

Stabilisierung von Peptiden für intrazelluläre Anwendungen mit Phosphoramidat-verzweigten Polyethylenglycol-Ketten**

Nicole Nischan, Alokta Chakrabarti, Remigiusz A. Serwa, Petra H. M. Bovee-Geurts, Roland Brock und Christian P. R. Hackenberger*

Professor Andreas Herrmann zum 60. Geburtstag gewidmet

Peptid- und proteinbasierte Wirkstoffe haben sich zu wichtigen Therapeutika entwickelt, jedoch ist ihr Anwendungsbe-
reich durch eine kurze Zirkulationshalbwertszeit, bedingt durch Ausscheidung in der Niere, Antigenität und Proteolyse stark beschränkt.^[1] Eine bewährte Strategie zur Bewältigung dieser Probleme ist die Modifikation von Proteinen mit Polyethylenglycol (PEG), das die Proteinoberfläche gegen Proteasen abschirmt und eine adaptive Immunantwort verhindert.^[2] Dabei wurde gezeigt, dass verzweigte PEGs bei gleicher Molmasse durch den sogenannten „Regenschirmeffekt“ weitaus effektiver als lineare Ketten sind.^[3] Ist das Molekulargewicht des PEG etwa 30 kDa oder größer, wird außerdem die Ausscheidung in der Niere stark vermindert.^[4] Unter Ausnutzung derselben Mechanismen wurden auch andere Polymermaterialien, wie zum Beispiel Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamid] (HPMA)^[5] oder sogar Biopolymere wie Random Coils bestehend aus Prolin, Alanin und Serin (PASylierung)^[6] verwendet, um verschiedene Biopolymere zu stabilisieren, abzuschirmen und ihre Löslichkeit zu erhöhen. Die Vorteile einer PEGylierung wurden ebenfalls für die Entwicklung von Trägerstoffen für die gezielte Pharmakotherapie genutzt.^[7]

Derzeit zielen viele PEGylierungsstrategien auf nukleophile Seitenketten von kanonischen Aminosäuren ab – dabei reagieren Amino- oder Thiolgruppen mit elektrophilen PEG-Derivaten.^[8] Diesem Ansatz mangelt es jedoch an Ortsspe-

zifität, sodass die biologische Aktivität der Proteine verloren gehen kann; außerdem ist die Identifikation der Position und Anzahl der erfolgten PEG-Modifikationen schwierig.^[9] Alternativ dazu basieren ortsspezifische PEGylierungsstrategien auf der Expressierung von Proteinen, die nicht-kanonische Aminosäuren enthalten. Diese tragen reaktive Gruppen, die chemoselektiv PEGyliert werden können; am häufigsten nutzt man Ketone,^[10] Alkine^[10b,11] und Azide.^[10,12] Wir konnten zu diesen Methoden mit der Umsetzung von *p*-Azidophenylalanin(Pap)-enthaltenden Proteinen in einer Staudinger-Phosphit-Reaktion mit PEG-Phosphiten beitragen, die exzellente Ausbeuten liefert und chemoselektiv ist.^[13] Die Staudinger-Phosphit-PEGylierung hat den Vorteil, dass die symmetrischen PEG-Phosphite, die direkt aus kommerziell erhältlichen günstigen linearen PEG-Monomethylethern gewonnen werden, in der Staudinger-Phosphit-Reaktion mit dem Azid ein Phosphoramidat ergeben, das als Verzweigungspunkt gleichzeitig zwei PEG-Ketten an das Protein bringt (Abbildung 1).

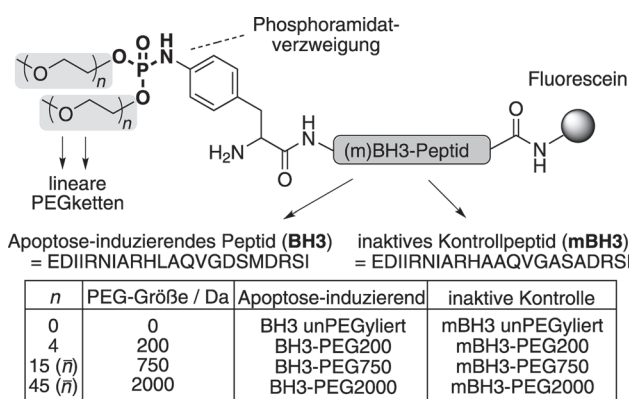


Abbildung 1. Struktur und Nomenklatur der hier verwendeten PEGylierten Phosphoramidat-verzweigten BH3-Peptidkonjugate.

In der vorliegenden Studie wollten wir zunächst den Einfluss Phosphoramidat-verzweigter PEG-Ketten auf die Stabilität von biologisch aktiven Peptiden in Zelllysaten bestimmen. Danach haben wir die nur selten betrachtete intrazelluläre Verteilung und schließlich die biologische Aktivität der PEGylierten Peptide in intrazellulärer Umgebung untersucht. Hierbei gingen wir davon aus, dass die über den Verzweigungspunkt eingebrachten kleinen bis mittleren PEG-Ketten die Peptide signifikant stabilisieren, während

[*] N. Nischan,^[†] R. A. Serwa, Prof. C. P. R. Hackenberger
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP)
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)
und

Humboldt Universität zu Berlin, Department Chemie
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)
und

Freie Universität Berlin, Institut für Chemie und Biochemie
Takustr. 3, 14195 Berlin (Deutschland)
E-Mail: hackenbe@fmp-berlin.de

A. Chakrabarti,^[‡] P. H. M. Bovee-Geurts, Prof. R. Brock
Department of Biochemistry, Nijmegen Centre for Molecular Life
Sciences, Radboud University Nijmegen Medical Centre
P.O. Box 1901, 6500 HB Nijmegen (Niederlande)

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

[**] Wir danken der DFG (SFB 765 und SPP 1623), dem Fonds der Chemischen Industrie, der Einsteinstiftung und der Böhlinger-Ingelheim Foundation (Plus 3 Award) für ihre Unterstützung. Wir danken Prof. Rainer Haag und Achim Wiedekind für die Bereitstellung des Nano Zetasizers sowie die hilfreichen Diskussionen.

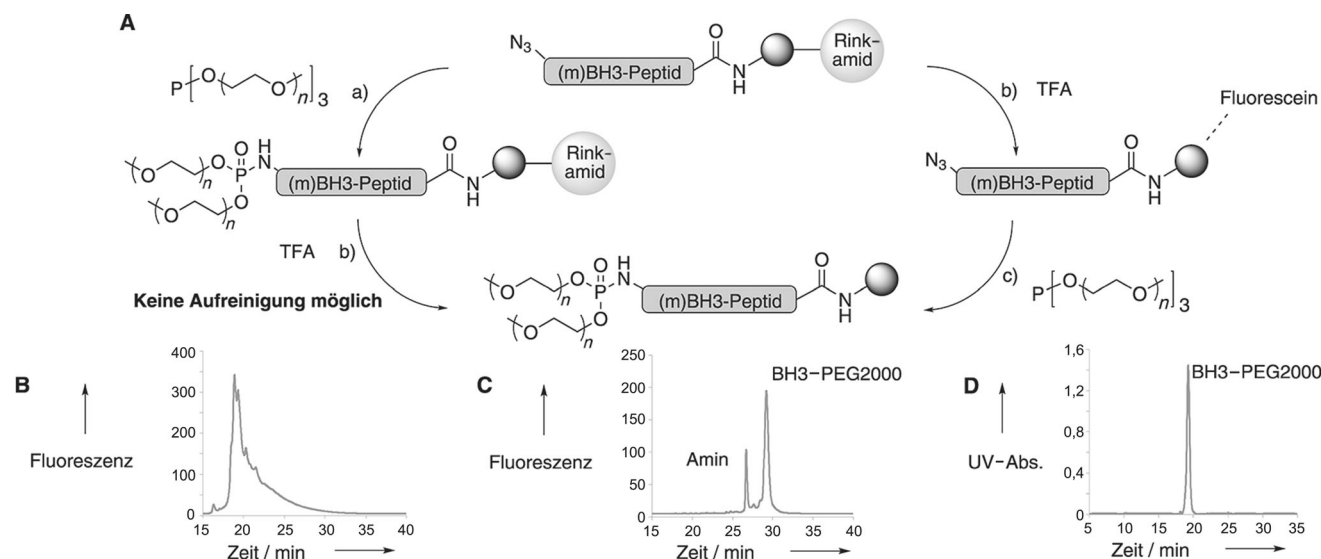
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201303467> zu finden.

die Aktivität des Peptids in Zellen erhalten bleibt. Bei der Anwendung der Staudinger-Phosphit-PEGylierung entschieden wir uns für ein synthetisch anspruchsvolles proapoptotisches Peptid. Dieses aus 22 Aminosäuren bestehende Modellpeptid wurde von der BH3-Domäne des proapoptotischen Proteins BID abgeleitet; dessen Aktivität als Auslöser des kontrollierten Zelltods kann indirekt über eine Messung der Caspase-3-Aktivität bestimmt werden.^[14] Caspase-3 ist eine Effektorcaspase, die während der frühen Phase der Apoptose aktiviert wird.^[15] BID, das proapoptotische BH3-only Aktivatorprotein aus der Bcl-2-Familie, kann direkt mit BAX, einem proapoptotischen Multidomänen-Bcl-2-Effektorprotein interagieren, um BAX-Homooligomere in der äußeren Mitochondrienmembran zu formen, was zur Freisetzung von Cytochrom C führt und so schließlich Caspasen aktiviert.^[16] Wir haben schon zuvor BID-BH3-Peptide benutzt, um den Einfluss der Präsentation auf linearen HPA-Gerüsten^[14] oder Multivalenz^[17] in Bezug auf intrazelluläre Aktivität zu untersuchen. Beide Studien zeigten, dass das unmodifizierte Peptid keine intrazelluläre Aktivität aufweist. In anderen Studien wurde gezeigt, dass Aktivität erzeugt werden kann, indem man die Konformation fixiert^[18] oder das Peptid in Membranen verankert.^[19] Im Übrigen wurden lineare PEGylierte BH3-Peptide bereits in Kombination mit Krebszellen-dirigierenden Hormonen und Medikamenten genutzt, um Apoptose in Krebszellen auszulösen.^[20] Zusammengefasst sind BH3-Peptide also ein hochinteressantes Modellsystem, um nachzuweisen inwieweit die Staudinger-Phosphit-PEGylierung die intrazelluläre Peptidaktivität erhöht.

Um den Peptidabbau sowie die intrazelluläre Peptidverteilung durch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) bzw. Konfokalmikroskopie zu verfolgen, wurde sowohl beim

verwendeten BH3-Peptid als auch bei der mutierten inaktiven Variante (mBH3) ein Carboxyfluorescein-Fluorophor am C-Terminus angebracht (Abbildung 1). Die zwei Phosphoramidat-verzweigten PEG-Ketten wurden am N-Terminus der Peptide positioniert. Sie bestanden aus PEG-Monomethylethern von entweder 4 (BH3- oder mBH3-PEG200, Nomenklatur siehe Abbildung 1), 15 ((m)BH3-PEG750) oder 45 ((m)BH3-PEG2000) Ethylenglycoleinheiten.^[21] Für ein Kontrollpeptid ohne stabilisierendes Polymer wurde stattdessen ein Dimethylphosphoramidat benutzt ((m)BH3 unPEGyliert).

Die Synthese der fluoreszierenden Peptide mit einem N-terminalen Pap erfolgte auf einem mit Carboxyfluorescein-Lysin beladenen Rinkamidharz^[22] mit Standard-Fmoc-Festphasenpeptidsynthese (SPPS; Schema 1). Die daraufhin durchgeführte Staudinger-Phosphit-PEGylierung mit den leicht zugänglichen PEG-Phosphiten (siehe die Hintergrundinformationen) ist entweder an der Festphase mit dem geschützten Arylazid-BH3-Peptid oder in Lösung mit dem ungeschützten Peptid möglich. Zuerst konzentrierten wir uns auf die Staudinger-Phosphit-Reaktion an der Festphase (Schema 1A links), weil so der verwendete Überschuss der PEG-Phosphite sowie der in der Reaktion gebildete PEG-Alkohol direkt entfernt werden können.^[23] Leider war es trotz verschiedener Optimierungsanstrengungen so nicht möglich, die gewünschten Produkte zu isolieren, da bereits während der SPPS viele Abbruchprodukte entstanden sind, welche nach der Staudinger-Phosphit-PEGylierung eine untrennbare Mischung von PEGylierten Peptiden mit breitem Retentionsverhalten ergaben (Schema 1B). Um dieses Problem zu umgehen, entschieden wir uns, die Chemo-selektivität der Staudinger-Phosphit-Reaktion zu nutzen und führten die PEGylierung nach der Abspaltung und Isolierung der



Schema 1. A) Staudinger-Phosphit-PEGylierung an der Festphase (links) und in Lösung (rechts). a) PEG-Phosphit (10 Äquiv.), DMF, 30°C, 16 h. b) 95% TFA, RT, 2 h c) PEG-Phosphit (10 Äquiv.), TRIS Puffer (100 mM, pH 8.2), 30°C, 16 bis 72 h. Mit: $n=0$ für (m)BH3 unPEGyliert, $n=4$ für (m)BH3-PEG200, $n=15$ (Mittel) für (m)BH3-PEG750, $n=45$ (Mittel) für (m)BH3-PEG2000 und BH3 = EDIIRNIARHLAQVGDMSMDRSI, mBH3 = EDIIRNIARHAAQVGASADRSI. B) Testabspaltung (HPLC, C18, Wasser/MeCN-Gradient) nach PEGylierung an der Festphase, C) HPLC des Rohprodukts nach PEGylierung des entschützten Azido-BH3-Peptids in Lösung. D) Isoliertes BH3-PEG2000 nach HPLC. Für Charakterisierung der PEGylierten BH3-Peptide sowie für verwendete Gradienten siehe die Hintergrundinformationen.

Azidopeptide mit HPLC in Lösung durch (Schema 1A rechts). In TRIS-Puffer (100 mM) bei einem pH von 8,4 mit 30 Äquivalenten Phosphit (zugegeben in drei Portionen) lief die Reaktion sehr gut, wobei die Aufreinigung einfach mit HPLC erfolgte (Schema 1C). Bei dieser Syntheseroute ist ein zusätzlicher Reinigungsschritt notwendig; nichtsdestotrotz erhielten wir saubere PEG-Phosphoramidat-Peptide laut Nachweis mit LC-HRMS (siehe die Hintergrundinformationen).

Hochgradig PEGylierte Moleküle können Aggregate oder mizellenähnliche Strukturen bilden,^[24] was die In-vivo-Aktivität eines biologisch aktiven Moleküls stark beeinflussen kann. Im Hinblick auf die späteren Zellexperimente untersuchten wir deshalb zunächst das Verhalten unserer PEG-Peptidkonjugate in Lösung. Dafür verwendeten wir dynamische Lichtstreuung (DLS), welche die Bestimmung des hydrodynamischen Radius erlaubt und so Schlüsse darüber zulässt, ob die Konjugate Aggregate formen. Bei einer Konzentration von 1 mM in PBS-Puffer lagen alle Konjugate als Monomer vor und wiesen somit keine Tendenz zur Aggregatbildung auf (siehe die Hintergrundinformationen).

Daraufhin untersuchten wir mit FCS^[25] die Stabilität der PEGylierten und unPEGylierten Peptide gegen proteolytische Spaltung durch Inkubation in rohem Jurkat-Zelllysats. FCS leitet aus der temporären Fluktuation von Fluoreszenz in einem konfokalen Detektionsvolumen von weniger als einem Femtoliter Informationen über die Konzentration und das Diffusionsverhalten von Molekülen ab.

Die Staudinger-Phosphit-PEGylierung führte zu einem dramatischen Anstieg der proteolytischen Halbwertszeit der Peptide (Abbildung 2a,b). Es gibt eine positive Korrelation

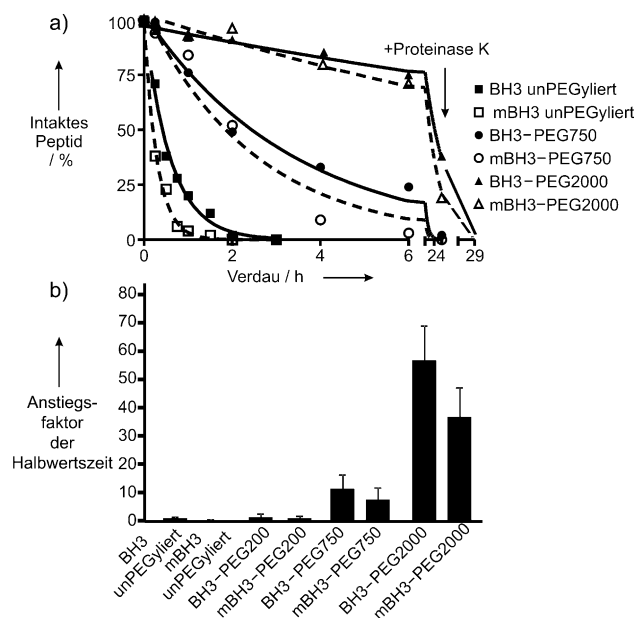


Abbildung 2. Proteolytische Stabilität der PEGylierten und unPEGylierten Peptide. a) Repräsentatives proteolytisches Abbauexperiment: Inkubation von Peptid (2 μ M) in rohem Zellysats von Jurkat-E6.1-Zellen und Analyse mit FCS. b) Anstiegsfaktoren der durchschnittlichen relativen Halbwertszeit und Standardabweichung der PEGylierten und unPEGylierten BH3-Peptide von drei unabhängigen Experimenten.

zwischen PEG-Kettenlänge und Stabilitätsanstieg (Abbildung 2b). Im Vergleich zu dem unPEGylierten Kontrollpeptid zeigten BH3-PEG200, BH3-PEG750 und BH3-PEG2000 einen Anstieg der Halbwertszeit um einen Faktor von 1,5, 11, bzw. 57. Der Zusatz einer hohen Konzentration von Proteinase K resultierte in der kompletten Zersetzung der PEGylierten BH3-Konjugate (Abbildung 2a und Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Dieses Ergebnis zeigt, dass die PEGylierung die Zugänglichkeit des Peptids für Proteasen zwar hemmt, eine proteolytische Spaltung aber möglich ist. Die beobachteten Unterschiede zwischen Wildtyp und mutierten Konjugaten sind innerhalb der Signifikanzgrenzen (Tabellen S1 und S2 in den Hintergrundinformationen).

Im nächsten Schritt untersuchten wir die intrazelluläre Verteilung der PEGylierten Peptide, vor allem weil langkettigen PEGs bekanntermaßen Membranfusion induzieren können.^[26] Aufgrund ihrer erhöhten Stabilität in Zelllysats konzentrierten wir uns auf die Konjugate BH3-PEG750 und BH3-PEG2000. Eine zelluläre Aufnahme wurde durch Elektroporation erzielt, bei der ein kurzer elektrischer Puls kurzzeitig Poren in der Plasmamembran entstehen lässt, die wie ein Größenfilter funktionieren. Um die intrazelluläre Peptidverteilung zeitabhängig zu verfolgen, wurden Jurkat-Zellen mit 100 μ M BH3-PEG750, BH3-PEG2000, unPEGyliertem BH3- oder einfach Fluorescein als Kontrolle elektroporiert und innerhalb von 6,5 h regelmäßig mit Konfokalmikroskopie an lebenden Zellen untersucht (Abbildung 3). Alle getesteten Konjugate zeigen 30 min nach der Elektroporation eine homogene Verteilung im gesamten Zytoplasma und dem Zellkern vergleichbar zu der von freiem Fluorescein. Wie

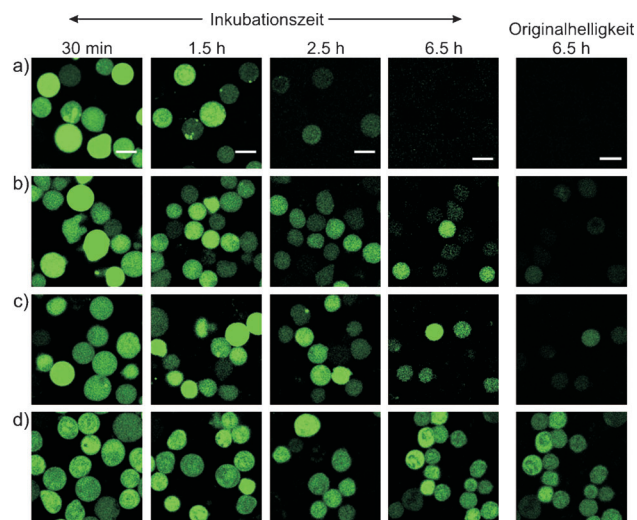


Abbildung 3. Zeitabhängige intrazelluläre Verteilung von PEGylierten und unPEGylierten BH3-Peptiden. Jurkat-E6.1-Zellen wurden elektroporiert mit einer Lösung von 100 μ M von a) Fluorescein oder b) BH3-unPEGyliert c) BH3-PEG750 oder d) BH3-PEG2000. Konfokalmikroskopie-Bilder wurden über insgesamt 6,5 h zu den gegebenen Zeitpunkten aufgenommen. Maßstabsleiste 10 μ m. Jedes Bild eines Zeitpunkts im gleichen Maßstab. Helligkeit und Kontrastparameter wurden so angepasst, dass die Lokalisation der Peptide über 6,5 h erkennbar ist. Unangepasste Spalte enthält Bilder mit zeitabhängiger Intensität ohne Helligkeits- und Kontrastanpassungen.

zuvor beobachtet,^[14] verlässt Fluorescein die Zellen in weniger als einer Stunde. Im Gegensatz dazu zeigen sowohl PEGylierte als auch unPEGylierte BH3-Peptide eine homogene Verteilung während der ersten 5 h und auch nach 6.5 h war die Fluoreszenz überwiegend homogen verteilt (Abbildung 3). Ausschließlich BH3-PEG2000 zeigte nach 6.5 h etwas Heterogenität in der nuklearen Verteilung. Außerdem beobachteten wir eine signifikant höhere intrazelluläre Retention der Fluoreszenz für BH3-PEG2000 im Vergleich zu BH3 unPEGyliert oder BH3-PEG750, wobei die intrazelluläre Residenzzeit letzterer vergleichbar war (Abbildung 3, unangepasst 6.5 h; Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen). In einer früheren Studie haben wir ein HPMA-gekoppeltes BH3-Peptid untersucht und beobachtet, dass ein Anstieg der proteolytischen Stabilität nicht von einer verlängerten intrazellulären Residenzzeit begleitet wurde.^[14] Da wir diese Korrelation jedoch für mehrere andere Peptide nachweisen konnten, zeigt unsere Beobachtung im vorliegenden Experiment, dass das unPEGylierte BH3-Peptid ein proteolytisches Fragment bildet, das nicht direkt die Plasmamembran überwinden kann.^[25]

Daraufhin untersuchten wir den Einfluss der stabilisierenden PEG-Phosphoramidatmodifikation auf die intrazelluläre Aktivität der BH3-Peptide. Dafür betrachteten wir zunächst ein BH3-Peptid mit möglichst kurzen PEG-Ketten bei gleichzeitig signifikanter Stabilisierung, da PEG-Modifikation auch mit Verlust der Aktivität der Proteine einhergehen können.^[27] Wir entschieden uns für BH3-PEG750, das wie vorher demonstriert eine solide Stabilisierung aufweist.

Nach der Elektroporation mit BH3-PEG750 bzw. mit der mutierten Variante (mBH3) wurden die Zellen 6 h lang inkubiert und anschließend die apoptoseinduzierende Aktivität mit einem Caspase-3-Assay bestimmt. Die Elektroporation wurde mit 100 μM und 300 μM Peptidlösungen durchgeführt. Zusätzlich diente Staurosporin (0.5 μM) als positive Kontrolle für die Caspase-3-Aktivierung in Jurkat-Zellen. Unsere Studien zeigen, dass nur BH3-PEG750 einen konzentrationsabhängigen signifikanten und spezifischen Anstieg von Caspase-3-Aktivität aufweist, im Vergleich zu den Zellen, die ohne Peptid elektroporiert wurden (leerelektroporiert; Abbildung 4a, Tabellen S3–S5 in den Hintergrundinformationen). Im Gegensatz dazu führte unPEGyliertes BH3 nur zu einem geringen Anstieg der Caspase-3-Aktivierung im Vergleich zur Elektroporationskontrolle; dieser Anstieg ist bei geringerer Konzentration jedoch unspezifisch, da das gleiche Maß an Aktivität auch für unPEGyliertes mBH3 beobachtet wurde. Spezifische Aktivität konnte für das unPEGylierte BH3-Peptid nur bei einer Konzentration von 300 μM nachgewiesen werden (Abbildung 4a). Im Hinblick auf die hier verwendeten hohen Peptidkonzentrationen sei bemerkt, dass bei Molekülen dieser Größe nur ein geringer Anteil in das Zytoplasma gelangt. Die Konzentrationen in der Zelle sind weit aus geringer als die in der Elektroporationsküvette.^[28]

Abschließend verglichen wir die intrazelluläre Aktivität von BH3-PEG750 und BH3-PEG2000 bei einer Konzentration von 100 μM . Interessanterweise zeigte BH3-PEG2000 trotz einer längeren intrazellulären Retentionszeit der Fluoreszenz keine höhere Aktivität (Abbildung 4b).

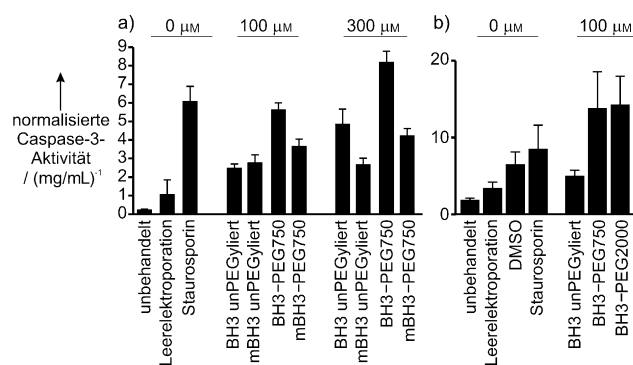


Abbildung 4. Anstiegsfaktor der Caspase-3-Aktivierung in elektroporierten Jurkat-E6.1-Zellen nach 6 h Inkubation, für die einzelnen Experimente normalisiert auf summierte Aktivität und den entsprechenden Proteingehalt. Die Ordinate zeigt Caspase-3-Aktivierung $\times 10^{-2}$ durch a) (m)BH3 unPEGyliert versus (m)BH3-PEG750 (Mittelwerte \pm Standardfehler (S.E.) dreier unabhängiger Experimente) b) BH3 unPEGyliert versus BH3-PEG750 und BH3-PEG2000. (Mittelwerte \pm S.E. zweier unabhängiger Experimente).

Zusammengefasst haben wir erfolgreich den Einfluss kleiner bis mittelgroßer Oligo- und Polyethylenglycolketten auf die Stabilisierung gegen Proteolyse in Zelllysaten und die intrazelluläre Aktivität von proapoptotischen BH3-Peptiden untersucht. Die Phosphoramidat-verzweigten PEGylierten BH3-Peptide wurden mithilfe der chemoselektiven Staudinger-Phosphit-Reaktion in Lösung hergestellt und zeigten eine 57fache Erhöhung der Halbwertszeit in Jurkat-Zelllysaten bei Einsatz von nur mittelgroßen PEG2000-Ketten ($n = 45$). Nachfolgend untersuchten wir die intrazelluläre proapoptotische Aktivität der PEGylierten BH3-Peptide. Für BH3-PEG750 konnte gezeigt werden, dass eine N-terminale PEGylierung zu einem signifikanten konzentrationsabhängigen Anstieg intrazellulärer Aktivität führt, obwohl das Molekulargewicht des Peptids verglichen mit dem unPEGylierten nur um einen Faktor von 1.5 erhöht ist. Außerdem blieb auch bei mittelgroßen Phosphoramidat-verzweigten PEG-Ketten die homogene zytoplasmatische Verteilung der Peptide erhalten. Zusammengefasst verdeutlichen diese Ergebnisse das Potential Phosphoramidat-verzweigter PEGylierter Biopolymere für das selektive Adressieren von intrazellulären biologischen Signalübertragungswegen mit pharmazeutischer und klinischer Relevanz. Wir arbeiten aktuell an weitergehenden Studien zur Kombination der Staudinger-Phosphit-PEGylierung mit direkter zellulärer Aufnahme.

Eingegangen am 23. April 2013,
veränderte Fassung am 19. Juni 2013
Online veröffentlicht am 22. August 2013

Stichwörter: Apoptose · PEGylierung · Peptide · Proteolyse · Staudinger-Phosphit-Reaktion

- [1] M. Werle, A. Bernkop-Schnuerch, *Amino Acids* **2006**, *30*, 351–367.
- [2] a) F. M. Veronese, G. Pasut, *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 1451–1458; b) J. M. Harris, R. B. Chess, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 214–221; c) K. Bellmann-Sickert, C. E. Elling,

- A. N. Madsen, P. B. Little, K. Lundgren, L.-O. Gerlach, R. Bergmann, B. Holst, T. W. Schwartz, A. G. Beck-Sicking, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2658–2667.
- [3] a) C. Monfardini, O. Schiavon, P. Caliceti, M. Morpurgo, J. M. Harris, F. M. Veronese, *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 62–69; b) C. J. Fee, *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *98*, 725–731.
- [4] M. Hamidi, A. Azadi, P. Rafiei, *Drug Delivery* **2006**, *13*, 399–409.
- [5] R. Duncan, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 1131–1148.
- [6] A. Skerra, I. Theobald, M. Schlapschy, Technische Universität München, WO2008155134(A1), **2008**.
- [7] a) Y. Cheng, L. Zhao, Y. Li, T. Xu, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2673–2703; b) H. Yu, Y. Nie, C. Dohmen, Y. Li, E. Wagner, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2039–2047.
- [8] G. Pasut, F. M. Veronese, *Adv. Polym. Sci.* **2006**, *192*, 95–134.
- [9] F. M. Veronese, *Biomaterials* **2001**, *22*, 405–417.
- [10] a) B. Peschke, M. Zundel, S. Bak, T. R. Clausen, N. Blume, A. Pedersen, F. Zaragoza, K. Madsen, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 4382–4395; b) R. E. Connor, K. Piatkov, A. Varshavsky, D. A. Tirrell, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 366–369.
- [11] R. L. M. Teeuwen, S. S. van Berkel, T. H. H. van Dulmen, S. Schoffelen, S. A. Meeuwissen, H. Zuilhof, F. A. de Wolf, J. C. M. van Hest, *Chem. Commun.* **2009**, 4022–4024.
- [12] a) C. S. Cazalis, C. A. Haller, L. Sease-Cargo, E. L. Chaikof, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1005–1009; b) A. Deiters, T. A. Cropp, D. Summerer, M. Mukherji, P. G. Schultz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5743–5745; c) M. F. Debets, S. S. van Berkel, S. Schoffelen, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, F. L. van Delft, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 97–99.
- [13] a) R. Serwa, P. Majkut, B. Horstmann, J.-M. Swiecicki, M. Gerrits, E. Krause, C. P. R. Hackenberger, *Chem. Sci.* **2010**, *1*, 596–602; b) R. Serwa, I. Wilkening, S. G. Del, M. Muehlberg, I. Claussnitzer, C. Weise, M. Gerrits, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8382–8387; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8234–8239; c) V. Böhrsch, T. Mathew, M. Zieringer, M. R. J. Vallée, L. M. Artner, J. Darnedde, R. Haag, C. P. R. Hackenberger, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 6211–6216; d) M. R. J. Vallée, L. M. Artner, J. Darnedde, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem.* **2013**, DOI: 10.1002/ange.201302462; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, DOI: 10.1002/anie.201302462.
- [14] I. R. Ruttekolk, A. Chakrabarti, M. Richter, F. Duchardt, H. Glauner, W. P. R. Verdurmen, J. Rademann, R. Brock, *Mol. Pharmacol.* **2011**, *79*, 692–700.
- [15] J. Varghese, N. S. Khandre, A. Sarin, *Apoptosis* **2003**, *8*, 363–370.
- [16] a) A. Letai, M. C. Bassik, L. D. Walensky, M. D. Sorcinelli, S. Weiler, S. J. Korsmeyer, *Cancer Cell* **2002**, *2*, 183–192; b) R. Elkholi, K. V. Floros, J. E. Chipuk, *Genes Cancer* **2011**, *2*, 523–537.
- [17] M. Richter, A. Chakrabarti, I. R. Ruttekolk, B. Wiesner, M. Beyermann, R. Brock, J. Rademann, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 16708–16715.
- [18] L. D. Walensky, A. L. Kung, I. Escher, T. J. Malia, S. Barbuto, R. D. Wright, G. Wagner, G. L. Verdine, S. J. Korsmeyer, *Science* **2004**, *305*, 1466–1470.
- [19] J. L. Wang, Z. J. Zhang, S. Choksi, S. Shan, Z. Lu, C. M. Croce, E. S. Alnemri, R. Korngold, Z. Huang, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 1498–1502.
- [20] a) P. Chandna, J. J. Khandare, E. Ber, L. Rodriguez-Rodriguez, T. Minko, *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 2296–2306; b) P. Chandna, M. Saad, Y. Wang, E. Ber, J. Khandare, A. A. Vetcher, V. A. Sol-datenkov, T. Minko, *Mol. Pharm.* **2007**, *4*, 668–678.
- [21] Polydispers, angegebene Werte sind berechnet aus den Zahlen-mitteln.
- [22] R. Fischer, O. Mader, G. Jung, R. Brock, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 653–660.
- [23] R. A. Serwa, J.-M. Swiecicki, D. Homann, C. P. R. Hackenberger, *J. Pept. Sci.* **2010**, *16*, 563–567.
- [24] Y. Bae, K. Kataoka, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 768–784.
- [25] I. R. Ruttekolk, J. J. Witsenburg, H. Glauner, P. H. Bovee-Geurts, E. S. Ferro, W. P. Verdurmen, R. Brock, *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 1077–1086.
- [26] J. Yang, M. H. Shen, *Methods Mol. Biol.* **2006**, 325, 59–66.
- [27] P. Bailon, A. Palleroni, C. A. Schaffer, C. L. Spence, W. J. Fung, J. E. Porter, G. K. Ehrlich, W. Pan, Z. X. Xu, M. W. Modi, A. Farid, W. Berthold, M. Graves, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 195–202.
- [28] Zum Beispiel betrug die intrazelluläre Konzentration eines 20 Aminosäuren langen Peptides weniger als ein Fünftel derer in der Elektroporationskuvette, siehe Lit. [25].