

3 KENNTNISSTAND

Die Synthese von Dendrimeren mit potentiellm Einsatz als makromolekulare Wirkstoffträger für Cytostatika ist ein hochgradig interdisziplinäres Forschungsgebiet an der Schnittstelle zwischen Chemie, Pharmazie und Medizin. Für biomedizinische Anwendungen ist es erforderlich, daß neben der optimalen Auswahl und Anbindung des gewünschten Cytostatikums auch der dendritische Wirkstoffträger alle Voraussetzungen für den Einsatz in lebenden Organismen erfüllt. Dazu gehören neben der Stabilität und guten Wasserlöslichkeit der ausgewählten Verbindungen auch ihre gezielte chemische Modifizierbarkeit und hohe biologische Verträglichkeit.^{[67], [112]}

3.1 Platinkomplexe als Wirkstoffe in der Krebstherapie

Zu den bekanntesten Tumortheraeutika gehören seit mehr als 30 Jahren Pt^{2+} -Komplexe wie Cisplatin und Carboplatin^X (Abb. 11).^{[113], [114]} Sie werden als Einzelpräparate oder in Verbindung mit anderen, synergistisch wirkenden Cytostatika wie Bleomycin^{XI} oder Doxorubicin breit bei der Behandlung verschiedener Krebsformen, vor allem des Hodenkarzinoms und Tumoren des Hals-Kopf-Bereiches eingesetzt.

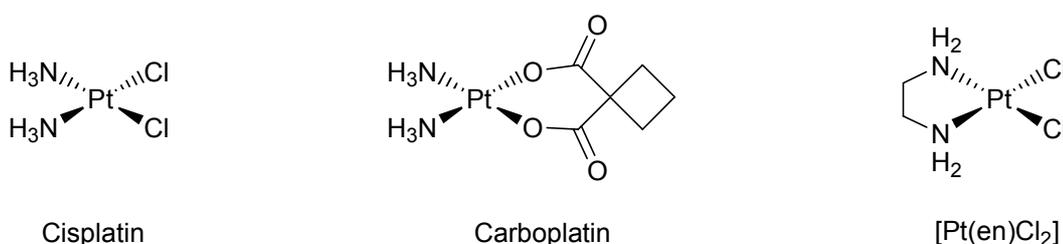


Abb. 11: Strukturformeln einiger biologisch aktiver Platinkomplexe.

Die Wirkung von Platinkomplexen auf die Zellteilung des Bakteriums *Escherichia coli* wurde 1965 von *Rosenberg et al.* eher zufällig entdeckt, als zur Untersuchung des Einflusses von schwachem Wechselstrom auf die Bakterienzellen Platinelektroden verwendet wurden.^[115] Dabei zeigte sich, daß zwar nicht das Bakterienwachstum, wohl aber die Zellteilung von *E. coli* durch gelöste Platinkomplexe gehemmt wurde, was zur Ausbildung langer, fadenförmiger Bak-

^X Der Chelatligand des Carboplatins ist Cyclobutan-1,1-dicarboxylat (CBDC).

^{XI} Bleomycin ist ein Eisen-haltiges Antibiotikum, das ebenfalls durch Interaktion mit der DNA cytotoxisch wirkt.

terienzellen führte. Nachfolgende Studien ergaben, daß die Hemmung der Zellteilung durch die beiden Komplexe $cis\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_4]$ und $cis\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ („Cisplatin“) verursacht wurde,^[116] und weitere Tests an Mäusen zeigten die große Antitumor-Aktivität dieser Verbindungen.^[117] Die Wirkungsweise der Platinkomplexe wurde seitdem in zahlreichen Studien ausführlich untersucht.^[118]

Nach Injektion und passivem Transport durch das Blut gelangt das noch intakte Cisplatin durch die Zellwände verschiedener Organe und des Tumors (Abb. 12). Im Inneren der Zellen wird es aufgrund der niedrigeren Chloridionenkonzentration rasch zu der besonders reaktiven Form $cis\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$ hydrolysiert.^[119] Wie alle platinhaltigen Cytostatika erreicht der Komplex seine Wirksamkeit durch Koordination an die Stickstoffatome der Nucleobasen in der DNA.^[120] Die Bindung an zumeist zwei benachbarte Guanosinnucleotide bewirkt eine Destabilisierung der DNA-Doppelhelix und erzeugt einen Schleifenknick („kink“) im Polymerstrang. Als Konsequenz dieser irreversiblen DNA-Bindung wird die DNA-Replikation gestört und damit die Zelle massiv geschädigt.

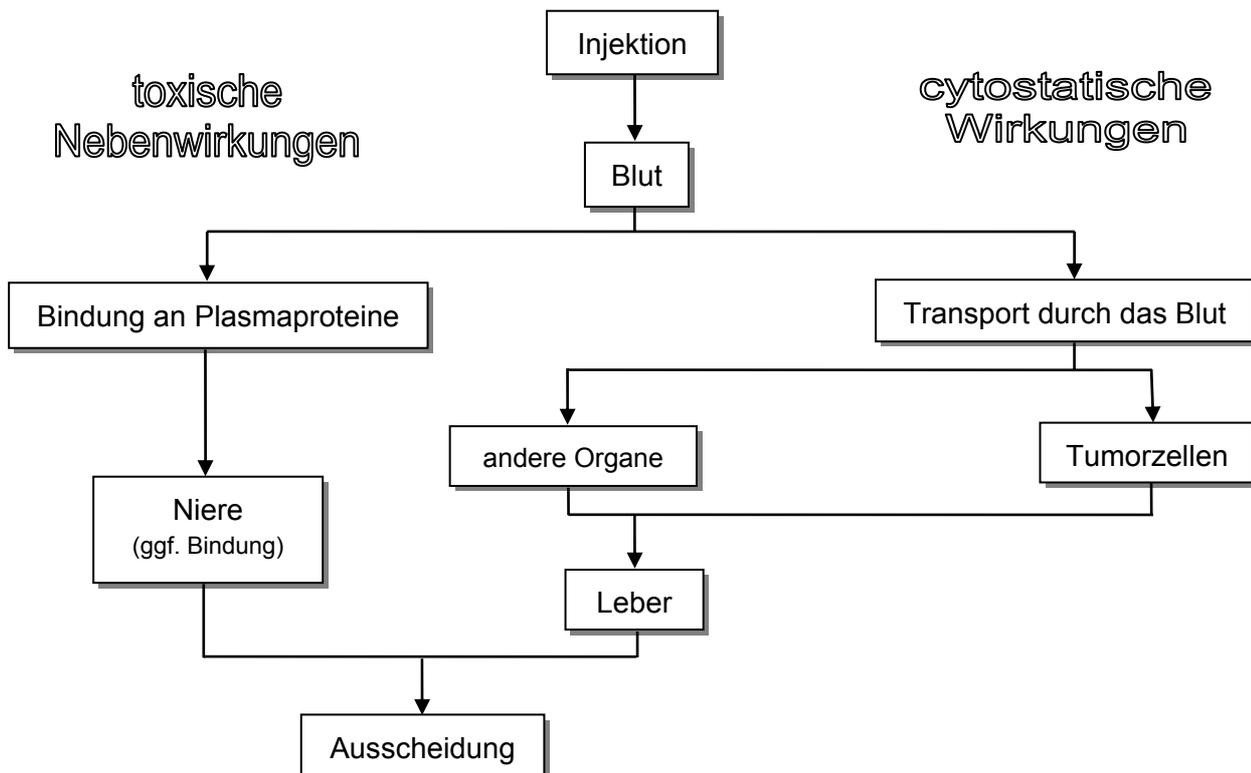


Abb. 12: Vereinfachte schematische Darstellung des Metabolismus von Cisplatin im menschlichen Körper.

Eines der größten Probleme der klassischen Platinkomplexe wie Cisplatin ist neben der fehlenden Selektivität für Tumorzellen, die zum Auftreten von Nebenwirkungen wie Nephro- und Neurotoxizität führt, vor allem ihre geringe Wasserlöslichkeit. Carboplatin ist zwar deutlich besser löslich in Wasser, aber auch viel reaktionsträger, so daß es wesentlich höher dosiert werden muß. In den letzten Jahren ging deshalb die Forschung in Richtung der Synthese möglichst gut wasserlöslicher Platinkomplexe. Auch wurden Platinkomplexe mit biologisch aktiven Trägerliganden wie z. B. Doxorubicin^[121] und Östrogen-Analoga^[122] hergestellt. Um die Wasserlöslichkeit der Platinkomplexe zu verbessern, wurde neben dem Austausch der Chloridliganden gegen chelatisierende Carboxylate (wie z. B. CBDC), Oxalat oder Glycolat noch eine Reihe von anorganischen Phosphonocarboxylat-Komplexen synthetisiert.^[123] Diese sehr gut wasserlöslichen Platinkomplexe zeichnen sich durch eine große Stabilität und hervorragende Aktivität bei Untersuchungen an Mäusen aus. Weiterhin wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen auch Versuche zur Anbindung der Platinkomplexe an polymere Träger unternommen. Wasserlösliche Polymer-Platin-Konjugate dieser Art werden in den nachfolgenden Kapiteln noch ausführlich besprochen.

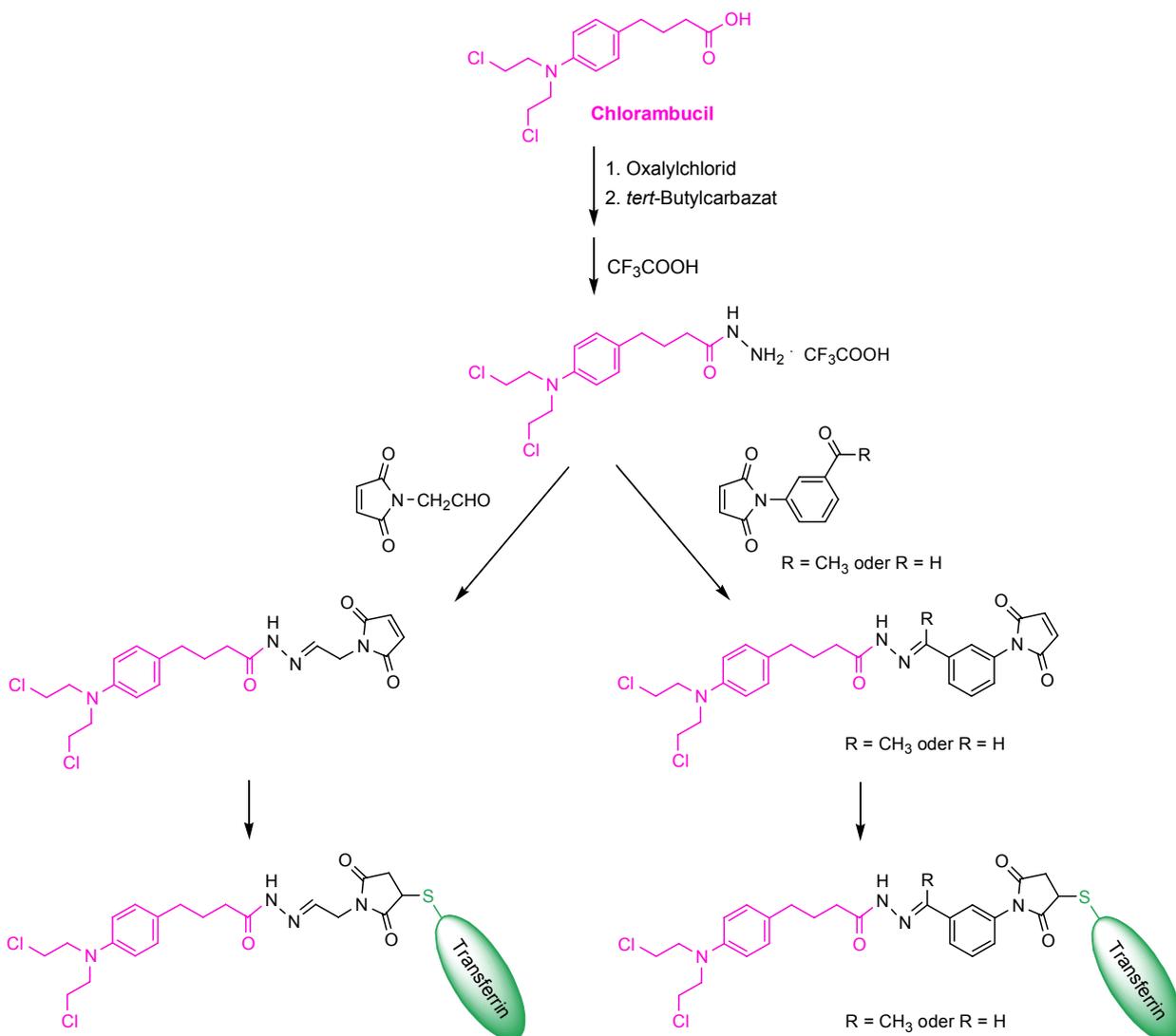
3.2 Polymer-Cytostatika-Konjugate

Das Konzept der steuerbaren, makromolekularen Wirkstoffträgersysteme wurde erstmalig 1975 von *Ringsdorf* beschrieben^[124] und hat seitdem intensiv verbessert und weiterentwickelt.^[125] Neben der Wirkstoffanbindung an natürlich vorkommende Proteine und Antikörper wurden in den letzten Jahren vermehrt auch synthetische Polymere und alternative Wirkstoffträgersysteme wie Liposomen^[126], Nanopartikel^[127], Mikrosphären^[128], Hydrogele^[129] und Immunotoxine^[130] synthetisiert und biologisch evaluiert. Aufgrund ihrer Größe und ihres hohen Molekulargewichtes haben Polymere eine verlängerte intravaskuläre Halbwertszeit.^{[125a], [131]} Durch den sogenannten „*enhanced permeability and retention (EPR)-Effekt*“^{XII} reichern sie sich dar-

^{XII} Der *EPR-Effekt* beruht auf dem Phänomen, daß Blutgefäße, die durch Angiogenese in der Nähe eines Tumors neu gebildet werden, große strukturelle Lücken aufweisen. Allgemein sind solche Gefäße weniger fest und durchlässiger für Makromoleküle als Gefäße, die normales „gesundes“ Gewebe versorgen. Die poröse Struktur dient dazu, den schnell wachsenden Tumorzellen genug Sauerstoff und Nährstoffe zur Verfügung zu stellen. Sie bewirkt aber gleichzeitig auch, daß große Makromoleküle die Gefäßwände passieren und in das umliegende Tumorgewebe diffundieren können (Extravasation). Dies führt zu einer selektiven Anreicherung von Makromolekülen in der Nähe von Tumoren. Darüber hinaus verhindert noch eine verminderte lymphatische Drainage im Tumorgewebe, daß die Makromoleküle wieder aus dem Gewebe abgeführt werden. Die verbleibenden Moleküle können dann von den Tumorzellen mittels Endocytose aufgenommen werden. Somit bietet der *EPR-Effekt* die Möglichkeit einer passiven Zielsteuerung von makromolekularen Wirkstoffträger-Systemen zum Tumorgewebe, womit sich potentiell die Nebenwirkungen für den Organismus minimieren lassen.

über hinaus noch passiv in Tumoren an^[132] und werden mittels Endocytose von den Tumorzellen aufgenommen. Die kovalente Anbindung von kleinen Cytostatikamolekülen an makromolekulare Träger bietet somit eine effiziente Methode, um die Spezifität der Cytostatika zu verbessern.

Zunächst schien es naheliegend, natürliche Biopolymere wie Proteine oder Antikörper für den Cytostatikumtransport zu verwenden. So wurde beispielsweise von *Kratz* und Mitarbeitern das Cytostatikum Chlorambucil kovalent an die Proteine Serumalbumin und Transferrin gebunden.^[99] Die Anbindung des Chlorambucils an humanes Transferrin erfolgte dabei über ein Chlorambucil-Maleimid-Derivat, das in einer schnellen und selektiven Reaktion mit Cystein-Thiolgruppen des Transferrins unter Ausbildung einer stabilen Thioetherbindung reagierte (Schema 2).



Schema 2: Anbindung von Chlorambucil an Thiolgruppen des humanen Serumtransferrins nach *Kratz et al.*^[99]

Dullens et al. zeigten am Beispiel ihrer Chlorambucil-Antikörper-Konjugate hingegen schon früh, daß für den Cytostatikumtransport auch allein physikalische Adsorption genutzt werden kann.^[133] Daneben können auch im Protein enthaltene Aminosäuren wie Histidin, Tyrosin oder Asparaginsäure als Liganden für die Komplexbildung von cytostatischen Metallionen dienen. Dies konnte so von *Sadler* und Mitarbeitern für die Bindung und Freisetzung von Ti^{4+} an humanes Transferrin gezeigt werden.^[134]

Um die Nachteile der proteinogenen makromolekularen Trägermoleküle wie Instabilität und Immunogenität zu umgehen, wurde in den letzten Jahren eine Reihe von synthetischen Polymeren als Trägermoleküle für Cytostatika eingesetzt. So verwendeten *Liao und Zhuo* Poly(L-lysin) als Träger für das Cytostatikum 5-Fluorouracil^[102] und *Wallace* und Mitarbeiter banden den Antitumorwirkstoff Paclitaxel kovalent an Poly(L-Glutaminsäure) als wasserlösliches, makromolekulares Trägermolekül^[104]. Biologisch aktive (Diamin)platin Komplexe wurden von *Song und Sohn* über Dicarboxylat-Spacer oder über Glutamat oder Aspartat an Polyphosphazene gebunden.^[135] Einen neuen Weg zur Anbindung von *trans*-(Diamin)platin(II)-Komplexen beschritten 2002 *Boom, Reedijk und Lippert*, die als polymeres Trägermolekül „peptide nucleic acid (PNA)“-Oligomere^{XIII} einsetzten.^[136] Die Komplexbildung der Pt^{2+} -Metallionen erfolgte dabei über das Guanosin-Nucleotid eines geschützten PNA-Bausteins, der nachfolgend mittels Festphasensynthese an ein PNA-Oligomer angehängt wurde.

Die bis heute am umfangreichsten untersuchte Gruppe makromolekularer Träger zum gerichteten Transport von Krebstherapeutika ist dennoch zweifellos die der *N*-(2-Hydroxypropyl)-methacrylamid (HPMA)-Copolymere.^[137] Es handelt sich hierbei um wasserlösliche, biokompatible^[138] und nichtimmunogene^[139] Polymere, von denen mittlerweile schon einige Konjugate in Phase I und II der klinischen Versuche sind.^[140] An HPMA-Copolymere wurden schon unterschiedlichste Cytostatika angehängt und mit bestimmten „targeting“-Sequenzen zur Zielsteuerung auf Krebszellen versehen. *Seymour* und Mitarbeiter untersuchten beispielsweise HPMA-Copolymere mit kovalent gebundenem Doxorubicin und Galactose als „targeting“-Molekül für den Asialoglycoprotein (ASGPR)-Rezeptor auf der Membran bestimmter Krebszelllinien.^[141] Das Cytostatikum Doxorubicin wurde hierbei über einen Peptid-Spacer an das Polymer gebun-

^{XIII} Peptide nucleic acids (PNAs) sind DNA-Mimetika, in denen das Zuckerphosphatrückgrat durch *N*-(2-Aminoethyl)glycin-Einheiten ersetzt ist. Durch ihre hohe chemische und biologische Stabilität und ihre starken und spezifischen Bindungseigenschaften für gewisse DNA- oder RNA-Sequenzen sind sie vielversprechende Kandidaten für die Regulation der Genexpression in biomedizinischen Anwendungen. Für einführende Literatur zu diesem Thema, siehe: P. E. Nielsen, M. Engholm, R. H. Berg, O. Buchardt, „Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide“, *Science* **1991**, *254*, 1497-1500 und D. A. Dean, „Peptide nucleic acids: versatile tools for gene therapy strategies“, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, *44*, 81-95.

den, das nach endocytotischer Aufnahme in den Krebszellen mittels Spaltung durch lysosomale Cysteinproteasen freigesetzt werden kann (Abb. 13a). Weiterhin zeigten *Duncan et al.*, daß auch

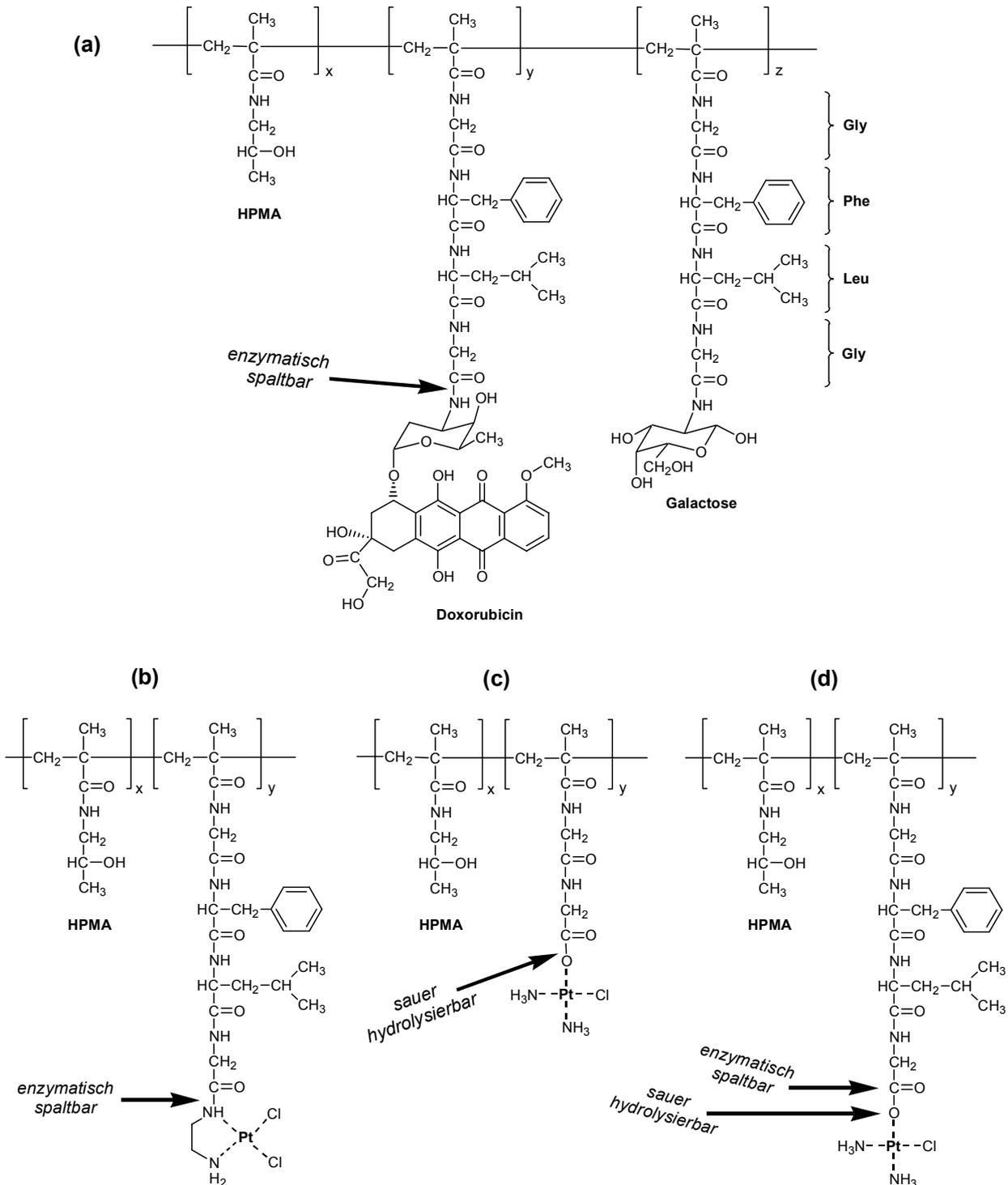


Abb. 13: Strukturformeln der HPMA-Copolymer-Wirkstoff-Konjugate mit spaltbaren Spacern nach *Duncan* und *Kopeček*. (a) HPMA-Copolymer mit Doxorubicin an enzymatisch spaltbarem Spacer und *N*-Acetylgalactose als „targeting“-Molekül für den ASGPR-Rezeptor, (b) HPMA-Copolymer mit Ethylendiamin-gebundenem Platin(II)komplex an enzymatisch spaltbarem Spacer, (c) HPMA-Copolymer mit Carboxylat-gebundenem Platin(II)komplex an säurelabilem Spacer und (d) HPMA-Copolymer mit Carboxylat-gebundenem Platin(II)komplex an säurelabilem und/oder enzymatisch spaltbarem Spacer.

cytostatisch aktive Platinkomplexe an HPMA-Copolymere gebunden werden konnten.^[105] Hier erfolgte die Anbindung der Platinkomplexe an das Polymerrückgrat entweder über einen proteolytisch spaltbaren Peptidspacer oder über eine in Lysosomen sauer hydrolysierbare Verbindungssequenz (Abb. 13b-d). Neben Zuckern^{[141],[142]} wurden als „targeting“-Sequenzen bei HPMA-Copolymeren häufig auch Antikörper oder Antikörperfragmente verwendet, die bestimmte Epitope auf der Plasmamembran der Krebszellen erkennen^[143]. Dazu wurden synthetische Methoden entwickelt, die die Antikörper sowohl über freie Aminogruppen (statistische Anknüpfung)^[143a, c] als auch über die Aldehydgruppen oxidierter Zuckerdomänen (zielgerichtete Anknüpfung)^[143c] an das Polymer binden. Antikörperfragmente können direkt über ihre SH-Gruppen mit einer Maleimidgruppe am Polymer (Thioether-Bindung)^{[143c],[144]} reagieren. Die größten Nachteile der HPMA-Copolymere wie auch der meisten anderen synthetischen Polymere für biomedizinische Anwendungen sind die fehlende biologische Abbaubarkeit des Polymerrückgrats und die Schwierigkeiten bei der Synthese von Polymeren mit niedriger Polydispersität.^[145]

3.3 Dendrimer-Cytostatika-Konjugate

Die Verwendung von Dendrimern als Trägersubstanzen für Cytostatika^{[3b], [67]}, ist neben ihrem Einsatz als Transfektionsreagenzien^[68-71] und in der BNCT^[88-92] vermutlich eines der zukünftigen Hauptanwendungsgebiete für Dendrimere im biomedizinischen Bereich (vgl. Kap. 1). Vorteile der Dendrimere im Vergleich zu klassischen Polymeren ist ihre Monodispersität, die hohe Endruppendichte auf ihrer Oberfläche sowie die Möglichkeiten einer gezielten Oberflächenfunktionalisierung.

Allgemein gibt es drei verschiedene Möglichkeiten, um Cytostatika mit Dendrimern zu transportieren und im Organismus zu verteilen. Dies kann erreicht werden, indem man die Wirkstoffe im Inneren eines Dendrimeres einschließt, sie stabil und kovalent an die Endgruppen eines Dendrimers bindet oder sie durch spaltbare „Spacer“ mit den peripheren Gruppen eines Dendrimers verknüpft (Abb. 14).

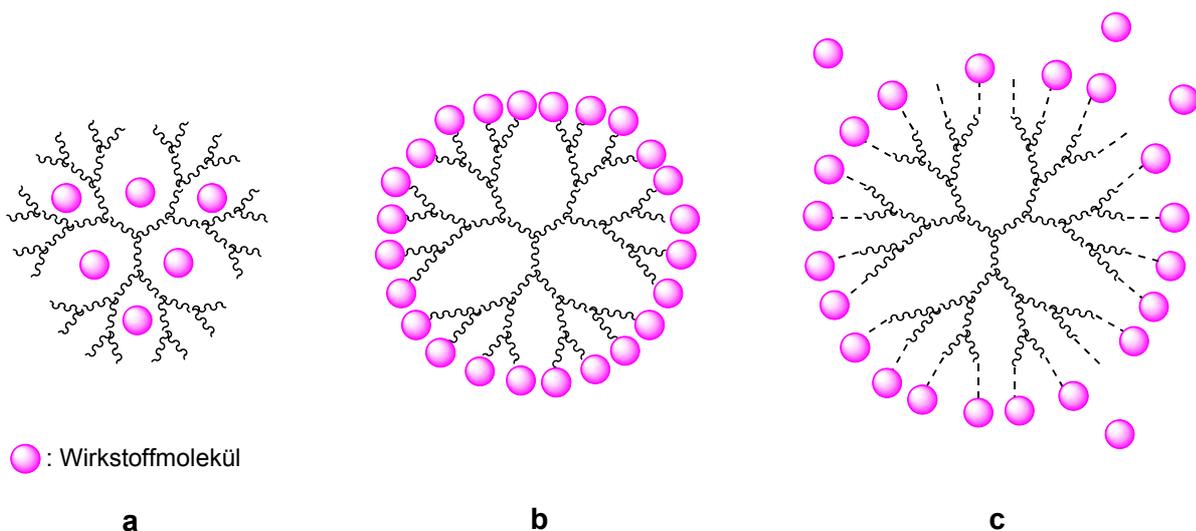


Abb. 14: Möglichkeiten des Transportes von Wirkstoffmolekülen durch Dendrimere. (a) Das Cytostatikum ist im Inneren eines Dendrimers eingeschlossen und kann gezielt wieder freigesetzt werden, (b) der Wirkstoff ist kovalent an die peripheren Gruppen eines Dendrimers gebunden und (c) das Cytostatikum ist über einen spaltbaren Spacer an das Dendrimer gebunden.

Obwohl es sich beim Typen (a) in Abb. 14 nicht um wirkliche Dendrimer-Cytostatika-Konjugate handelt, wurden solche Wirt-Gast-Wechselwirkungen zwischen Dendrimern und hydrophoben Wirkstoffmolekülen doch als erste systematisch untersucht. So beschrieben im Jahre 1999 *Twyman et al.* die Synthese von zwei wasserlöslichen PAMAM-Dendrimern mit peripheren Hydroxylgruppen zur potentiellen Verwendung als Wirkstoffträgermoleküle

(Abb. 15a).^[146] Die Autoren untersuchten mit diesen Dendrimeren die Komplexbildung einer Reihe kleiner, hydrophober Säuren als Gastmoleküle und Modelle für Cytostatika. Der (1 : 1)-

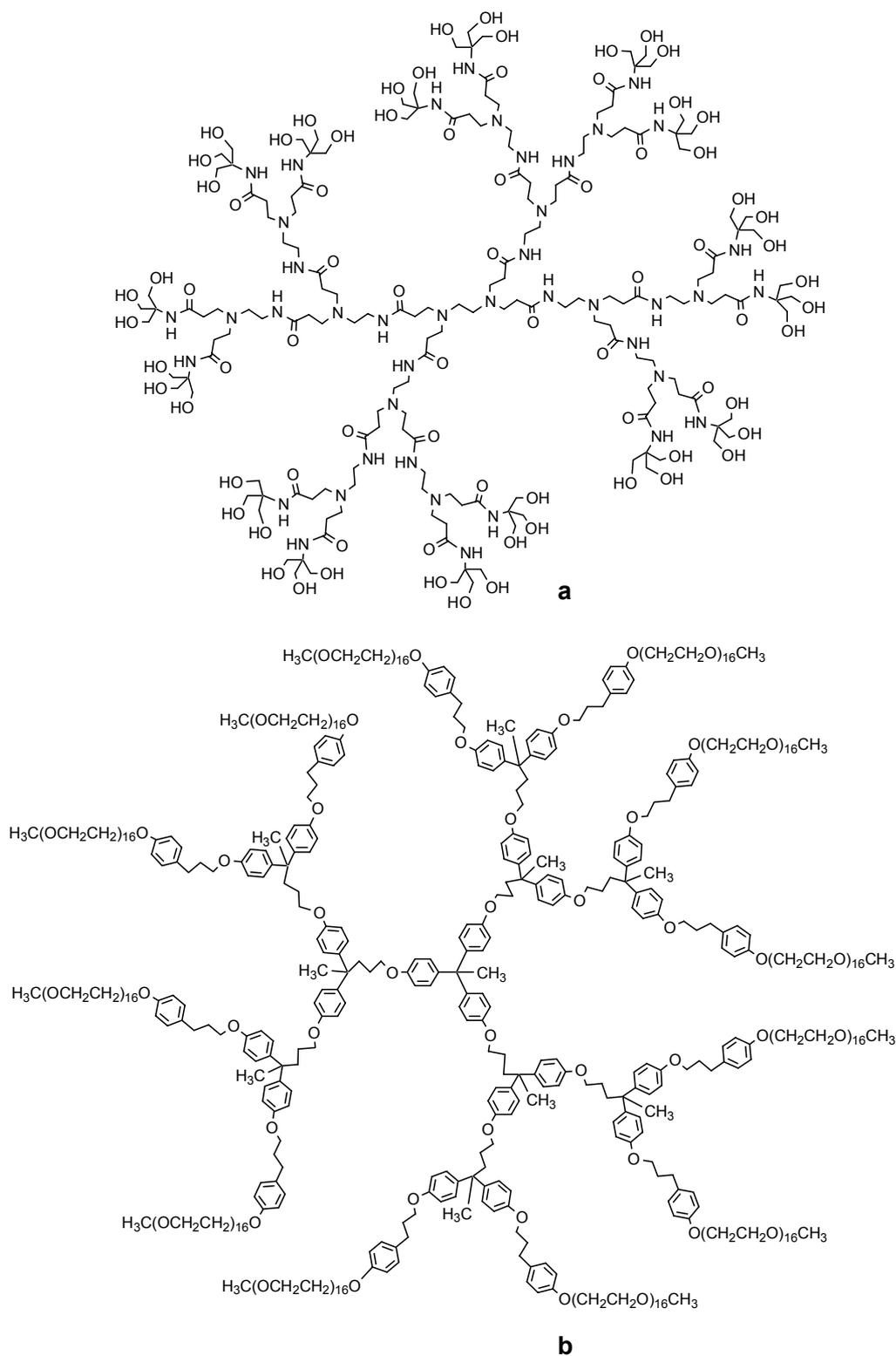


Abb. 15: Dendritische unimolekulare Micellen zur Adsorption von Cytostatika in ihrem Inneren. (a) Ein wasserlösliches G2 Hydroxyl-PAMAM-Dendrimer nach *Twyman et al.* und (b) ein dendritischer G2 Hypercore mit peripheren PEG-Ketten nach *Fréchet et al.*

Komplex des Dendrimers mit Benzoesäure war in Wasser vollständig löslich und bei neutralem pH-Wert stabil, zerfiel aber unter sauren Bedingungen. Daraus schlossen die Autoren, daß zur Stabilisierung des Komplexes eine Wechselwirkung zwischen den sauren Protonen des Gastmoleküls und den basischen tertiären Stickstoffen des Dendrimers wichtig war. Eine weitere Untersuchung dieser Art wurde 2000 von *Kono* und Mitarbeitern mit der Synthese von PAMAM-Dendrimern mit peripheren PEG-Ketten vorgestellt.^[147] Die Fähigkeit der Dendrimere zum Einschluß der Cytostatika Adriamycin und Methotrexat nahm mit wachsender Dendriergeneration und mit zunehmender Länge der PEG-Ketten auf der Dendrimeroberfläche zu. Das beste Ergebnis erhielten die Forscher mit einem G4-Dendrimer, das PEG-Ketten mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 2000 g/mol trug. Dieses konnte im Durchschnitt 6,5 Moleküle Adriamycin oder 26 Moleküle Methotrexat pro Dendrimermolekül binden. In einem Medium mit schwacher Ionenstärke konnten diese Systeme Methotrexat langsam und gezielt wieder aus ihrem Inneren entlassen, während in isotonischen Lösungen sowohl Adriamycin als auch Methotrexat sofort von den Dendrimern freigesetzt wurden. Kürzlich wurde aus der gleichen Arbeitsgruppe die Synthese von PAMAM-Dendrimern mit PEG- und Cystein-Resten berichtet, die in einer oxidierenden Umgebung Wirkstoffmoleküle fest einschließen und diese dann unter reduzierenden Bedingungen gezielt wieder freisetzen können.^[148] Dieser Effekt wurde durch eine Quervernetzung der Cysteinreste erreicht, die an der Dendrimerperipherie eine Netzwerkstruktur ausbildeten. Anhand des Farbstoffs „Rose Bengal“ konnte gezeigt werden, daß das Netzwerk eine effektive Barriere für den Austritt von kleinen Molekülen aus dem Dendrimerinneren darstellt. Ebenfalls im Jahr 2000 berichteten auch *Fréchet et al.* die Synthese wasserlöslicher dendritischer unimolekularer Micellen mit einem hydrophoben Kern und hydrophiler Außenhülle zur potentiellen Anwendung als Wirkstoffträgersysteme (Abb. 15b).^[149] Dazu wurden vier Generationen von dendritischen Hypercores mit jeweils 6, 12, 24 oder 28 phenolischen Endgruppen synthetisiert und anschließend mit PEG-Monomethylether-Mesylat umgesetzt. Die Fähigkeit dieser dendritischen „Container“ zum Einschluß von Wirkstoffmolekülen wurde mit der Modellsubstanz Indomethacin untersucht. Die dendritischen Micellen enthielten 11 Gew.% Indomethacin, und erste Untersuchungen zeigten, daß der Wirkstoff *in vitro* auch gezielt wieder freigesetzt werden kann.

Eine neue Entwicklung in der Krebstherapie ist der gezielte DNA-Transfer in Tumorzellen. Auch in diesem Bereich wurden kürzlich PAMAM-Dendrimere eingesetzt.^[150] *Soria* und Mitarbeiter komplexierten diese Dendrimere mit DNA-Oligomeren, die für Angiostatin und TIMP-2 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase) kodierende Bereiche enthielten. Mit diesen

Dendrimer-DNA-Komplexen wurden dann Krebszellen transfiziert, worauf es *in vivo* zu einer 96 %igen Inhibierung des Tumorwachstums und einer Verminderung der Angiogenese kam.

Um klassische Dendrimer-Wirkstoff-Konjugate zu erhalten, wurden in den letzten Jahren bereits unterschiedliche biologisch aktive Moleküle an die peripheren funktionellen Gruppen von Dendrimeren angebracht und die entsprechenden Systeme biologisch evaluiert. Zu solchen biologisch aktiven Molekülen gehörten vor allem diverse Zucker^[151] zur Zellerkennung und Antikörper^{[84], [152]} zum gerichteten „targeting“ der Konjugate auf Krebszellen. Im Gegensatz dazu lagen zu Beginn dieser Arbeit kaum grundlegende Studien zur Synthese und biologischen Evaluierung von Dendrimer-Cytostatika-Konjugaten vor. Die einfachste Möglichkeit zur Synthese solcher Konjugate ist die direkte Anbindung der Cytostatika an die „Oberfläche“ der Dendrimere (vgl. Abb. 14b). Die erste so geartete Studie wurde 1999 von *Zhuo et al.* vorgelegt, in der die Autoren die Synthese von Poly(amidoamin)-Dendrimeren mit einem 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-Kernmolekül berichteten, an die sie 5-Fluorouracil anbrachten.^[106] Durch anschließende Hydrolyse dieser Dendrimer-Fluorouracil-Konjugate bei 37 °C in Phosphat (PBS)-Puffer (pH 7,4) konnte das Cytostatikum wieder freigesetzt werden. Das Ausmaß der 5-Fluorouracil-Freisetzung war dabei abhängig von der jeweils verwendeten Dendrimergeneration. Im gleichen Jahr veröffentlichte auch die Arbeitsgruppe *Fréchet* einige grundlegende Arbeiten zur Synthese von Poly(arylether)-Dendrimeren und deren Modifikation mit Wirkstoffmolekülen, „targeting“-Funktionen und/oder löslichkeitsvermittelnden Gruppen. Dazu waren zunächst Dendrimer-Grundkörper nötig, die selektiv und zielgerichtet mit mehr als einer funktionellen Gruppe versehen werden konnten. Das erste solche Beispiel eines potentiellen Dendrimer-Wirkstoff-Konjugates stellten die Autoren mit einem Polyether-Dendrimer vor, das in der Peripherie sowohl kurze PEG-Ketten zur Löslichkeitsvermittlung als auch ein Modell-Wirkstoffmolekül (Cholesterol oder eine natürliche Aminosäure) trug (Abb. 16a).^[95] Ein anderes Poly(arylether)-Dendrimerensystem mit zwei unterschiedlichen funktionellen Gruppen wurde von *Fréchet et al.* im gleichen Jahr vorgestellt.^[45] Hierbei lag allerdings eine Funktionalität in der Peripherie und die zweite im Inneren des Dendrimers. Ein weiteres interessantes Beispiel für ein potentielles Dendrimer-Cytostatikum-Konjugat veröffentlichten die Autoren ebenfalls 1999, nämlich die Synthese von Poly(arylether)-Dendrimeren mit Folat oder Methotrexat (MTX) in der Peripherie.^[94] Zur Synthese der Konjugate wurden ausgehend von den Ester-terminierten Dendrimeren Hydrazidgruppen in der Peripherie eingeführt, die in einer direkten Reaktion unter Standard-Aktivesterkupplungsbedingungen mit Folsäure oder MTX umgesetzt werden konnten. Die Dendrimer-Folsäure-Konjugate waren in wässrigen Systemen oberhalb von pH 7.4 gut löslich. Bei saureren pH-Werten fielen sie jedoch aus der Lösung aus, vermutlich verursacht durch

die Protonierung der zweiten freien Folsäure-Carboxylgruppe an der Dendrimeroberfläche. *Reedijk et al.* berichteten ebenfalls im Jahre 1999 die Synthese eines Poly(propylenimin)-Dendrimers der ersten Generation mit vier peripheren *trans*-Diaminchloroplatin-Komplexen (Abb. 16b).^[108] Die Autoren vermuteten, daß dieses Dendrimer-Platin-Konjugat weniger leicht durch intracelluläre Thiolate inaktivierbar sei als Cisplatin, und daß es darüber hinaus zur stabilen Quervernetzung der DNA befähigt sei. Cytotoxizitätsuntersuchungen an zwei Mausekrebszelllinien zeigten die geringe Toxizität dieses tetranuclearen Platin-Dendrimer-Konjugates.

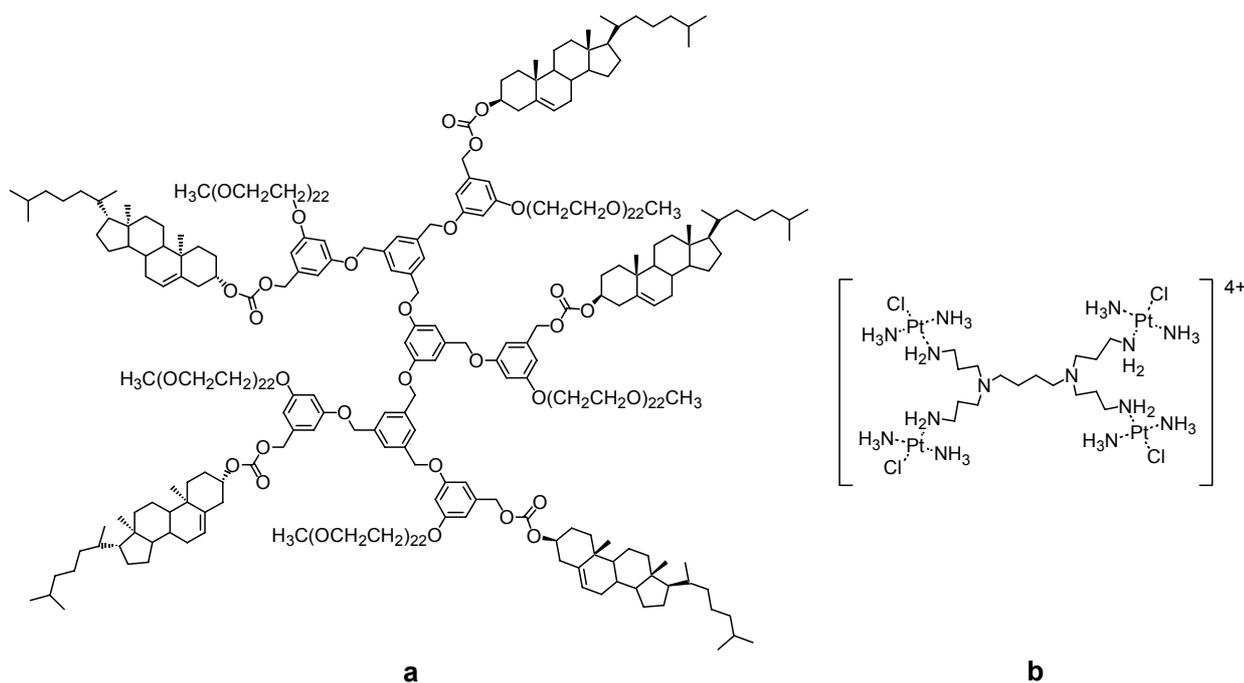


Abb. 16: Strukturen zweier Dendrimer-Wirkstoff-Konjugate aus dem Jahre 1999. (a) difunktionelles Dendrimer-PEG-Cholesteroll-Konjugat nach *Fréchet* und **(b)** tetranucleares Dendrimer-Platinat nach *Reedijk*.

1999 veröffentlichten schließlich auch *Duncan* und Mitarbeiter die Umsetzung eines Carboxylat-terminierten PAMAM-Dendrimers der Generation 3,5 mit Cisplatin zu einem wasserlöslichen Dendrimer-Platin-Konjugat mit einem Plattingehalt von 20-25 Gew.%.^[107] Die Autoren konnten im Rahmen ihrer Studie zeigen, daß dieses Dendrimer-Platinat *in vitro* langsam Pt²⁺ freisetzte und daß es darüber hinaus *in vivo* aktiver war als Cisplatin. Während das Dendrimer-Platin-Konjugat allgemein weniger toxische Wirkungen zeigte als Cisplatin, kam es doch zu einer selektiven Anreicherung dieser Verbindung in den Tumoren der untersuchten Mäuse (etwa 50fach stärker als bei Cisplatin).

Nach Beginn der vorliegenden Arbeit veröffentlichten *Janda* und Mitarbeiter die Synthese eines dendritischen Makromoleküls mit neun Chlorambucilresten.^[153] Über eine Maleimidgruppe am

fokalen Punkt war dieses Dendron geeignet mit Cysteinresten eines Antikörpers zu reagieren und somit neuartige Antikörper-Wirkstoff-Immunkonjugate mit einem „targeting“ auf Krebszellen zu bilden. Ebenfalls im Jahre 2002 berichteten *Baker et al.* die Funktionalisierung von PAMAM-Dendrimern der fünften Generation mit Fluorescein als Fluoreszenzlabel und mit Folsäure zum gerichteten „targeting“ der Dendrimere auf den in Krebszellen überexprimierten Folatrezeptor in der Plasmamembran.^[154] Darüber hinaus wurde von den Autoren auch das Cytostatikum Methotrexat als Wirkstoff an die Dendrimere gebunden. Mit allen Dendrimertypen wurden anschließend Experimente zur Bindung der Konjugate an die Membran von Krebszellen und deren rezeptorvermittelte Endocytose durchgeführt. Die Aufnahme der Konjugate in die Krebszellen und deren intrazelluläre Verteilung wird im Kapitel 3.5 noch näher erläutert. Eine große Auswahl von Arbeiten zum Thema Dendrimer-Cytostatika-Konjugate wurde noch im gleichen Jahr von *Fréchet* und Mitarbeitern präsentiert. Sie entwickelten einen neuen Satz von Polyester-Dendrimern mit potentiellm Einsatz als Wirkstoffträgermoleküle.^[155] Dieser Satz von Dendrimern basiert auf dem Monomer 2,2-Bis-(hydroxymethyl)propansäure und ist durch die große Anzahl an peripheren Hydroxylgruppen selbst in ungeladenem Zustand gut wasserlöslich. Für erste biologische Untersuchungen wurden drei Modellverbindungen getestet, von denen eine aufgrund ihrer hohen Verweildauer im Serum und allgemein guten Verträglichkeit als die geeignetste für weitere Modifikationen erschien.^[156] Diese Modellverbindung wurde dann als Grundgerüst für ein Dendrimer-Doxorubicin-Konjugat benutzt, in dem das Cytostatikum über eine säurelabile Hydrazonbindung an das Dendrimer angebracht wurde (Abb. 17). MALDI-TOF MS und UV-Absorptionsmessungen ergaben jedoch, daß die Reaktion des Doxorubicins mit den peripheren Hydrazidgruppen des Dendrimers nur unvollständig zu etwa 50 % verlief (sechs von insgesamt zwölf möglichen Positionen im Molekül waren belegt). Auch mit diesem Dendrimer-Doxorubicin-Konjugat wurden nachfolgend biologische Untersuchungen *in vitro* an verschiedenen Krebszelllinien und *in vivo* an Mäusen durchgeführt.^[156] Das Konjugat konnte *in vitro* unter physiologischen Bedingungen Doxorubicin freisetzen, wobei die Freisetzung im wesentlichen abhängig vom pH-Wert des umgebenden Mediums war. In lebenden Organismen zeigte das Konjugat eine im Vergleich zu freiem Doxorubicin nur eine sehr geringe Akkumulation in wichtigen Organen und darüber hinaus eine deutlich längere Verweildauer im Blut. In anschließenden Arbeiten von *Fréchet et al.* wurde diese Grundstruktur weiter optimiert und im wesentlichen zwei unterschiedliche Polyester-Dendren über konvergente oder divergente Synthesemethoden miteinander verbunden.^[157] Hierbei trug eines der beiden orthogonal geschützten Dendren multiple funktionelle Gruppen zur Anbindung von Cytostatika und das andere wurde in einem letzten Schritt mit löslichkeitsvermittelnden Poly(ethylenoxy)ketten versehen. Auf diese

Weise konnte eine kleine Bibliothek von verschiedenen Dendrimeren mit Molekulargewichten zwischen 20 und 160 kDa synthetisiert und mittels verschiedener Techniken eindeutig charakterisiert werden.

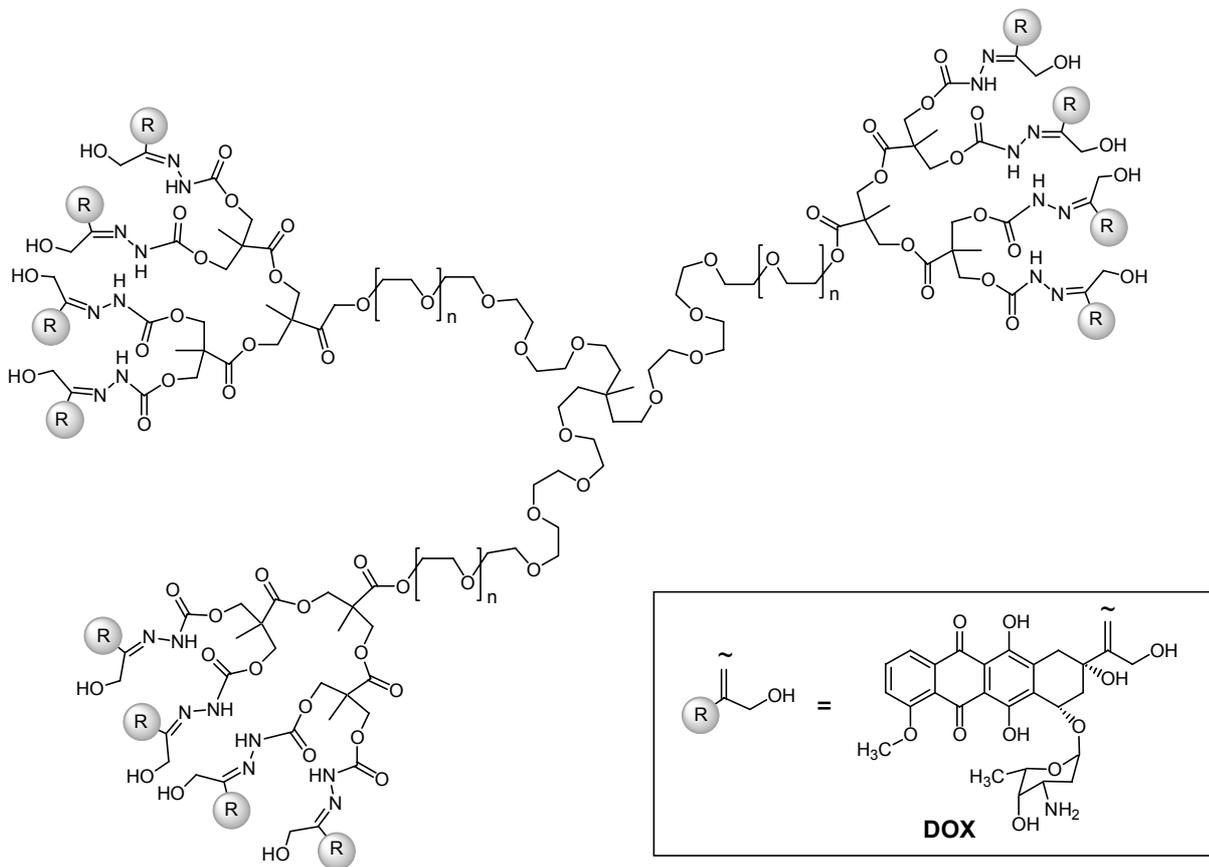


Abb. 17: Ein (Polyester-/Polyethylenoxy-)Dendrimer-Doxorubicin (DOX)-Konjugat aus der Arbeitsgruppe *Fréchet*. Das Molekulargewicht des dreiarmligen PEG-Dendrimergrundgerüsts beträgt ~ 22550 g/mol.

3.4 Cytotoxizität von Dendrimeren

Um Dendrimere als makromolekulare Träger für Wirkstoffe oder Medikamente einsetzen zu können ist es unabdingbar, daß die Dendrimerstruktur an sich biologisch verträglich und möglichst nicht toxisch ist. Obwohl dies die Grundvoraussetzung für jede Verwendung von Dendrimeren im biomedizinischen Bereich ist, gab es zu Beginn der vorliegenden Arbeit kaum systematische Studien zur Toxizität von Dendrimeren in Zellkultur oder in lebenden Organismen. Allenfalls waren einzelne Beispiele von Arbeitsgruppen bekannt, die Dendrimere als Transfektionsreagenzien einsetzten und punktuell die Toxizität der gebildeten Dendrimer-DNA-Komplexe ermittelten. ^{[69], [158]}

Erstmalig wurde 1996 von *Roberts et al.* das biologische Verhalten von PAMAM-Dendrimeren der dritten, fünften und siebten Generation *in vitro* und *in vivo* systematisch untersucht. ^[159] Sowohl in Zellkultur an V79 Fibroblastenzellen als auch *in vivo* an Swiss-Webster Mäusen wurden Eigenschaften wie Toxizität, Immunogenität und Verteilung der Dendrimere im Organismus untersucht. Dabei fanden die Autoren keinen Hinweis auf eine Immunreaktion, sehr wohl beobachteten sie aber eine konzentrations- und generationsabhängige Toxizität der verwendeten Dendrimere. Vor allem die PAMAM-Dendrimere der siebten Generation waren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eindeutig toxisch, während bei den Dendrimeren der fünften und der dritten Generation dieses nur schwächer bzw. gar nicht zu beobachten war. Die Toxizitätsunterschiede waren bei den beiden niederen Generationen nicht so deutlich ausgeprägt. Jedoch vermuteten die Autoren auch hier eine Zunahme der Toxizität mit steigender Generation der Dendrimere. In Mäusen zeigte das G3-Dendrimer die höchste Akkumulation in den Nieren, während das G5- und das G7-Dendrimer vorrangig in der Bauchspeicheldrüse angereichert wurden.

Im Jahre 2000 veröffentlichten *Duncan* und Mitarbeiter eine breiter angelegte, systematische Studie zur Biokompatibilität fünf verschiedener Typen von Dendrimeren. ^[160] Dabei handelte es sich zum einen um polykationische Dendrimere wie die klassischen PAMAMs und zwei Arten von PPI-Dendrimeren, entweder mit einem Diaminobutan (DAB)- oder einem Diaminoethan (DAE)-Core. Zum anderen untersuchten sie auch polyanionische, Carboxylat-terminierte PAMAMs und DABs („halbe Generationen“), sowie ungeladene, oligo(ethylenoxy)-terminierte Carbosilan (CSi-PEO)-Dendrimere. Zur Untersuchung der Biokompatibilität wurde die Toxizität der Dendrimere *in vitro* an verschiedenen Zelllinien (B16F19, CCRF und HepG2) und *in vivo* an Wistar-Ratten getestet. Frisch präparierte Ratten-Erythrozytenzellen dienten zur Durchführung eines Hämolysetests. Schließlich wurde anhand von ¹²⁵I-markierten PAMAM-

Dendrimere auch noch die Verteilung der Dendrimere im lebenden Organismus untersucht. Als Ergebnis dieser breit angelegten Studie stellte sich heraus, daß alle verwendeten kationischen Dendrimere cytotoxisch waren, wobei das Ausmaß der Toxizität sowohl vom Zelltyp, als auch vom verwendeten Dendrimertyp und der Generation des jeweiligen Dendrimers abhängig war. Außerdem veränderten die kationischen Dendrimere im Hämolysetest die Erythrozytenmorphologie und sie verursachten Hämolyse. Im Gegensatz dazu wirkten die anionischen Dendrimere mit freien Carboxylatgruppen und die Carbosilan-PEO-Dendrimere weder hämolytisch noch cytotoxisch. Die ^{125}I -markierten kationischen PAMAM-Dendrimere der dritten und vierten Generation wurden nach intravenöser Injektion in weniger als einer Stunde wieder aus dem Blut entfernt, während die entsprechenden anionischen PAMAMs der „halben Generationen“ deutlich längere Zirkulationszeiten zeigten. Im gleichen Jahr erhielten auch *Witvrouw et al.* ähnliche Ergebnisse für ihre negativ geladenen, sulfonierten oder carboxylierten PAMAM-Dendrimere, deren Cytotoxizität sie *in vitro* an MT-4 Zellen testeten.^[161] Alle Dendrimere waren bis zu den höchsten Konzentrationen von 250 µg/ml nicht toxisch. Die *in vitro* Cytotoxizität der Polyester-Dendrimere von *Fréchet et al.* (vgl. Kap. 3.3 und Abb. 17) wurde im Jahre 2002 an der Mausekrebszelllinie B16F10 und an der humanen Krebszelllinie MDA-MD-231 untersucht.^[156] Alle drei Modellverbindungen zeigten keine toxischen Effekte in Zellkultur, und nur in den höchsten getesteten Konzentrationen (40 mg/ml) konnte eine leichte Hemmung des Zellwachstums beobachtet werden. Erste *in vivo* Untersuchungen an CD-1-Mäusen zeigten eine allgemein gute Verträglichkeit der Dendrimere nach intravenöser Injektion. Nach Radioisotopenmarkierung der drei Modellverbindungen mit ^{125}I konnte ihre Verteilung im Organismus dargestellt werden. Während zwei der drei Modellverbindungen rasch über die Nieren wieder ausgeschieden wurden und keine Akkumulation in bestimmten Organen zu beobachten war, wurde die dritte signifikant in der Leber angereichert. Dabei blieb unklar, ob bei dem dritten Dendrimer die ^{125}I -Markierung an der Dendrimer-Oberfläche für den beobachteten Effekt verantwortlich war. In einer erst kürzlich erschienen Arbeit berichteten *D'Emanuele et al.* über den Einfluß von Oberflächenmodifikationen auf die Cytotoxizität von PAMAM-Dendrimern.^[162] Die Autoren modifizierten kationische PAMAM-Dendrimere der zweiten, dritten und vierten Generation entweder mit Lauroylketten oder mit PEG 2000 und untersuchten sowohl die so erhaltenen Konjugate als auch „normale“ kationische und anionische „Halbgenerations“-PAMAMs auf ihre Cytotoxizität in Cacao-2 Zellkultur. Genau wie *Duncan et al.*^[160] zuvor fanden die Autoren auch bei diesem Zelltyp, daß im Falle der nichtmodifizierten PAMAMs die kationischen Dendrimere deutlich toxischer waren als die anionischen, und daß bei beiden Typen die Toxizität mit zunehmender Größe (Generation) zunahm. Dagegen zeigten beide oberflächenmodifizierte Dendrimertypen eine stark

verminderte Cytotoxizität. So war der IC_{50} -Wert^{XIV} für die G3-Dendrimere mit sechs Fettsäureketten auf der Oberfläche um mehr als das Siebenfache größer als bei dem entsprechenden unmodifizierten kationischen Dendrimer. Ähnlich wie *Duncan et al.* machten auch hier die Autoren die kationische Oberflächenladung der Standard-PAMAM-Dendrimere für die beobachtete Cytotoxizität verantwortlich.

Alle vorliegenden Arbeiten deuten bisher darauf hin, daß kationische Strukturen als potentielle Wirkstoffträger im biomedizinischen Bereich problematischer sind als anionische oder ungeladene. Trotz dieser Erkenntnis fehlt es aber bis heute an einer eindeutigen Struktur/Toxizitäts-Beziehung bei Dendrimeren. Es ist gut möglich, daß jeder neue Dendrimertyp sein eigenes Toxizitätsprofil aufweist und darüber hinaus innerhalb jedes Dendrimertyps auch jede Generation biologisch anders interagiert. Deshalb war es im Rahmen der vorliegenden Arbeit von besonderem Interesse, den Einfluß unterschiedlicher Dendrimerstrukturen und vor allem unterschiedlicher Oberflächenmodifikationen in Hinblick auf die Cytotoxizität der Dendrimere und ihr Verhalten in Zellkultur näher zu untersuchen. Auch in Hinblick auf eine spätere Verwendung als Trägermoleküle für Cytostatika sind neben der Erzeugung dendritischer Strukturen solche grundlegenden Untersuchungen von fundamentaler Bedeutung und sollten zunächst im Vordergrund stehen.

^{XIV} Die Konzentration der Substanz, bei der eine 50 %ige Hemmung der mitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität gemessen wird (IC = inhibitory concentration).

3.5 Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von Dendrimeren in eukaryotischen Zellen

Um Dendrimere als Cytostatikaträger einsetzen zu können ist es neben ihrer Stabilität und Wasserlöslichkeit eine unabdingbare Voraussetzung, daß sie überhaupt von Zellen aufgenommen werden. Weiterhin ermöglicht das Wissen über den Weg ihrer Aufnahme und ihre anschließende intrazelluläre Verteilung eine optimale Anpassung ihrer strukturellen Merkmale und im besten Fall auch das gezielte Design eines spezifisch spaltbaren Spacers zur Wirkstofffreisetzung, z. B. in den Lysosomen.

Bis zum Jahre 1999 hatte sich lediglich die Forschergruppe *Juliano et al.* mit dieser Fragestellung auseinandergesetzt, und zwar im Rahmen der Charakterisierung von PAMAM-Dendrimer-Oligonucleotid-Komplexen zu Transfektionszwecken.^[70] Die Forscher verfolgten die intrazelluläre Verteilung fluoreszenzmarkierter Dendrimer-Oligonucleotid-Komplexe in humanen Gehirntumorzellen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie. Die dabei beobachteten Verteilungsmuster waren sehr variabel und zeigten sowohl Zellen mit hauptsächlich cytoplasmatischer Fluoreszenz als auch solche mit Fluoreszenz im Zellkern und im Cytoplasma.

Eine Vielzahl von Studien zu diesem Thema erschien erst während der Durchführung der vorliegenden Arbeit. So berichteten wiederum *Juliano et al.* 2000 über die Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von Komplexen aus fluoreszenzmarkierten Oligonucleotiden und fluoreszenzmarkierten PAMAM-Dendrimeren in humane HeLa Zellen.^[163] Die Autoren markierten die Dendrimere mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff „Oregon green 488“ und benutzen ein rotes Fluoreszenzlabel („TAMRA“) für die Oligonucleotide. So konnten sie mittels Zweifarben-Fluoreszenzmikroskopie zeigen, daß die Dendrimer-Oligonucleotid-Komplexe über den Prozeß der Aufnahme in vesikuläre Kompartimente der Zellen bis zum Transfer in den Zellkern intakt und assoziiert blieben. Nach einer Stunde Inkubationszeit zeigte die Mehrzahl der Zellen intensive Dendrimer- und Oligonucleotid-Fluoreszenz im Zellkern. Eine Kontrollgruppe, die nur mit „Oregon green 488“-markierten Dendrimeren inkubiert worden war, zeigte ebenfalls eine deutliche nucleare Fluoreszenz. Allerdings blieb in dieser Studie unklar, ob die Lokalisierung der Dendrimer-Oligonucleotid-Komplexe im Zellkern nur ein Zwischenstadium der intrazellulären Verteilung ist, oder ob dies dem Endpunkt des Transportprozesses in der Zelle entspricht. Anhand der durchgeführten Zellkernfraktionierungen folgerten die Autoren, daß eine substantielle Dendrimermenge auch an anderen Orten in der Zelle lokalisiert war. Nach Meinung der Autoren gehörten dazu die Plasmamembran und andere intrazelluläre Membranen. Im Jahre 2002 berich-

teten *Balogh et al.* die Aufnahme von mit $\{Au^0\}$ -PAMAM} Gold-Dendrimer-Nanocompositen komplexierter DNA in Affen-Fibroblastenzellen.^[164] Mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) konnte gezeigt werden, daß sich zunächst große DNA-PAMAM-Cluster bilden, die nach Bindung an die Plasmamembran der Zelle von dieser mittels Endocytose aufgenommen wurden. Zu einem späteren Zeitpunkt konnten die Nanopartikel schließlich an der inneren Membran von Lysosomen identifiziert werden, was dem vermuteten intrazellulären Verteilungsweg entspricht. Ebenfalls 2002 zeigten *Fréchet et al.* die Aufnahme ihrer Dendrimer-Doxorubicin-Konjugate in Mäuse-Melanomzellen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie.^[156] Nach einer Stunde und nach 24 Stunden Inkubationszeit zeigten die Zellen deutliche Fluoreszenz im Cytoplasma, allerdings nur geringe Fluoreszenz im Zellkern. Im gleichen Jahr konnte von *Giralt* und Mitarbeitern die endocytotische Aufnahme von Peptidodendrimeren aus Polyprolin-Helices in Ratten-Nierenzellen gezeigt werden.^[165] Die mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markierten Dendrimere wurden innerhalb einer Stunde von den Zellen aufgenommen und zeigten eine deutlich vesikuläre, punktuelle Verteilung im Cytoplasma der Zellen. Schließlich gelang *Baker et al.* 2002 noch der Nachweis der rezeptorvermittelten Endocytose von Folsäure-Dendrimer-Konjugaten in humane KB Zellen.^[154] Nach 24 Stunden konnten die Autoren mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie eine „klumpige“ cytoplasmatische Färbung der Zellen nachweisen, wobei allerdings die genaue intrazelluläre Lokalisation der FITC-markierten Dendrimere unklar blieb.

Alle vorliegenden Studien zur Aufnahme von Dendrimeren in eukaryotische Zellen und zu deren intrazellulärer Verteilung machen deutlich, daß die Bedingungen für die Aufnahme von Dendrimeren in Zellen noch immer unklar sind. Vor allem aber fehlen grundlegende Untersuchungen zur Struktur/Wirkungs-Beziehung bei dem Weg der Aufnahme der Dendrimeren in die Zellen und deren nachfolgender intrazellulärer Verteilung. Solche Untersuchungen sollten es schließlich erlauben bessere Voraussagen darüber zu machen, wann, wo und warum Dendrimere bestimmte Effekte in Zellen verursachen. Deshalb war es unter anderem auch ein Anliegen dieser Arbeit, mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie die Aufnahme und die Verteilung von Dendrimeren in eukaryotischen Zellen näher zu untersuchen.

