

2 AUFGABENSTELLUNG

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines längerfristigen, von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten Projektes^{VII}, das sich mit der Entwicklung von Dendrimer-Wirkstoff-Konjugaten als neue Tumorthapeutika beschäftigt.^[96] Das Projekt ist stark interdisziplinär ausgerichtet und erfordert die enge Zusammenarbeit von chemisch, pharmazeutisch und biomedizinisch ausgerichteten Arbeitsgruppen.^{VIII}

In der kooperierenden Arbeitsgruppe von R. Gust^{VIIIa} wurden in den letzten Jahren neue Platinkomplexe für den Einsatz als Cytostatika entwickelt. Diese tragen 1,2-Diphenylethylen-diamin-Liganden, die abhängig vom Substitutionsmuster an den aromatischen Ringen den Komplexen eine spezifische Wirkung an Tumoren vermitteln (Abb. 9).^[97]

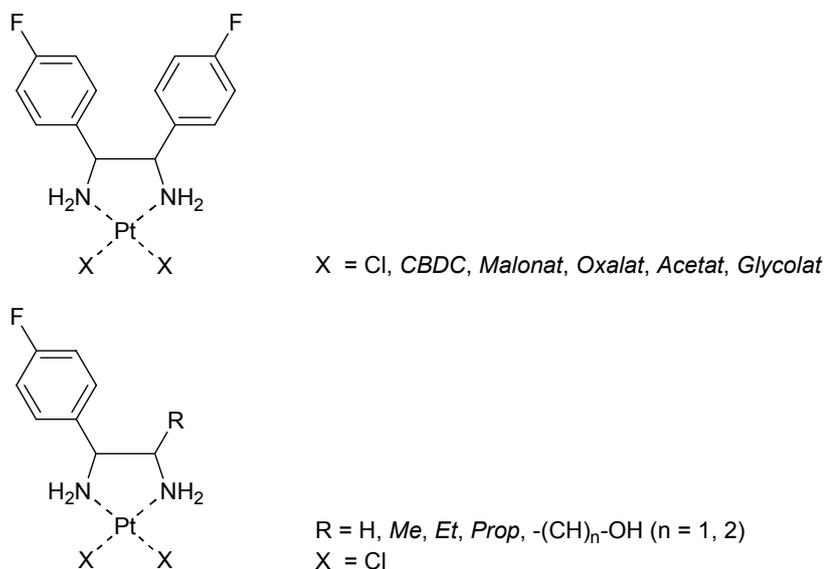


Abb. 9: Typische Vertreter der in der Arbeitsgruppe *Gust* synthetisierten Platinkomplexe mit hoher Tumorzellselektivität.

Eines der größten Probleme der klassischen Platinkomplexe wie Cisplatin und Carboplatin ist neben der fehlenden Selektivität für Tumorzellen vor allem ihre geringe Wasserlöslichkeit. Um den therapeutischen Index der Pt^{2+} -Verbindungen zu erhöhen, wurde in den letzten Jahren

^{VII} Sonderforschungsbereich 448, „Mesoskopisch strukturierte Verbundsysteme“, Teilprojekt A1.

^{VIII} (a) Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Gust am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin.

(b) Dr. Henning Otto in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Hucho am Institut für Chemie/Biochemie der Freien Universität Berlin.

(c) Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Schönefeld am Fachbereich Humanmedizin/Institut für Pharmakologie der Freien Universität Berlin; *aktuell*: Institut für Biochemie der Universität Leipzig.

vermehrt nach neuen Formulierungen gesucht. Dazu gehörten neben der Verkapselung in Liposomen^[98] u. a. auch die Anbindung an makromolekulare Trägermoleküle wie Proteine oder Antikörper.^[99] Die Nachteile der Wirkstoffanbindung an Proteine liegen zum einen in der Stimulierung einer Immunantwort durch diese körperfremden Proteine, und zum anderen in ihrer Anfälligkeit für proteolytische Degradierung. Synthetische Polymere hingegen sind im Körper gegenüber Proteasen stabil und nichtimmunogen. Darüber hinaus haben sie den Vorteil, daß sie für den Wirkstofftransport maßgeschneidert werden können, und ihre hohen Molekulargewichte verhindern eine schnelle Ausscheidung über die Nieren. Bis heute wurde eine Vielzahl von Cytostatika an verschiedene polymere Trägermaterialien gebunden und biologisch evaluiert. Dazu gehören neben Konjugaten mit Chlorambucil^[100], 5-Fluorouracil^[101], Doxorubicin^[102] und Paclitaxel^[103] auch solche mit Platinkomplexen^[104]. Einer der größten Nachteile bei der Verwendung von Polymer-Wirkstoff-Konjugaten ist die Polydispersität der verwendeten Polymere. Deshalb geht das Interesse in jüngster Zeit zunehmend in Richtung der Verwendung von Dendrimeren als monodisperse synthetische makromolekulare Wirkstoffträger.

Zu Beginn dieser Arbeit gab es nur wenige Beispiele für die gelungene Synthese von Dendrimer-Cytostatika-Konjugaten, und es fehlten Daten zu deren biologischer und medizinischer Evaluierung. Neben den Arbeiten von *Fréchet* und Mitarbeitern zu Methotrexat tragenden Dendrimeren^[94] und den 5-Fluorouracil tragenden dendritischen Polymeren von *Zhuo et al.*^[105] lagen noch erste Berichte von *Duncan et al.* und *Reedijk et al.* zu Pt²⁺-komplexierenden PAMAM-^[106] bzw. kleinen Poly(propylenimin)-Dendrimeren^[107] vor. Biologische Untersuchungen gab es zu diesem Zeitpunkt allein zu einigen wenigen PAMAM-Dendrimerarten durch die Arbeiten von *Roberts et al.*^[108] und *Duncan et al.*^[106] sowie zu dem tetranuclearen Dendrimer-Platinat von *Reedijk et al.*^[107]

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb zunächst, einen Satz von Dendrimeren synthetisch verfügbar zu machen, der sich potentiell als Trägermaterial für Cytostatika eignet. Die entsprechenden Dendrimerstrukturen sollten synthetisch leicht zugänglich und chemisch variabel funktionalisierbar sein. Darüber hinaus sollten sie über eine hohe Wasserlöslichkeit verfügen, um sie biologisch optimal verfügbar zu machen. Ein wichtiges Kriterium für den Einsatz als Trägersubstanz in biomedizinischen Anwendungen ist neben einer guten Wasserlöslichkeit, hohen Stabilität und Monodispersität der verwendeten Polymere vor allem, daß sie selbst nicht cytotoxisch sind und gut toleriert werden. Deshalb sollte zunächst eine breite Vielfalt von unterschiedlich funktionalisierten, wasserlöslichen Dendrimeren verschiedener Größe (Generationen) synthetisiert und in Hinblick auf ihre cytostatische oder cytotoxische Wirkung auf humane Zellkulturen untersucht werden. Dadurch sollte es möglich werden, die am besten geeignete Vertre-

tergruppe für die Anwendung als Wirkstoffträger auszuwählen und diese dann weiter zu optimieren. Als Grundbausteine sollten aromatische Polyamidoamin-Dendren verwendet werden, da diese schon in der Arbeitsgruppe bekannt waren und die Verwendung deshalb Erfolg versprechend schien.^[109] Weiterhin bot die verwendete Peptidchemie maximale Möglichkeiten zur Funktionalisierung der Dendrimersysteme. Zunächst sollte ein geeignetes Kernmolekül synthetisiert und damit Amin-terminierte Dendrimere unterschiedlicher Generationen aufgebaut werden. Dieser Basis-Satz an Dendrimeren sollte dann durch die Verwendung von Dendren, die natürliche, proteinogene Aminosäuren tragen, mit verschiedenen Oberflächenmustern und verschiedenen Ladungen versehen werden. Dazu sollten neben rein kationischen Vertretern auch zwitterionische und solche mit großen hydrophoben Gruppen gehören. Die Auswirkung der „Oberflächenladung“ und sonstiger Substitutionsmuster auf die Cytotoxizität der Dendrimere in Zellkultur sollte daraufhin eingehend untersucht werden.

Als potentielles Cytostatikum zur Anbringung an die Dendrimere war zunächst an Pt^{2+} -Komplexe gedacht, da damit in der kooperierenden Arbeitsgruppe von *R. Gust*^{VIIIa} die meisten Erfahrungen vorhanden waren. Deshalb sollten einige Dendrimere mit spezifischen Liganden versehen werden, die eine Komplexierung von Pt^{2+} erlauben. Hierfür schienen verschiedene Bindungsarten geeignet zu sein. Eine Möglichkeit, die schon vielfach in der Literatur beschrieben wurde,^{IX} war die Komplexierung mit einem terminalen Methionin-Rest.^[110] Eine andere vielversprechende Möglichkeit war die Verwendung eines Ethylendiamin-artigen Liganden, um Pt^{2+} ähnlich wie beim Cisplatin an das Dendrimer zu binden.

Wünschenswert war es weiterhin, daß die dendrimergebundenen Platinkomplexe nur selektiv in den Tumorzellen oder in deren Nähe freigesetzt werden. Dazu sollte am Dendrimer eine „Sollbruchstelle“ (spaltbarer „Spacer“) angebracht werden, die den Platinkomplex nur in den Krebszellen freisetzen kann. Als Sollbruchstelle schien in diesem Projekt ein proteolytisch spaltbarer „Spacer“ geeignet zu sein, der von einer in Tumorzellen überexprimierten Protease aufgebrochen werden kann. Dadurch könnte dann eine spezifische Tumorzellselektivität erreicht werden. Eine solche Protease ist beispielsweise Cathepsin B, eine von Krebszellen vermehrt gebildete lysosomale Cysteinprotease.^[111] Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Peptid mit einer Cathepsin B-Schnittstelle und mit einer zusätzlichen Pt^{2+} -Bindungsstelle synthetisiert und an das Dendrimer angebracht werden (Abb. 10).

^{IX} Man geht heute davon aus, daß nach der Aufnahme von Platinkomplexen in die Zelle neben der Bindung an die Basen der DNA auch eine Interaktion mit Proteinen stattfindet. Dabei reagieren bevorzugt die Schwefelatome tragenden Aminosäuren Cystein und Methionin unter Komplexbildung mit den teilweise hydrolysierten Platin-komplexen.

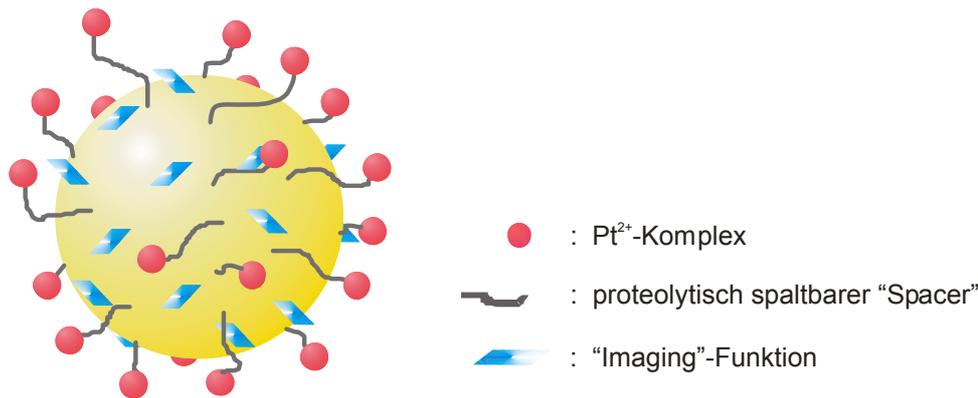


Abb. 10: Schematische Darstellung eines sphärischen, wasserlöslichen Dendrimers mit cyto-statisch wirksamen Pt²⁺-Komplexen an einem proteolytisch spaltbaren Peptid-„Spacer“ und einer zusätzlichen „Imaging“-Funktion zur Visualisierung.

Bis zum Beginn dieser Arbeit lagen nur wenige Studien zur Aufnahme von Dendrimern in eukaryotische Zellen vor. Untersucht wurden vor allem PAMAM-Dendrimernukleinsäure-Komplexe, die zur Transfektion von Zellen eingesetzt werden sollten.^{[69],[70]} Es war weitgehend unklar, ob und wie Dendrimere von tierischen Zellen aufgenommen werden, und wo sie nach der Aufnahme in der Zelle lokalisiert sind. Deshalb war es für die vorliegende Arbeit von herausragendem Interesse zu untersuchen, ob die synthetisierten Dendrimere von eukaryotischen Zellen internalisiert werden und wie ihre intrazelluläre Verteilung nach Aufnahme in die Zellen ist. Um den intrazellulären Verteilungsweg von Dendrimern in eukaryotischen Zellen verfolgen zu können, benötigt man eine sogenannte „imaging“-Funktion (Abb. 10). Dabei handelt es sich in den meisten Fällen um einen Fluoreszenzmarker, anhand dessen man mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops die markierten Moleküle in der Zelle identifizieren kann. Deshalb sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Dendrimere mit einem Fluoreszenzlabel synthetisiert werden. In Kooperation mit biochemisch und medizinisch tätigen Arbeitsgruppen sollten dann die Aufnahme und die intrazelluläre Verteilung der fluoreszenzmarkierten Dendrimere in humanen Zelllinien mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden.