

- 17) G. Kurisu, H. Zhang, J. L. Smith, W. A. Cramer, *Science* 2003, 302, 1009
- 18) P. Jordan, P. Fromme, H. T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, N. Krauss, *Nature* 2001, 411, 909
- 19) A. Zouni, H.T. Witt, J. Kern, P. Fromme, N. Krauss, W. Saenger, P. Orth, *Nature* 2001, 409, 739
- 20) N. Kamiya, J. R. Shen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 98
- 21) V. Yankovskaya, R. Horsefield, S. Tornroth, C. Luna-Chavez, H. Miyoshi, C. Leger, B. Byrne, G. Cecchini, S. Iwata, *Science* 2003, 299, 700
- 22) H. Kettenberger, K. J. Armache, P. Cramer, *Cell* 2003, 114, 347
- 23) S. D. Lahiri, G. Zhang, D. Dunaway-Mariano, K. N. Allen, *Science* 2003, 299, 2067.
- 24) G. M. Blackburn, N. H. Williams, S. J. Gambin, S. J. Smerdon, *Science* 2003, 301, 1184c.
- 25) K. N. Allen, D. Dunaway-Mariano, *Science* 2003, 301, 1184d.



Norbert Sträter (Jahrgang 1965) studierte Chemie an der Universität Münster, wo er 1994 bei Bernt Krebs promovierte. Von 1994 bis 1997

war er als Postdoc bei William N. Lipscomb in Harvard. Anschließend wechselte er an das Institut für Chemie der FU Berlin (Labor Wolfram Saenger), wo er im Jahr 2001 habilitierte. Seit 2002 hat er die Professur für Strukturanalytik von Biopolymeren an der Fakultät für Chemie und Mineralogie der Universität Leipzig im Biotechnologisch-Biomedizinischen Zentrum inne. Seine Arbeitsgebiete sind die strukturelle Biochemie und die Proteinkristallographie.



Timm Maier (Jahrgang 1974) studierte Biochemie an der Universität Tübingen, und fertigte bei Wolfgang Voelter im Jahr 1999 seine Diplomarbeit an. Anschließend wechselte er an die Freie Universität Berlin, wo er bei Wolfram Saenger in seiner Doktorarbeit die Struktur von zwei Proteinen des humanen Sphingolipid-Stoffwechsels aufklärte. Nach der Promotion im Dezember 2003 begann er Anfang 2004 einen Postdoc-Aufenthalt in der Gruppe von Nenad Ban an der ETH Zürich und beschäftigt sich weiter mit der Kristallstrukturanalyse von Proteinen.

Engineering therapeutischer Proteine

Der Paradigmenwechsel zu den Biopharmazeutika

◆ Lange erschienen Proteine für die pharmazeutische Industrie wenig attraktiv. Als Haupthindernis für deren therapeutische Anwendung galt die fehlende orale Verfügbarkeit. Die Gentechnik wurde deshalb in erster Linie zur Herstellung rekombinanter Proteine als Wirkstoff-Targets für Struktur-Funktions-Analysen sowie zur Etablierung von Screening-Assays in der Medizinischen Chemie eingesetzt. Dagegen beschränkte sich die Produktion „therapeutischer Proteine“ zunächst auf klassische humane Biomoleküle, wie Insulin, Blutgerinnungsfaktoren oder Wachstumshormon, die sich in konventionellen Substitutionstherapien einsetzen ließen und dementsprechend große Märkte eroberten.

Die pessimistische Einschätzung hinsichtlich der Eignung von Proteinen als originäre „biopharmazeutische“ Wirkstoffe hat sich in den letzten Jahren allerdings gewandelt, wie unter anderem zwei jüngst erschienene Monographien belegen.^{1,2)} Den Wendepunkt dieser rasanten Entwicklung illustriert vermutlich am besten Herceptin (Entwicklungsname: Trastuzumab), ein bei Genentech entwickelter humanisierter Antikörper (Abbildung 1), der in Kombination mit konventionellen Cytostatika zur Behandlung von metastatisierendem Brustkrebs eingesetzt wird. Dessen Entstehungsgeschichte, von der Entdeckung des Targets über die Entwicklung als Wirkstoff in einem Biotechnologie-Unternehmen bis zu den regulatorischen Entscheidungsprozessen, ist inzwischen in einem Sachbuch nachzulesen.³⁾

Proteine mit ihrer hochentwickelten molekularen Erkennungsfähigkeit sind den klassischen niedermolekularen Arzneimitteln zumindest im Hinblick auf die Spezifität der pharmakologischen Wirkung häufig überlegen. In der Regel ist ih-

re Toxizität geringer, da die Polypeptide letztlich auf physiologischem Weg zu Aminosäuren abgebaut werden. Der Nachteil der notwendigen Verabreichung über die Blutbahn durch Injektion oder Infusion wird gerade im Fall lebensbedrohlicher Erkrankungen von den Patienten in Kauf genommen. Das zunehmende Verständnis der Struktur-Funktions-Beziehungen der Proteine bietet zudem die Möglichkeit, derartige Wirkstoffe für medizinische Anwendungen „maßzuschneidern“.

Dies betrifft nicht nur den biologischen Wirkmechanismus, sondern auch pharmakologische Parameter, die durch Variation der Aminosäuresequenz beeinflusst werden können: also Targetspezifität und -affinität sowie Pharmakokinetik und Toxizität/Metabolisierung (s. den Artikel „Neuartige Biopharmazeutika durch gezielte Manipulation pharmakologischer Parameter“, *Nachr. Chem.*, im Druck). Zudem eröffnen sich sogar andere, nicht mehr mit Eingriffen verbundene Darreichungswege.⁴⁾ Aufgrund dieser Produktvorteile wird für Proteintherapeutika ein schnell wachsendes Marktpotential von über 59 Mrd. US\$ bis zum Jahr 2010 erwartet.^{5,6)} Weltweit waren im September 2003 bereits 148 gentechnisch hergestellte Arzneimittel auf dem Markt. Davon haben 64 Biopharmazeutika, die insgesamt 30 Proteinwirkstoffe repräsentieren, erst in den letzten drei Jahren die Zulassung der Behörden erhalten.⁷⁾

Neuartige therapeutische Proteine

◆ Das Anwendungspotential von durch Protein-Engineering gewonnenen Biopharmazeutika verdeutlichen einige in jüngerer Zeit zugelassene Medikamente sowie Produktkandidaten, die sich in fortgeschrittenen klinischen Prüfungsphasen befinden. Abgesehen von der hier zitierten Fachliteratur finden sich detaillierte Informationen zu deren Zusammensetzung und Eigenschaften im Fall der bereits zugelassenen Proteintherapeutika auf den Web Sites der U.S. Food and Drug Administration (www.fda.gov) oder der European

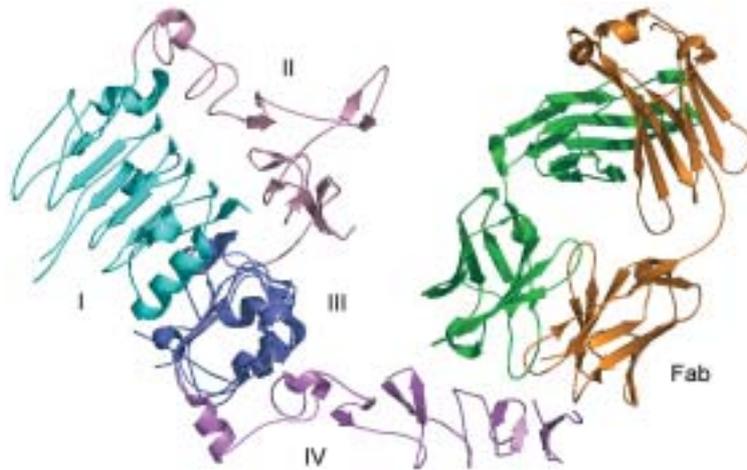


Abb. 1. Komplex aus dem Fab-Fragment des humanisierten Antikörpers Herceptin (Trastuzumab; leichte Kette orange, schwere Kette grün) und der extrazellulären Region (sHER2) seines humanen Rezeptor-Targets pHER2/neu.²⁵⁾ Diese zeigt mit ihren vier Domänen im Vergleich zu der ebenfalls aufgeklärten unkomplexierten Kristallstruktur von sHER2 der Ratte beinahe die gleiche Konformation. Offenbar wird ein aktivierter Zustand eingenommen, ähnlich wie er von der Bindung des EGF (an der Kluft zwischen Domäne I und III) an den verwandten Rezeptor sHER1 bekannt ist.

Agency for the Evaluation of Medicinal Products (www.emea.eu.int).

Ein nunmehr klassisches Beispiel ist das Insulin, das als erstes gentechnisch hergestelltes Proteintherapeutikum (Humulin von Genentech) vor mehr als 20 Jahren in den Handel kam. In den üblichen Formulierungen aggregiert natives Humaninsulin zu Dimeren und Hexameren, was eine durchaus erwünschte Depotbildung nach subkutaner Injektion zur Folge hat. Durch Veränderung der Aminosäuresequenz kann die Kinetik der Disaggregation und damit der Zeitverlauf der Bioverfügbarkeit des aktiven Insulins im Blutstrom beeinflusst werden. In den vergangenen drei Jahren wurden zwei Präparate mit gezielt manipulierter Pharmakokinetik zugelassen. „Insulin Aspart“ (NovaLog von Novo Nordisk) und „Insulin Lispro“ (Humalog von Eli Lilly) wirken besonders schnell, da das Insulin-Monomer entweder durch eine einzelne Aminosäuresubstitution, Prolin B28 gegen Asparaginsäure (Aspart), oder durch Permutation von Lysin B28 und Prolin B29 (Lispro) stabilisiert wurde. Demgegenüber verfügt „Insulin Glargine“ (Lantus von Aventis) über

verzögerte Wirkung und eignet sich zur Einstellung einer länger andauernden basalen Hormonkonzentration. Hierbei wurde der isoelektrische Punkt durch Austausch des C-terminalen Asparaginrests der A-Kette durch Glycin sowie Anhängen zweier zusätzlicher Argininreste an die B-Kette erhöht, was die Präzipitatbildung nach der Injektion sogar verstärkt.⁸⁾

Tenecteplase (TNKase von Genentech bzw. Metalyse von Boehringer Ingelheim), ein gentechnisch veränderter Gewebe-Plasminogenaktivator zur thrombolytischen Behandlung des Herzinfarkts,⁷⁾ ist ein Beispiel für einen enzymatischen Wirkstoff. Das 527 Aminosäuren umfassende Glycoprotein weist zwei Aminosäuresubstitutionen in der „Kringel 1“-Domäne auf (Threonin 103 zu Asparagin und Asparagin 117 zu Glutamin) sowie einen vierfachen Alaninaustausch der Reste 296–299 in der Proteasedomäne, die das Plasminogen in das letztlich fibrinolytisch wirkende Plasmin überführt.⁹⁾ Tenecteplase hat erhöhte Affinität zu Fibrin und zeigt in dessen Gegenwart verstärkte Aktivität, wobei die erhöhte Fibrinspezifität eine verminderte systemische Plasminogenspaltung bewirkt. Zudem führte

das Protein-Engineering zur Resistenz gegenüber dem Plasminogenaktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) sowie zu deutlich verlängerter Plasma-Halbwertszeit, was die Verabreichung durch Bolusinjektion (in einer rasch applizierten Portion) anstelle Infusion gestattet.

Trastuzumab (Herceptin) ist ein „humanisierter“ Antikörper, der gegen den HER-2/neu-Wachstumsfaktorrezeptor (p185^{HER-2}) gerichtet ist (Abbildung 1).^{10,11)} Seine Komplexbildung mit dem Rezeptor hat dessen beschleunigte Internalisierung zur Folge, wodurch die aggressive Proliferation der Tumorzellen gebremst wird. Die insgesamt sechs Peptidschleifen (CDRs), die die Antigenbindungsstelle des Immunglobulins bilden, wurden gentechnisch von einem zuvor generierten monoklonalen Antikörper der Maus (4D5) auf ein humanes Immunglobulingerüst transplantiert, um Abstoßungsreaktionen im Patienten zu reduzieren. Tatsächlich trat bei 903 untersuchten Patienten nur in einem Fall eine HAHA-Immunantwort (human-anti-humanisierter Antikörper) auf.¹²⁾ Als intaktes Immunglobulin muß dieses Biopharmazeutikum übrigens in Zellkultur produziert werden, um die für die biologische Funktion und lange Serumhalbwertszeit erforderliche Glycosylierung in der Fc-Region zu gewährleisten.

Die Zulassung von Adalimumab (Humira von Abbott) in den USA im Dezember 2002 markiert den Beginn einer neuen Generation von Antikörpertherapeutika.¹³⁾ Adalimumab wurde ursprünglich als rekombinantes Antikörperfragment D2E7 aus einer Phage-Display-Library von humanen Immunglobulingenen, die bei Cambridge Antibody Technology hergestellt worden war, selektiert. Dieser Antikörper bindet das proinflammatorische Cytokin TNF- α (Tumornekrose-Faktor), blockiert dessen Interaktion mit dem TNF-Rezeptor und wird als antagonistischer Wirkstoff zur Behandlung der schweren Rheumatoiden Arthritis (RA) eingesetzt. Im Gegensatz zu den nachträglich durch CDR-Trans-

plantation humanisierten Antikörpern wird Humira aufgrund der Gewinnung seiner Bindungsregion aus einem klonierten menschlichen Gen-Pool als „humaner“ Antikörper klassifiziert, was jedoch nicht dahingehend zu verstehen ist, dass dieses letztlich immer noch rekombinante Biomolekül in dieser Form tatsächlich im menschlichen Immunsystem vorkommt.

Etanercept (Enbrel von Immunex, Vertrieb durch Amgen und Wyeth) ist ein den Antikörpern strukturell verwandter Wirkstoff aus der Klasse der Immunadhäsine, die durch gentechnische Proteinfusion aus dem Fc-Teil eines Immunglobulins und der extrazellulären Domäne eines Rezeptors – oder auch einem anderen Bindungsprotein – hergestellt werden. Etanercept enthält ein Fragment des p75-TNF-Rezeptors und kann damit TNF- α komplexieren.¹⁴⁾ Die Fc-Region bewirkt endosomales Recycling und damit erheblich verlängerte Serumhalbwertszeit. Aufgrund der bivalenten Natur des Immunadhäsins sowie der trimeren Quartärstruktur des Cytokins werden zudem hochmolekulare Aggregate gebildet, die von Phagozyten aufgenommen werden können. Der Blockbuster Enbrel ist ebenfalls zur Behandlung der RA zugelassen.

Ein weiteres Immunadhäsine, das kürzlich Aufmerksamkeit erregt hat, ist „VEGF-Trap“ (von Regeneron und Aventis). VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ist ein Mediator des Gefäßwachstums nicht nur während der Embryonalentwicklung, sondern auch bei der Tumorgenese. Die zweite extrazelluläre Domäne des hochaffinen VEGF-Rezeptors 1 (Flt-1) wurde in diesem Fall mit der dritten extrazellulären Domäne des niedrigaffinen VEGF-Rezeptors 2 (Flk-1/KDR) und diese wiederum mit der Fc-Region eines IgG fusioniert.¹⁵⁾ Das entstehende lösliche dimere VEGF-Rezeptorprotein ist mit seiner Dissoziationskonstante im subpicomolaren Bereich konkurrierenden Antikörperpräparaten überlegen. Der VEGF-Antagonist unterbindet nicht nur die Vaskularisierung, sondern zerstört selektiv auch bereits gebilde-

te Gefäße in Tumoren. VEGF-Trap befindet sich in klinischen Studien der Phase I für solide Tumoren sowie Lymphome und kommt zudem für Anwendungen in der Ophthalmologie in Betracht.

Aktuelle Entwicklungen, Ausblick

◆ Die ermutigenden Erfolge der proteinbasierten Wirkstoffentwicklung haben eine Reihe von Forschungsansätzen stimuliert. Im Mittelpunkt steht unter anderem die Proteinglycosylierung, die einerseits für die biologische Aktivität sowie die pharmakokinetischen Eigenschaften zahlreicher Biopharmazeutika essentiell ist, andererseits aber besonderen Aufwand wegen des notwendigen Einsatzes höherer Zellen zur Produktion verursacht. Zudem ist die üblicherweise auftretende Heterogenität der N-Glycosylierung von Asparaginseitenketten ein schwer zu kontrollierender Parameter.

Ein im Hinblick auf die posttranslationale Modifizierung unkonventioneller Lösungsansatz wurde im Fall des „synthetischen Erythropoese-Proteins“ (SEP) beschrieben.¹⁶⁾ Die 166 Aminosäuren umfassende Polypeptidkette des humanen Erythropoetins (EPO) wurde an zwei der vier natürlichen Glycosylierungspositionen mit negativ geladenen Polymergruppen kovalent derivatisiert (Abbildung 2). Deren Struktur war bezüglich der selektiven Linkerchemie, des resultierenden hydrodynamischen Radius und der für die Rezeptorbindungsfähigkeit günstigen negativen Ladung ($pI \approx 5,0$) optimiert. Die in ihrer molekularen Zusammensetzung monodisperse und hochdefinierte Substanz zeigte sowohl in Zellkultur als auch im Tiermodell erythropoetischen Effekt, wobei die Serumhalbwertszeit gegenüber rekombinantem EPO zwei- bis dreifach verlängert war. Ob sich dieser künstliche Wirkstoff jedoch in den für eine Marktzulassung erforderlichen Quantitäten auch unter ökonomischen Aspekten synthetisieren lässt, bleibt abzuwarten.

Eine Strategie zur Intervention entzündlicher Prozesse bietet das

Design dominant-negativer Varianten von TNF.¹⁷⁾ Dieses proinflammatorische Cytokin wird in Form eines Transmembranproteins als Vorläufer synthetisiert und durch Proteolyse als Homotrimer mit 52 kDa freigesetzt. Die anhand der bekannten Raumstruktur geplante Doppelmutable Alanin145-Arginin / Tyrosin87-Histidin zeigt einerseits erheblich verringerte Affinität zu den TNF-Rezeptoren und, im Einklang damit, um mehr als vier Zehnerpotenzen schwächere Aktivierung der entsprechenden intrazellulären Signalwege. Andererseits ist diese Variante zur Bildung von Heterotrimeren mit nativem TNF befähigt, wobei in vitro 80% Austausch innerhalb von 20 min beobachtet wird und eine quasi ideale statistische Verteilung der heterooligomeren Spezies auftritt. Da offenbar schon die Anwesenheit einer einzelnen modifizierten Untereinheit im Trimer mit der biologischen Aktivität interferiert, sollte ein zehnfacher Überschuss der dominant-negativen Variante in mehr als 99% Verlust an funktionellem nativem TNF-Homotrimer resultieren. Tatsächlich konnte mit dieser TNF-Variante, die zwecks verlangsamter Clearance zudem mit Polyethylenglycol (PEG) derivatisiert war, in einem Rattenmodell der Kollagen-induzierten Arthritis ein deutlicher antiinflammatorischer Effekt demonstriert werden.¹⁷⁾

Erhebliches Einsatzpotential haben Biopharmazeutika nicht nur bei den Autoimmunerkrankungen, sondern auch in der Onkologie. Während konventionelle Chemotherapeutika ihre toxische Wirkung gegenüber dem Tumor in erster Linie aufgrund dessen schnellerer Zellteilungsrate entfalten, versprechen Proteinwirkstoffe, die gegen Zelloberflächenrezeptoren auf dem malignen Gewebe gerichtet sind, wesentlich höhere Spezifität und damit geringere Nebenwirkungen. Diese Aussichten erklären den Boom in der Entwicklung humanisierter Antikörper in den letzten Jahren mit derzeit etwa vier für die Onkologie zugelassenen Wirkstoffen und mehr

lung von Fusionsproteinen eignen. Allerdings weisen diese minimalen antigenbindenden Immunglobulinfragmente ihrerseits Nachteile in der praktischen Anwendung auf, insbesondere wegen der intrinsisch schwachen Faltungstabilität und des schwer kontrollierbaren Aggregationsverhaltens. Demzufolge zeichnet sich bereits ein Bedarf für immuntherapeutische Wirkstoffe der „dritten Generation“ ab, die wohl gänzlich auf Antikörperbestandteile verzichten werden und ihre Target-Erkennungsfunktion mit robusteren maßgeschneiderten Bindungsproteinen zuwege bringen. Ein Beispiel für ein geeignetes Protein-Scaffold²¹⁾ bieten die „Anticaline“, die auf der Grundlage menschlicher Lipocalinproteine konstruiert werden.²²⁾

Vielversprechende Perspektiven hinsichtlich der vereinfachten Anwendung eröffnen schließlich neuartige Formulierungen, die die nicht-invasive parenterale Verabreichung von Biopharmazeutika ermöglichen. Alternativ zur subkutanen und intravenösen Injektion sind therapeutische Proteine im Prinzip auch über die Schleimhäute der Atemwege, also pulmonal resorbierbar.⁴⁾ Bekanntestes Beispiel ist Exubera, ein inhalierbares Insulin,²³⁾ das von Aventis und Pfizer gemeinsam vermarktet werden soll. Die Applikation erfordert Aerosole aus 1–3 µm großen Proteinpartikeln, deren Herstellung mittlerweile in einem einstufigen Verfahren durch Sprühtrocknung aus überkritischen Flüssigkeiten gelingt (Inhale/Nektar-Verfahren). Adsorbiert auf Glaskügelchen können sie bis zu zwei Jahre bei Raumtemperatur gelagert werden. Optimierungsbedürftig ist noch die Bioverfügbarkeit, die nur 10–15 % des subkutan injizierten Insulins erreicht,²⁴⁾ der Rest geht wahrscheinlich durch Akkumulation bzw. Metabolisierung in Makrophagen verloren.

Nicht zuletzt mit solchen Ausichten auf die Vermeidung der „Spritze“ ist mit dem Einzug wirksamer Proteintherapeutika in den medizinischen Alltag ein Trend eingeleitet, der die Arzneimittelentwicklung insgesamt revolutionieren wird.

Arne Skerra
Lehrstuhl für Biologische Chemie
Technische Universität München
skerra@wzw.tum.de
Karsten Schürle
Informationssekretariat
Biotechnologie
Dechema
schuerle@dechema.de

- 1) P. Buckel, Recombinant Protein Drugs, Birkhäuser, Basel, 2001.
- 2) K. Dembowski, P. Stadler, Novel Therapeutic Proteins – Selected Case Studies, Wiley-VCH, Weinheim, 2001.
- 3) R. Bazell, Her-2: The Making of Herceptin, a Revolutionary Treatment for Breast Cancer, Random House, New York, 1998.
- 4) R. U. Agu, M. I. Ugwoke, M. Armand, R. Kinget, N. Verbeke, Respir. Res. 2001, 2, 198.
- 5) S. A. Marshall, G. A. Lazar, A. J. Chirino, J. R. Desjarlais, Drug Discov. Today 2003, 8, 212.



Arne Skerra (Jahrgang 1961) hat in Darmstadt und München Chemie studiert. Nach seiner Promotion am Gen-

Zentrum der Ludwig-Maximilians-Universität arbeitete er am Laboratory of Molecular Biology in Cambridge, England. Anschließend baute er eine eigene Arbeitsgruppe am MPI für Biophysik in Frankfurt/M. auf. 1994 erhielt er einen Ruf an die TU Darmstadt, wo er die Abteilung Proteinchemie leitete. Seit 1998 ist er Ordinarius an der TU München. 2003 wurde er in den Vorstand der Fachgruppe Biochemie der GDCh gewählt.



Karsten Schürle

(Jahrgang 1962) studierte Chemie in Darmstadt. Auf die Promotion in Biochemie folgte ein Postdoc-Aufenthalt in Tokyo und Okayama (Japan). Anschließend Fortbildung zum Wissenschaftsjournalisten. Ab 1994 Redakteur bei der Deutschen Krebsgesellschaft, 1996 Wechsel als Referent zum Informationssekretariat Biotechnologie (ISB) bei der Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie (DECHEMA) in Frankfurt/M.

- 6) I. Zipkin, A. Michael, S. Writers, BioCentury 1999, 7(70), A1.
- 7) G. Walsh, Nature Biotechnol. 2003, 21, 865.
- 8) H. Berchtold, R. Hilgenfeld, Biopolymers 1999, 51, 165.
- 9) B. A. Keyt, N. F. Paoni, C. J. Refino, L. Berleau, H. Nguyen, A. Chow, J. Lai, L. Pena, C. Pater, J. Ogez, T. Etcheverry, D. Botstein, W. F. Bennet., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91, 3670.
- 10) M. M. Goldenberg, Clin. Ther. 1999, 21, 309.
- 11) J. S. Ross, K. Gray, G. S. Gray, P. J. Worland, M. Rolfe, Am. J. Clin. Pathol. 2003, 119, 472.
- 12) C. A. White, R. L. Weaver, A. J. Grillo-Lopez, Annu. Rev. Med. 2001, 52, 125.
- 13) B. Bain, M. Brazil, Nat. Rev. Drug. Discov. 2003, 2, 693.
- 14) M. M. Goldenberg, Clin. Ther. 1999, 21, 75.
- 15) J. Holash, S. Davis, N. Papadopoulos, S. D. Croll, L. Ho, M. Russell, P. Boland, R. Leidich, D. Hylton, E. Burova, E. Ioffe, T. Huang, C. Radziejewski, K. Bailey, J. P. Fandl, T. Daly, S. J. Wiegand, G. D. Yancopoulos, J. S. Rudge, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002, 99, 11393.
- 16) G. G. Kochendoerfer, S. Y. Chen, F. Mao, S. Cressman, S. Traviglia, H. Shao, C. L. Hunter, D. W. Low, E. N. Cagle, M. Carnevali, V. Gueriguian, P. J. Keogh, H. Porter, S. M. Stratton, M. C. Wiedeke, J. Wilken, J. Tang, J. J. Levy, L. P. Miranda, M. M. Crnogorac, S. Kalbag, P. Botti, J. Schindler-Horvat, L. Savatski, J. W. Adamson, A. Kung, S. B. Kent, J. A. Bradburne, Science 2003, 299, 884.
- 17) P. M. Steed, M. G. Tansey, J. Zalevsky, E. A. Zhukovsky, J. R. Desjarlais, D. E. Szymkowski, C. Abbott, D. Carmichael, C. Chan, L. Cherry, P. Cheung, A. J. Chirino, H. H. Chung, S. K. Doberstein, A. Eivazi, A. V. Filikov, S. X. Gao, R. S. Hubert, M. Hwang, L. Hyun, S. Kashi, A. Kim, E. Kim, J. Kung, S. P. Martinez, U. S. Muchhal, D. H. Nguyen, C. O'Brien, D. O'Keefe, K. Singer, O. Vafa, J. Vielmetter, S. C. Yoder, B. I. Dahiyat, Science 2003, 301, 1895.
- 18) T. Gura, Nature 2002, 417, 584.
- 19) K. Haan, BioCentury 2003, 11(25), A3.
- 20) P. Carter, Nat. Rev. Cancer 2001, 1, 118.
- 21) A. Skerra, J. Mol. Recognit. 2000, 13, 167.
- 22) M. Vogt, A. Skerra, ChemBioChem 2004, 5, 191-199.
- 23) J. S. Patton, J. Bakar, S. Nagarajan, Adv. Drug Deliv. Rev. 1999, 35, 235.
- 24) L. Heinemann, A. Pflutzner, T. Heise, Curr. Pharm. Des. 2001, 7, 1327.
- 25) H. S. Cho, K. Mason, K. X. Ramyar, A. M. Stanley, S. B. Gabelli, D. W. Denney, Jr., D. J. Leahy, Nature 2003, 421, 756.