] a) P. Braun, G. M. Davies, M. R. Price, P. M. Williams, S. J. Tendler, H. Kunz, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 1531; b) F. Corzana, J. Busto, M. Garcia de Luis, J. Jimenez-Barbero, A. Avenoza, J. M. Peregrina, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 3863; c) F. Corzana, J. Busto, F. Marcelo, M. Garcia de Luis, J. C. Asenso, S. Martin Santamaria, J. Jimenez-Barbero, A. Avenoza, J. M. Peregrina, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 3105.
- [22] a) M. J. Scanlon, S. D. Morley, D. E. Jackson, M. R. Price, S. J. B. Tendler, *Biochem. J.* **1992**, 284, 137; b) J. D. Fontenot, N. Tjandra, B. Dawen, H. Chien, R. C. Montelaro, O. J. Finn, *Cancer Res.* **1993**, 53, 5386; c) J. A. Mollick, F. S. Hodi, R. J. Soiffer, L. M. Nadler, G. Dranoff, *Cancer Immunity* **2003**, 3, 3.
- [23] a) D. Valmori, A. Pessi, E. Bianchi, G. Corradin, *J. Immunol.* **1992**, 149, 717; b) P. Panina-Bordignon, A. Tan, A. Termijtelen, S. Demotz, G. Corradin, A. Lanzavecchia, *Eur. J. Immunol.* **1989**, 19, 2237.
- [24] M. Hemmelmann, D. Kurzbach, K. Koynov, D. Hinderberger, R. Zentel, *Biomacromolecules* **2012**, 13, 4065.
- [25] M. Allmeroth, D. Moderegger, B. Biesalski, K. Koynov, F. Rösch, O. Thews, R. Zentel, *Biomacromolecules* **2011**, 12, 2841.
- [26] C. Schüll, L. Nuhn, C. Mangold, E. Christ, R. Zentel, H. Frey, *Macromolecules* **2012**, 45, 5901.
- [27] a) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057; b) V. V. Rostovtsev, L.-G. Green, V. V. Fokin, K. G. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2708; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596.
- [28] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 379; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 366.
- [29] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 7688; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 7551.
- [30] H. D. Soule, J. Vazquez, J. Long, S. Albert, M. Brennan, *J. Natl. Cancer Inst.* **1973**, 51, 1409.