

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Die Synthesestrategie

Die Synthesestrategie für die neuen dendritischen Träger sollte auf effiziente Weise möglichst große Dendrimermengen verfügbar machen. Dazu mußten Synthesen ausgewählt werden, die mit guten bis sehr guten Ausbeuten ablaufen und deren Produkte einfach aufzureinigen sind.

4.1.1 Konzept

Für den Aufbau der Dendrimere des Basis-Satzes sollten zunächst AB₂-Monomere verwendet werden, die bereits in der Arbeitsgruppe bekannt waren.^{[110], [166]} Diese Dendren enthalten an einer aromatischen Verzweigungseinheit jeweils zwei Aminogruppen und eine Carboxylgruppe zur Verknüpfung am fokalen Punkt (Abb. 18).

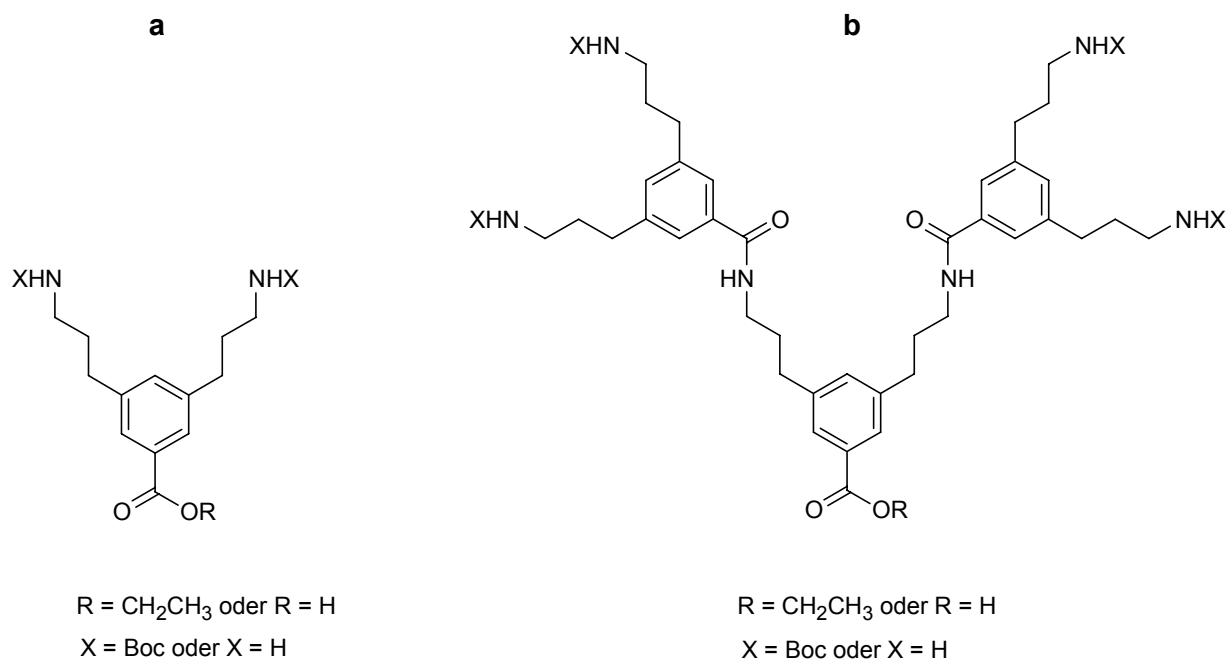


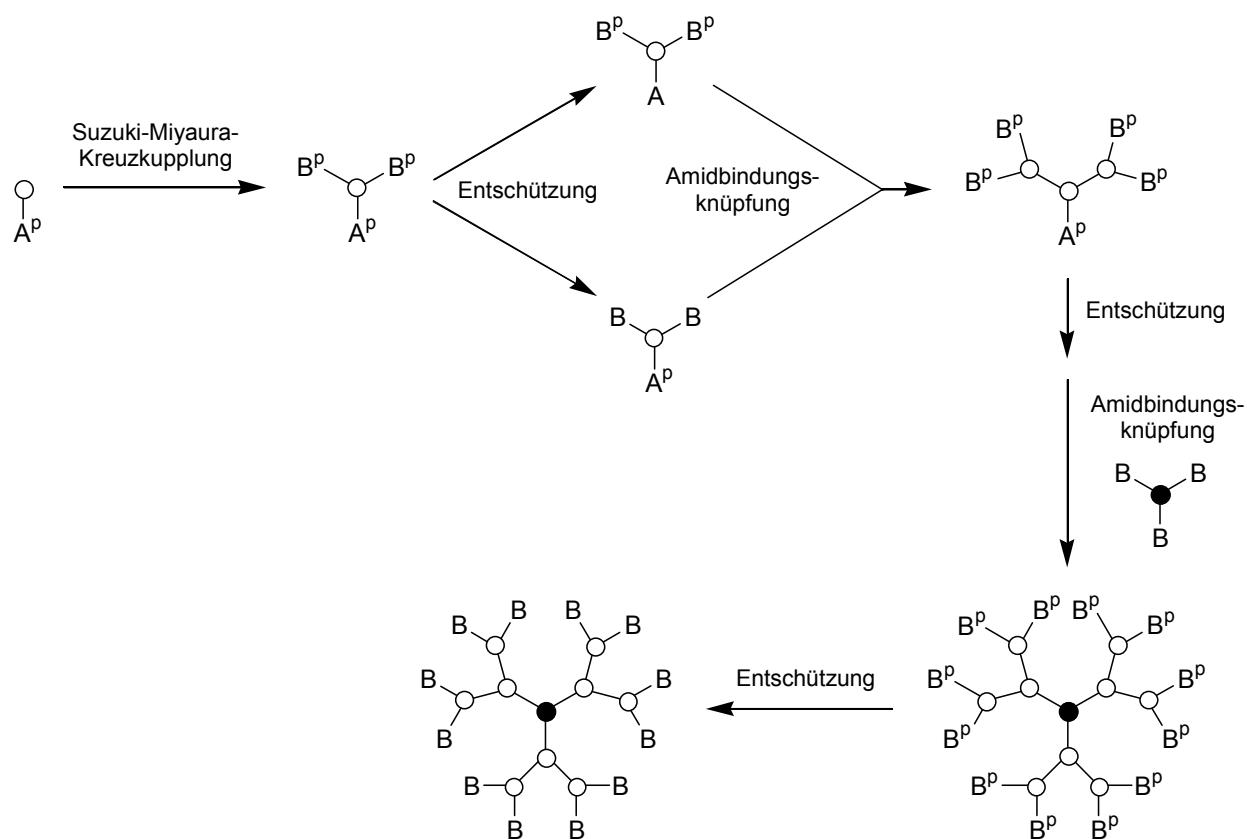
Abb. 18: Struktur der im Basis-Dendrimersatz verwendeten Dendren: (a) G1-Dendron und (b) das entsprechende G2-Dendron.

Zum Aufbau der bekannten Dendren des Basis-Satzes wurde die Palladium-katalysierte Suzuki-Miyaura Kreuzkupplung gewählt.^[167] Es handelt sich hierbei um eine vielseitig einsetzbare Methode zur Knüpfung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen, die sich insbesondere

dadurch auszeichnet, daß sie eine Vielzahl von funktionellen Gruppen toleriert. So lassen sich neben Alkoholen, Ethern und Aldehyden auch problemlos Ester, Carbonsäuren sowie geschützte Amine als Edukte in einer Suzuki-Reaktion einsetzen. Durch die milden Reaktionsbedingungen und die zumeist sehr guten Ausbeuten war die Suzuki-Miyaura Kreuzkupplung nachfolgend die Methode der Wahl zur Synthese der Monomere, aus denen sowohl die Dendren als auch das Kernmolekül aller hier vorgestellten Dendrimere aufgebaut wurden.

Für die Verknüpfung der mittels Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung dargestellten AB₂-Monomere zu größeren Dendren oder auch die Anbindung der Dendren an das Kernmolekül wurde eine weitere gut entwickelte synthetische Route eingeschlagen, nämlich die aus der Peptidchemie bekannte Kondensation einer Carbonsäure mit einem Amin. Die daraus resultierende Amidbindung ist chemisch und thermisch äußerst stabil. In den letzten Jahren wurden eine Reihe von Dendren und Dendrimere in verschiedenen Arbeitsgruppen durch die wiederholte Abfolge von Amidbindungen aufgebaut.^{[86a], [168]} Es sind aber vor allem die Arbeiten von *Liskamp*^[169] und *Voit*^[170], die den Einsatz klassischer Methoden der Peptidchemie für die Kondensation von Monomeren mit Carboxyl- und Aminofunktionen zum Aufbau von Dendrimeren beschreiben. In den letzten Jahrzehnten wurden die Methoden zur Amidbindungs-knüpfung intensiv weiterentwickelt und verbessert, so daß sie im allgemeinen unter milden Bedingungen durchgeführt werden können und mit guten bis sehr guten Ausbeuten ablaufen.^[171] Dies machte die Amidbindungs-knüpfung zu einer geeigneten Methode zum Aufbau von Dendren und Dendrimeren im Rahmen dieser Arbeit. Die so synthetisierten AB₂-Monomere verfügen über eine Carboxylfunktion am fokalen Punkt sowie zwei periphere Aminogruppen (vgl. Abb. 18), und die daraus resultierenden Dendrimere des Basis-Satzes über freie Aminogruppen in der Peripherie. Die freien Aminogruppen sowohl der Dendren als auch der Dendrimere eignen sich im weiteren ideal zur Funktionalisierung, wodurch unterschiedlich oberflächenmodifizierte Dendrimertypen erzeugt werden können.

Die meisten Dendrimere dieses Kapitels wurden mittels Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung und der aus der Peptidchemie bekannte Amidbindungs-knüpfung mittels aktivierter Carbonsäuren divergent aufgebaut. Die Abfolge dieser beiden Reaktionen mit den zwischenzeitlich nötigen Entschützungs-schritten im Rahmen der Amidbindungs-knüpfung und der finalen Entschützung nach Anbindung an das Kernmolekül ist in Schema 3 dargestellt.

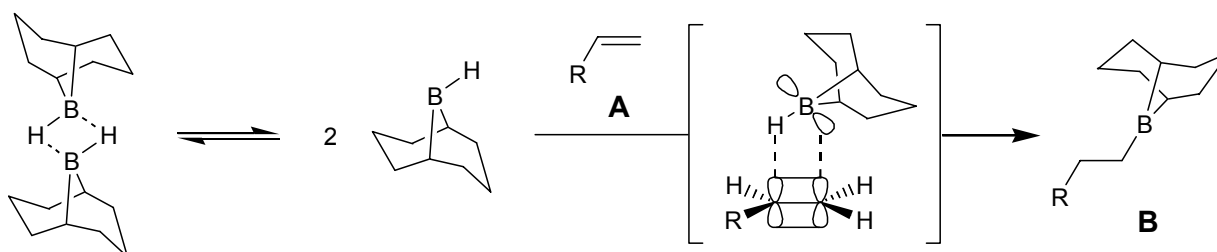


Schema 3: Schematische Darstellung der divergenten Synthesestrategie zum Aufbau eines G2-Dendrimers des Basis-Satzes. Zum Aufbau der Monomere dient die Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung, während zum Aufbau der größeren Dendren und der Dendrimere eine repetitive Abfolge von Amidbindungs-knüpfungs- und Entschützungsreaktionen eingesetzt wird. A = Carboxylgruppe; B = Aminogruppe; p = geschützt (protected).

4.1.2 Reaktionen

4.1.2.1 Die Suzuki-Miyaura Kreuzkupplung

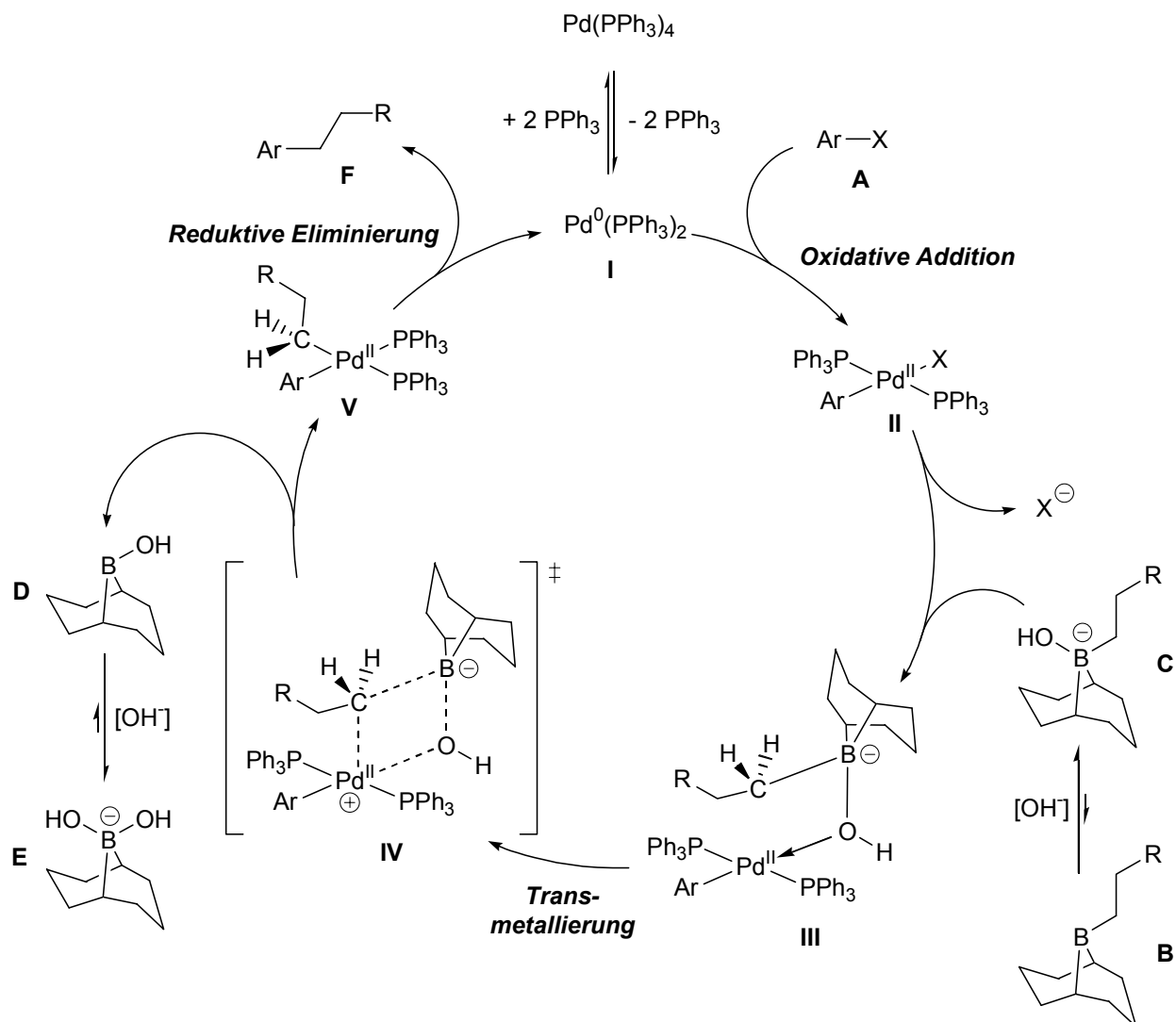
Der Mechanismus der Suzuki-Miyaura Kreuzkupplung wurde von *Sonderquist et al.* im Detail untersucht^[172] und unterscheidet sich in einigen Punkten von dem vorgeschlagenen Katalysezyklus der Suzuki-Reaktion mit aromatischen Boronsäuren.^[167b] Vor dem eigentlichen Eintritt in den katalytischen Zyklus wird zunächst ein terminales Olefin *in situ* mit einem voluminösen Dialkylboran, meist 9-Borabicyclo[3.3.1]nonan (9-BBN), hydroboriert (Schema 4).^[167a]



Schema 4: Hydroborierung eines terminalen Alkens mit 9-BBN.

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Dissoziation des überwiegend als Dimeres vorliegenden 9-BBN, das anschließend mit dem Alken **A** zum sterisch weniger gehinderten *anti*-Markownikow-Addukt **B** weiterreagiert. Diese Reaktion läuft zumeist mit Gesamtausbeuten von > 99 % ab.^[173] Das so erzeugte Trialkylboran tritt dann in den katalytischen Zyklus ein und vollführt mit einem Halogenaromaten (typischerweise ein Brom- oder Iod-Aromat) eine C(sp³)-C(sp²)-Bindungsknüpfung.

Die katalytisch aktive Palladium(0)-Verbindung **I** wird *in situ* aus dem Komplex Pd(PPh₃)₄ erzeugt (Schema 5). Dieser spaltet in Lösung zunächst zwei Phosphanliganden ab, wobei die koordinativ ungesättigte Pd⁰-Spezies **I** entsteht. Mit dem Kohlenstoff-Elektrophil **A** reagiert die katalytisch aktive Spezies **I** dann unter oxidativer Addition zum Pd^{II}-Komplex **II**. Dieser für die Gesamtgeschwindigkeit der Reaktion entscheidende Schritt läuft häufig schon bei Raumtemperatur ab, so daß für die Suzuki-Miyaura Kupplung meist moderate Temperaturen gewählt werden können. Das zuvor ebenfalls *in situ* erzeugte Trialkylboran **B** (vgl. Schema 4) liegt in Gegenwart einer starken Base fast ausschließlich als Hydroxoborat **C** vor, das sofort mit **II** weiter zum μ_2 -verbrückten Hydroxo-Intermediat **III** reagiert. Die Alkylboran \rightarrow Pd- Transmetallierung verläuft anschließend über den viergliedrigen Übergangszustand **IV** unter



Schema 5: Vereinfachte schematische Darstellung des Katalysezyklus der Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung nach *Sonderquist et al.* (Ar = Aryl; Ph = Phenyl; R = Alkyl, X = Br, I).

Retention der Konfiguration an der $\alpha\text{-CH}_2$ -Gruppe des Alkylsubstituenten zum *cis*- Pd^{II} -Komplex V.^[174] Bei der Transmetallierung entsteht als weiteres Reaktionsprodukt die Borinsäure D, die mit einem Äquivalent Hydroxidionen zur Hauptkomponente E weiterreagiert. Insgesamt werden im Katalysezyklus somit mindestens zwei Äquivalente Base benötigt. Alternativ ist auch ein anderer Reaktionsverlauf möglich, bei dem der Aryl-Halogen-Pd-Komplex II das Halogenid gegen ein Hydroxidion austauscht (nicht abgebildet). Das so gebildete Arylpalladiumhydroxid reagiert dann mit dem nucleophilen Kohlenstoff des Alkylborans B unter Ausbildung des zuvor beschriebenen viergliedrigen Übergangszustands IV. Dieser Reaktionsweg ist jedoch nur von untergeordneter Bedeutung, da die Reaktion deutlich langsamer verläuft als die von II

mit **C**. Der Komplex **V** reagiert schließlich unter reduktiver Eliminierung rasch weiter zum Kupplungsprodukt **F**, wobei die katalytisch aktive Spezies **I** regeneriert wird.

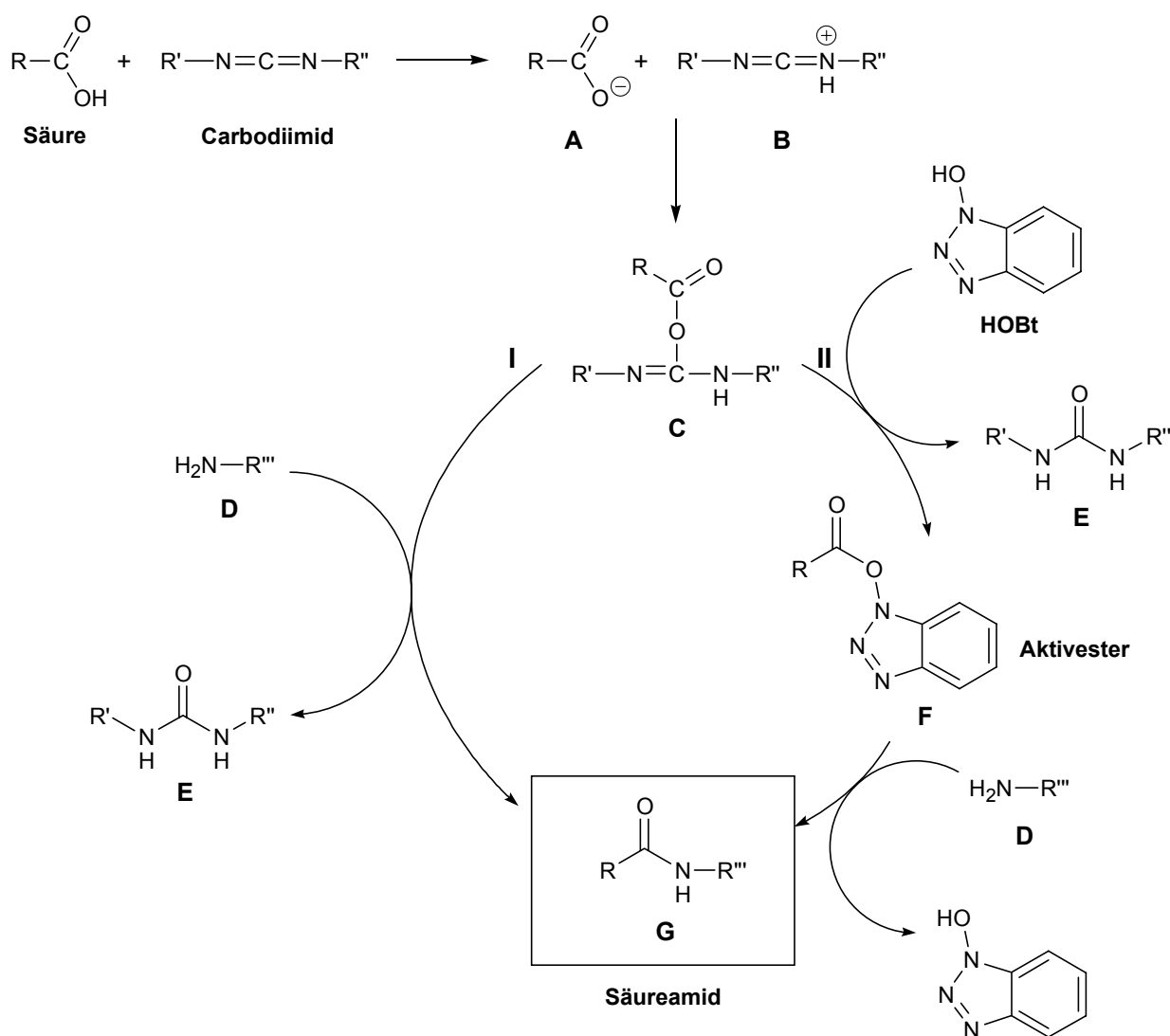
4.1.2.2 Die Amidbindungsknüpfung

Die Methoden zur Knüpfung von Amidbindungen sind in den letzten Jahrzehnten vor allem in der Flüssig- und Festphasen-Peptidsynthese zum Einsatz gekommen und dabei kontinuierlich weiterentwickelt und verbessert worden.^[171] Heute liefern diese Reaktionen im allgemeinen Produkte in guten bis sehr gute Ausbeuten in Kombination mit äußerst milden Reaktionsbedingungen und einer gut handhabbaren Aufreinigungsprozedur.

Allgemein müssen zur Ausbildung einer Amidbindung zwei Grundvoraussetzungen erfüllt sein: zum einen muß die Carboxylfunktion der einen Komponente aktiviert werden, und zum anderen muß die zweite Funktionalität, hier die freien Aminogruppen, während der Reaktion geschützt vorliegen. Der repetitive Ablauf der Reaktion erfordert abwechselnde Entschützungs- und Aktivierungsschritte sowohl der Carboxyl- als auch der Aminofunktion der Monomere. Die verwendeten Schutzgruppen müssen deshalb so gewählt werden, daß sie unter den Bedingungen der gewählten Synthesen, hier Suzuki-Miyaura-Kupplung und Amidbindungsknüpfung, stabil sind, nachfolgend aber leicht und effizient wieder entfernt werden können. Zur Schützung der Carboxylfunktion der Monomere wurden im Rahmen dieser Arbeit zumeist die entsprechenden Ethylester verwendet. Als Schutzgruppe für die freien Aminogruppen fand, wann immer möglich und praktikabel, die *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-Gruppe^[175] Verwendung. Diese ist unter den verwendeten Reaktionsbedingungen stabil und läßt sich im allgemeinen quantitativ mit 20-50 % Trifluoressigsäure (TFA) in Dichlormethan wieder entfernen, wobei nur die gasförmigen Spaltprodukte Kohlendioxid und Isobuten entstehen.

Die Aktivierung der Carboxylfunktion erfolgt mittels so genannter „Kupplungsreagenzien“, die als reaktive Intermediate entweder gemischte Anhydride oder Aktivester bilden.^[176] Die bekanntesten *in situ* verwendbaren Kupplungsreagenzien sind die Carbodiimide (Schema 6).^[177] Man nimmt an, daß zunächst die ungeschützte Carboxylgruppe der Säure **A** mit dem Carbodiimid **B** ein instabiles *O*-Acylisoharnstoffderivat **C** bildet, das nachfolgend mit der Aminokomponente **D** des zweiten Monomers zu dem gewünschten Säureamid **G** reagieren kann. Dabei wird das Harnstoffderivat **E** gebildet. (Schema 6). Das bis heute am häufigsten verwendete Carbodiimid ist *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)^[178], allerdings entsteht bei der Umsetzung das problematische Nebenprodukt *N,N'*-Dicyclohexyl-harnstoff. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für den Aufbau der Dendren zumeist *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDC) gewählt, da hier das bei der Kupplung entstehende Harnstoffderivat wasserlöslich

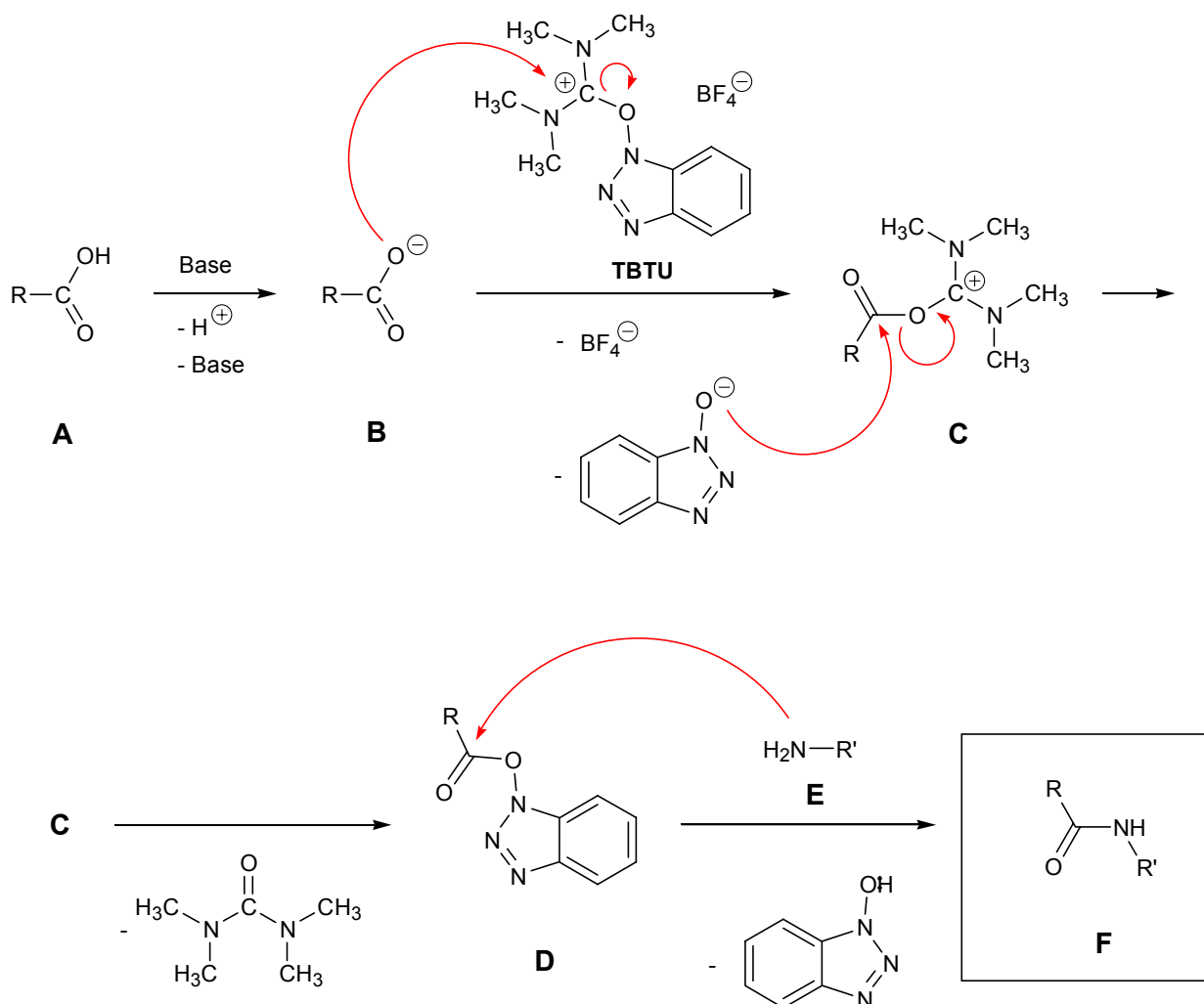
ist und somit leicht über wässrige Aufarbeitung abgetrennt werden kann.^[179] Wird die Carbo-diimid-Aktivierung darüber hinaus noch in Gegenwart von Hydroxylaminderivaten wie 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)^[180] oder 7-Aza-1-hydroxybenzotriazol (HOAt)^[181] durchgeführt, so wird ein Aktivester **F** erhalten, der anschließend mit der Aminokomponente weiter zum gewünschten Säureamid reagiert (vgl. Schema 6). Die Zugabe einer nicht-nucleophilen Base wie N-Ethyl-diisopropylamin (DIPEA) ist essentiell, um die Säure zu deprotonieren und gleichzeitig eine Protonierung der Aminkomponente zu verhindern.



Schema 6: Schematische Darstellung des Mechanismus der Amidbindungs-knüpfung mittels Carbodiimid-Aktivierung: (I) direkte Reaktion des intermediär gebildeten *O*-Acylisoharnstoffderivates mit der Aminokomponente, (II) Zugabe von HOBt und anschließender Bildung eines reaktiven Aktivesters, der mit der Aminokomponente zum Säureamid weiterreagiert.

In den letzten Jahren haben *O*-Aryluronium und *O*-Arylphosphoniumsalze als Kupplungsreagenzien zunehmend an Bedeutung gewonnen. Sie wurden im Verlauf dieser Arbeit immer

dann eingesetzt, wenn die EDC/HOBt-Kupplungsstrategie nicht zum gewünschten Ergebnis führte oder besonders schwierige Kupplungen vollzogen werden mußten. Die Vorteile dieser Kupplungsreagenzien liegen in der schnelleren Generierung hochreaktiver Aktivester, die sich *in situ* mit sehr kurzen Kupplungszeiten weiter umsetzen lassen. Zu den effektivsten und am häufigsten eingesetzten *O*-Aryluronium-Reagenzien gehören *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU)^[182] und *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HATU)^[181b]. Der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus führt über ein hochreaktives *O*-Acyl-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-Intermediat **C**, das sofort mit der Aminokomponente **E** unter Ausbildung der Amidbindung zum Säureamid **F** weiterreagiert (Schema 7).



Schema 7: Vorgeschlagener Mechanismus der Carbonsäureaktivierung durch TBTU: (A) Säurekomponente; (B) durch nicht-nucleophile Base deprotonierte Säurekomponente; (C) reaktives *O*-Acyl-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-Intermediat; (D) Aktivester; (E) Aminokomponente; (F) Säureamid (Zielprodukt).

Carpino et al. konnten hierbei die Überlegenheit von HATU und anderen 7-Azabenzotriazolbasierten Kupplungsreagenzien in vergleichenden Studien zeigen.^[181b-c] Kürzlich berichteten die Autoren darüber hinaus, daß das Kupplungsreagenz HATU und das verwandte *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-teramethyluroniumtetrafluoroborat (HBTU) sowohl im kristallinen Zustand als auch in Lösung nicht als Uronium- (*O*-Form), sondern als Guanidiniumsalze (*N*-Form) vorliegen.^[183] Durch geeignete Wahl der Synthesebedingungen ist es aber möglich, sie in der Uroniumform zu isolieren. Eine Isomerisierung der *O*- zur *N*-Form kann durch die Abwesenheit tertiärer Amine wie Triethylamin und kurze Aktivierungszeiten weitgehend vermieden werden. Dies ist für die Amidbindungsknüpfungen von besonderem Interesse, da *O*-HATU und *O*-HBTU effizientere Kupplungsreagenzien sind als die entsprechenden *N*-Isomere.^[183] Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde HATU zur anspruchsvollen Peptid-Aktivierung bei der Darstellung der Peptidodendrimere **61** und **62** (s. Kap. 4.2.6.2) eingesetzt.

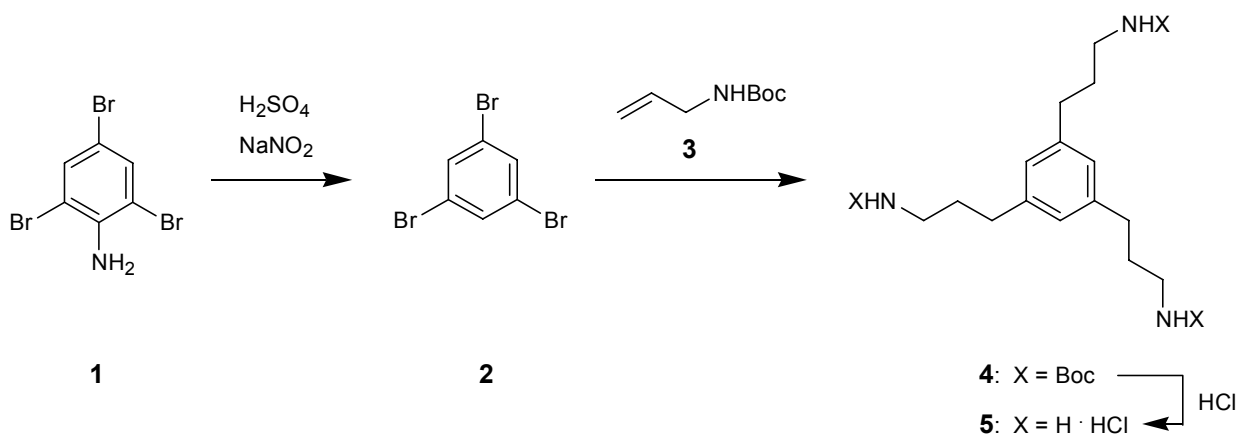
4.2 Synthese der Dendrimere

4.2.1 Der Basis-Satz Dendrimere

Alle Dendren und Dendrimere des Basis-Satzes wurden in einer divergenten Synthesefolge mittels der in Kapitel 4.1 vorgestellten Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung und der EDC/HOBt-Amidbindungsstrategie synthetisiert (vgl. Schema 3). Die Boc-geschützten Verbindungen waren in gängigen organischen Lösungsmitteln wie THF und Mischungen aus Dichlormethan/Methanol oder Hexan/Ethylacetat gut löslich. Nach Abspaltung der Schutzgruppen erwiesen sich die protonierten Dendrimere und Dendren als nahezu unbegrenzt löslich in polaren, protischen Lösungsmitteln wie Wasser und Methanol, was sie für den nachfolgenden Einsatz in biologischen Systemen und in Zellkultur besonders geeignet machte.

4.2.1.1 Die Kernmoleküle

Als Kernmolekül wurde allgemein ein möglichst symmetrisches A_x -Monomer mit freien Aminogruppen zur Anbindung der Dendren mit Carboxylgruppe am fokalen Punkt benötigt. Als Grundmodell wurde zunächst ein an C-1, C-3 und C-5 funktionalisierter Aromat gewählt, der effizient und über wenige Stufen synthetisiert werden konnte (Schema 8).



Schema 8: Synthese des Trisamin-Kerns **5** über 1,3,5-Tribrombenzol mit dreifacher Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung und nachfolgender Abspaltung der Boc-Schutzgruppe.

Die Syntheseroute startet mit dem auch kommerziell erhältlichen 1,3,5-Tribrombenzol, das hier durch eine einfache reduktive Desaminierungsreaktion aus dem Vorläufer **1** in großem Maßstab zugänglich gemacht wurde. Die Hydroborierung der Boc-geschützten Aminokomponente **3** mit

9-BBN erfolgte *in situ* bei Raumtemperatur in wasserfreiem Toluol. Das geschützte aromatische Trisamin **4** konnte nachfolgend über dreifache Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung bei 50 - 60 °C mit sehr guten isolierten Ausbeuten von 94 % nach säulenchromatographischer Aufreinigung erhalten werden, was für eine Umsetzung von mindestens 98 % pro Kupplungsschritt spricht. Höhere Temperaturen führten in allen Fällen zu schlechteren Ausbeuten und einer zunehmenden Anzahl an Nebenprodukten. Die quantitative Entschützung von **4** gelang nachfolgend im 10 g-Maßstab mit 25 %iger HCl in THF, wobei das Hydrochlorid **5** als kristalliner Feststoff durch einfache Fällung aus der Reaktionslösung erhalten werden konnte. Das ¹H-NMR Spektrum dieser Verbindung in [D₄]-Methanol zeigt Abb. 19.

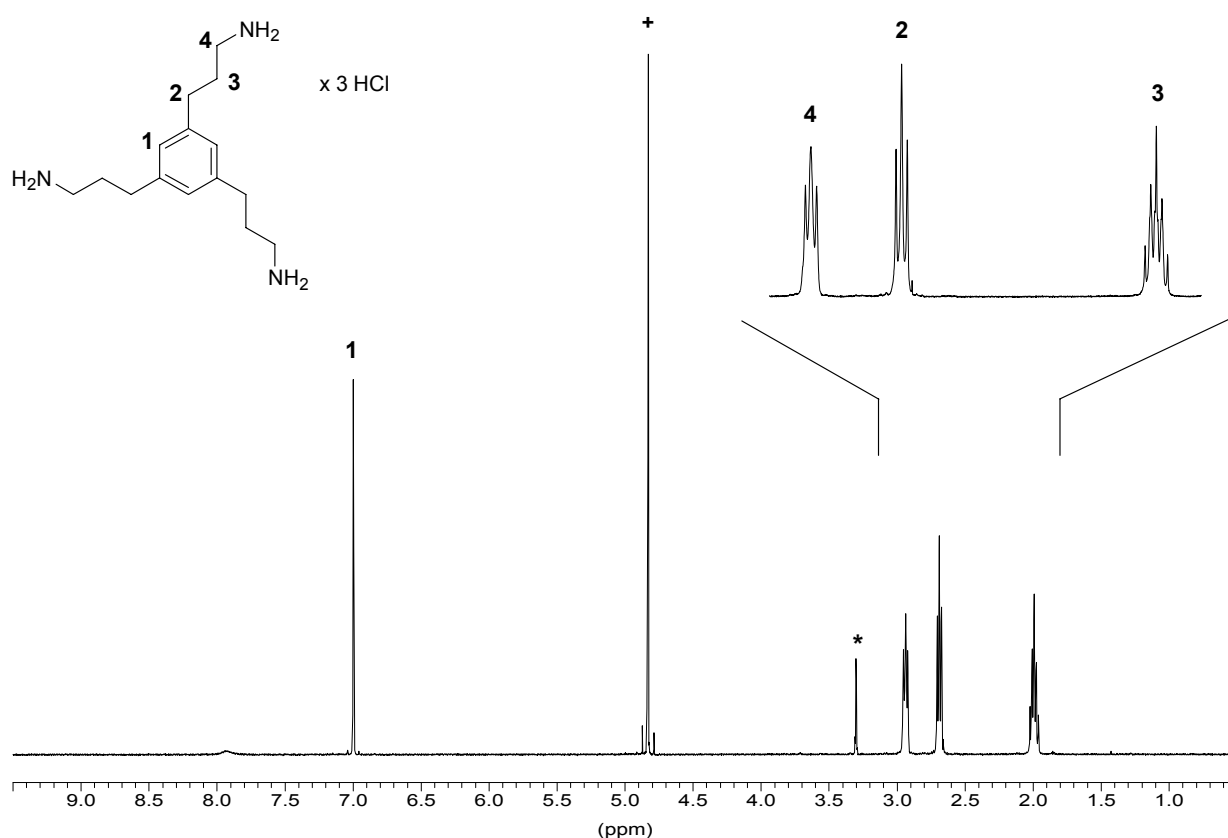
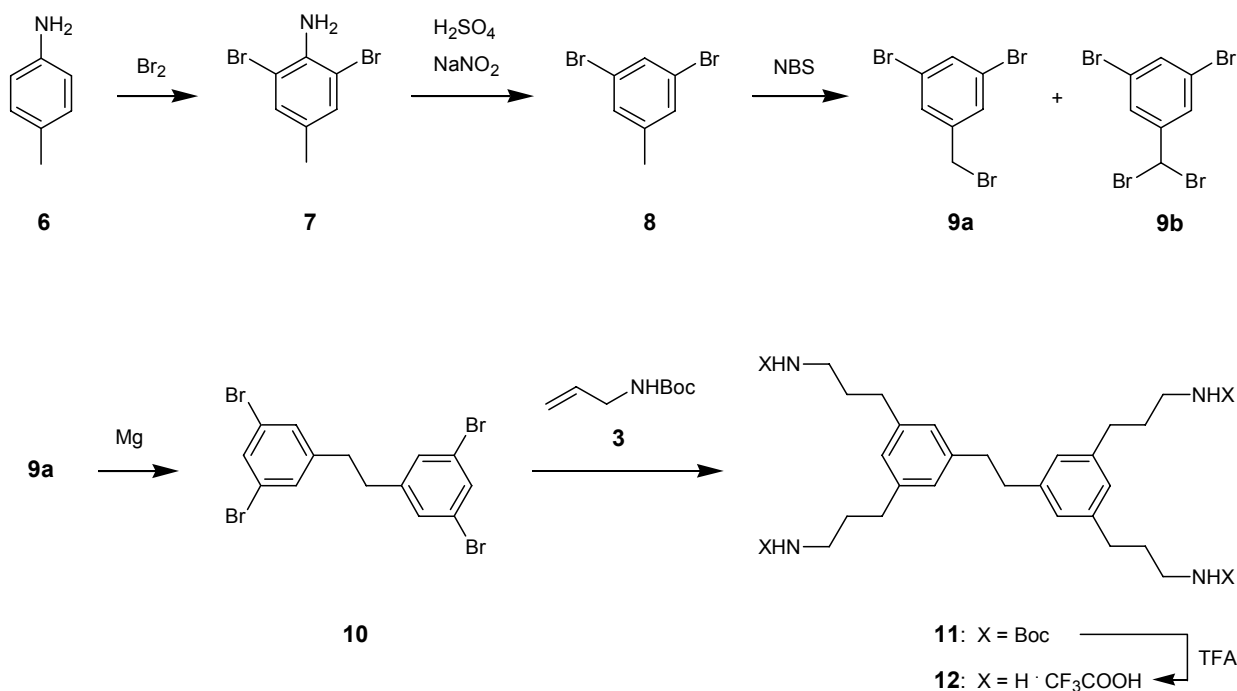


Abb. 19: ¹H-NMR Spektrum (500 MHz) des Trisamin-Kernmoleküls **5** in [D₄]-Methanol. (*) = Methanol; (+) = H₂O.

In einer zweiten synthetischen Route wurde ein Kernmolekül mit vier freien Aminogruppen zur Dendron-Anbindung zugänglich gemacht. Aus vorherigen Arbeiten der Gruppe war der Tetrabromdibenzyl-Aromat **10** als unerwünschtes Homokupplungsprodukt einer Grignard-

Reaktion bekannt.^[184] Dieser konnte nachfolgend über eine vierstufige Synthesefolge ausgehend vom kommerziell erhältlichen *p*-Toluidin **6** gezielt synthetisiert werden (Schema 9).



Schema 9: Synthese eines Dibenzyltetraamin-Kernmoleküls mittels vierfacher Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung (NBS = *n*-Bromsuccinimid; TFA = Trifluoressigsäure).

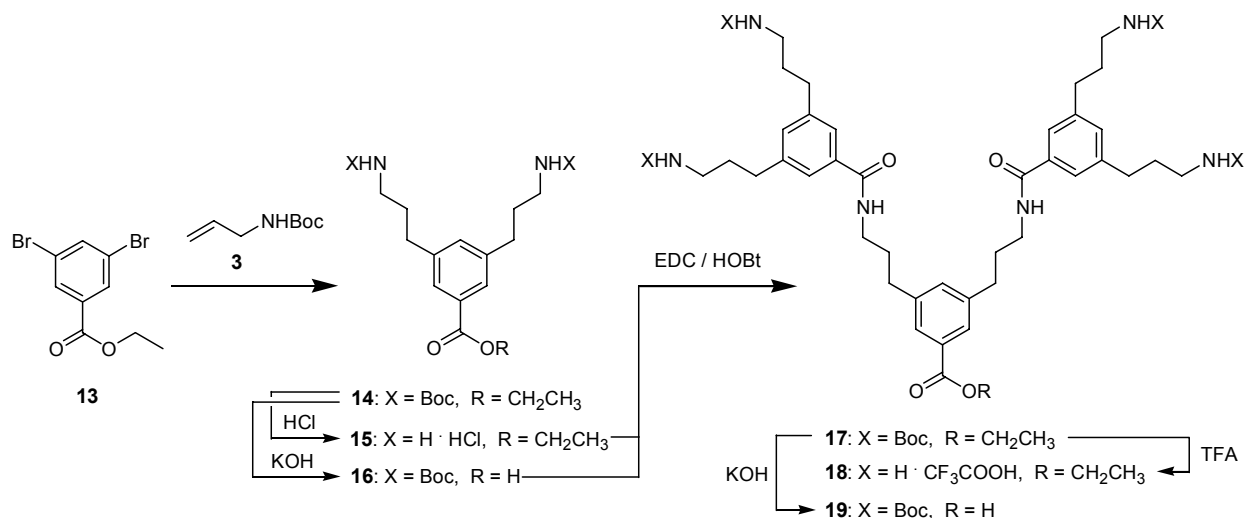
So wurde hier zunächst *p*-Toluidin in Eisessig bromiert, was den Aromaten **7** in Ausbeuten von 68 % nach Umkristallisation aus Methanol ergab. Die Reaktion wurde bei niedrigen Temperaturen und unter Lichtausschluss durchgeführt, um eine Bromierung der Benzylposition zu vermeiden. Der zweifach bromierte Aromat **7** konnte mit dieser Prozedur elementaranalysenrein im 100 g-Maßstab als kristalliner Feststoff erhalten werden. In einer nachfolgenden reduktiven Desaminierungsreaktion mit Schwefelsäure und Natriumnitrit in Ethanol wurde er weiter zum Dibrommethylbenzol **8** umgesetzt. Die gezielte Bromierung in Benzylposition erfolgte im nächsten Schritt mit *n*-Bromsuccinimid (NBS) und einer katalytischen Menge 2,2'-Azobisisobuttersäurenitril (AIBN) in siedendem Tetrachlorkohlenstoff. Hierbei mußte der Reaktionsverlauf kontinuierlich mittels Dünnschichtchromatographie (DC) kontrolliert werden, um den Zeitpunkt der maximalen Umsetzung zum in Benzylposition einfach bromierten Reaktionsprodukt **9a** festzustellen. Bei zu kurzen Reaktionszeiten fanden sich noch größere Mengen des nicht umgesetzten Eduktes **8**, bei zu langen Reaktionszeiten erhielt man zusätzlich zum gewünschten Produkt **9a** noch die in Benzylposition zweifach bromierte Verbindung **9b**, die aufgrund ihres sehr ähnlichen R_f -Wertes säulenchromatographisch kaum von **9a** zu trennen war. Aus diesem

Grund wurde die Reaktion immer dann abgebrochen, wenn das zweifach bromierte Nebenprodukt erstmalig detektiert wurde. Bedingt durch die nicht vollständige Umsetzung blieben die nach Säulenchromatographie isolierten Ausbeuten des gewünschten Produktes **9a** mit etwa 65 % nur mäßig, wobei jedoch immer das Edukt zurückgewonnen werden konnte. Allerdings konnten auch nach wiederholten Aufreinigungsversuchen mittels Massenspektrometrie immer noch kleine Reste von **9b** als Verunreinigung in der Probe **9a** nachgewiesen werden. Die sich an die Bromierung anschließende Homokupplung zum Tetrabromdibenzyl **10** wurde analog der Grignardreaktion durchgeführt, bei der **10** erstmalig erhalten wurde.^[184] Problematisch erwies sich hierbei jedoch die schlechte Löslichkeit des Diphenyls, was die Aufarbeitung erschwerte und zu sehr schlechten Gesamtausbeuten führte. Die geringe Löslichkeit von **10** in allen gängigen organischen Lösungsmitteln erschwerte auch die nachfolgende Umsetzung in einer Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung mit dem Hydroborierungsprodukt des Allylbausteins **3**. Die hier erreichten mäßigen bis schlechten Ausbeuten von 26 % sind zum größten Teil auf die geringe Löslichkeit von **11** zurückzuführen. Auch Variation des Lösungsmittels führte nicht zu einer deutlichen Steigerung der Ausbeuten, ein Problem, das im Rahmen dieser Arbeit nicht zufriedenstellend gelöst werden konnte. Als letzter Schritt führte die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit TFA in einer quantitativen Reaktion zum vollständig entschützten vierfach funktionalisierten Dibenzyl **12**, das prinzipiell als Kern für alle im weiteren vorgestellten Dendrimere zur Verfügung stand. Durch die problematische Reaktionsführung bei der Synthese des 1,3-Dibrom-5-brommethylbenzols **9a** und die schlechte Löslichkeit sowohl des Tetrabromdibenzyls **10** als auch des Reaktionsproduktes **11** konnte das gewünschte Kernmolekül **12** nie im größeren Maßstab als in Mengen von etwa 500 mg synthetisiert werden. Die oben vorgestellte Syntheseroute wurde deshalb nicht weiter verfolgt, und als Kern wurde nachfolgend ausnahmslos die leichter zugängliche Verbindung **5** eingesetzt.

4.2.1.2 Boc- und Fmoc-geschützte Dendren

Die bekannten Boc-geschützten Dendren **16** und **19** wurden zum Aufbau aller weiteren Dendrimere eingesetzt. Schema 10 zeigt die Synthesefolge, mittels derer sie über Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung und EDC/HOBt-Amidbindungsknüpfung im Rahmen dieser Arbeit dargestellt wurden.^[166]

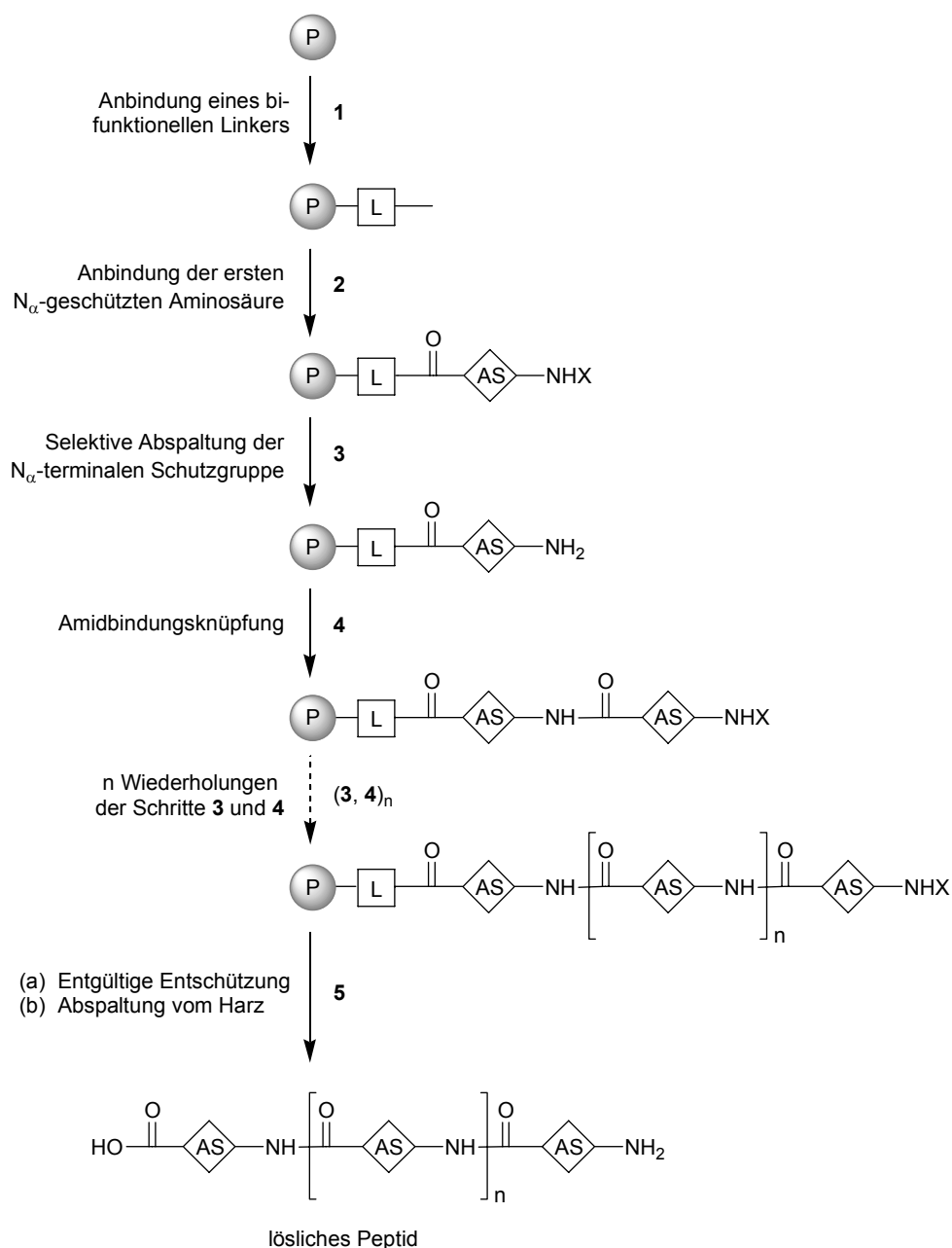
Zusätzlich zu den Boc-geschützten Dendren wurden auch Monomere synthetisiert, die potentiell für eine Dendron-Synthese an der festen Phase einsetzbar sind. Die Vorteile der Festphasensynthese, die erstmalig von *Merrifield* für die Peptidsynthese eingesetzt wurde^[26], liegen zum



Schema 10: Synthesesequenz zur Darstellung der bekannten Boc-geschützten G1- und G2-Dendren 16 und 19.

einen in dem Verzicht auf aufwendige Aufreinigungsprozeduren zwischen den einzelnen Entschützungs- und Aktivierungssequenzen. Zum anderen besteht die Möglichkeit hohe Überschüsse der reagierenden Komponente einzusetzen, wodurch beinahe quantitative Umsetzungen an allen reaktiven Gruppen erreicht werden können. Dadurch können in sehr kurzer Zeit viele aufeinanderfolgende Syntheseschritte ohne Isolierung der Zwischenprodukte durchgeführt werden, wobei die Polymermatrix als permanente Carboxyl-Schutzgruppe fungiert. Die Synthese beginnt mit der Anbindung der ersten N-geschützten Aminosäure an den am Polymer angebrachten „Linker“ (Schema 11). Nach Entschützung der Aminogruppe wird eine zweite aktivierte Aminosäure zugegeben. Die Kettenverlängerung wird dann durch aufeinanderfolgende Entschützungs/Kupplungs-Schritte erreicht, wobei der Überschuss an Reagenzien durch einfaches Waschen und Filtrieren erfolgt. Zum Schluß wird das zumeist komplett entschützte Peptid vom Harz abgespalten und das unlösliche Harz durch Filtration entfernt. Neben den natürlichen, proteinogenen Aminosäuren können mittels Festphasensynthese auch nicht-natürliche Aminosäuren zur Darstellung von synthetischen Polyamiden eingesetzt werden. Zu solchen synthetischen Polyamiden gehören u. a. auch die Dendren des Basis-Satzes, die prinzipiell ebenfalls auf die gleiche Art hergestellt werden könnten. Die Auswahl von geeigneten Schutzgruppen ist hierbei ein entscheidender Schritt in der Festphasensynthese-Prozedur, wobei *orthogonale Schutzgruppen*^{xv} allgemein mildere Gesamtbedingungen garantieren.

^{xv} *Orthogonale Schutzgruppen* können durch mechanistisch unterschiedlich ablaufende Reaktionen und damit unter unterschiedlichen Reaktionsbedingungen getrennt und unabhängig voneinander abgespalten werden.

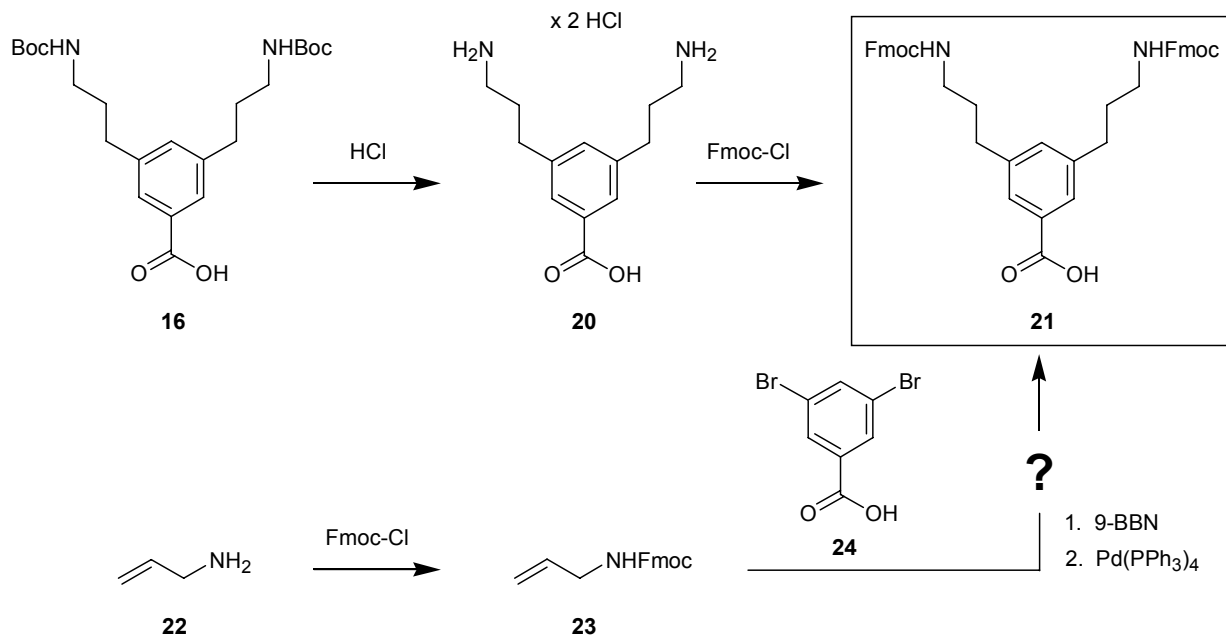


Schema 11: Schematische Darstellung der Festphasen-Peptidsynthese (AS = Aminosäure; L = Linker; P = Harz; X = N $_{\alpha}$ -Schutzgruppe).

Neben der klassischen *Merrifield-Strategie* (Boc-geschützte Amino- und Benzyl (Bzl)-geschützte Carboxylgruppen) wird heute häufig die *Sheppard-Strategie*^[185] mit 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-geschützten Amino- und *tert*-Butyl (*t*Bu)-geschützten Carboxylgruppen eingesetzt. Die Fmoc-Aminoschutzgruppe^[186] wird schnell und quantitativ durch das sekundäre Amin Piperidin abgespalten.^{XVI} Gleichzeitig fängt die Base auch das bei der Entschützung entstehende Dibenzofulven-Intermediat ab, so daß diese Synthesestrategie sehr milde

^{XVI} Es handelt sich hierbei um eine durch Piperidin katalysierte β -Eliminierungsreaktion.

Reaktionsbedingungen garantiert. Für die Festphasensynthese nach der Strategie von *Sheppard* sollten deshalb im Rahmen dieser Arbeit auch entsprechende Fmoc-geschützte AB₂-Monomere zur Verfügung gestellt werden. Die manuelle Festphasensynthese war später insbesondere für die Darstellung der in Kapitel 4.2.6 vorgestellten Peptidodendrimere interessant.



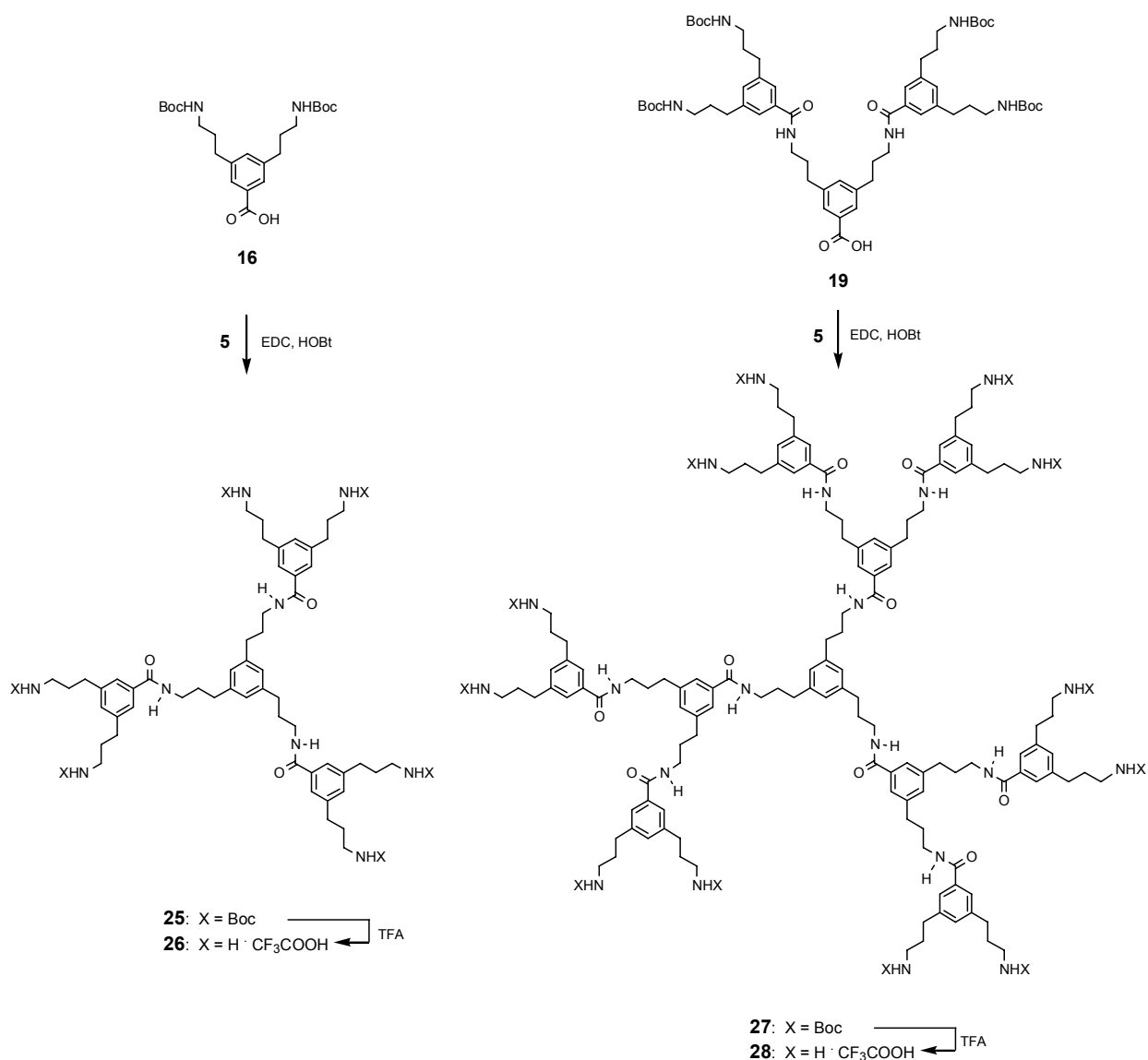
Schema 12: Mögliche Synthesewege zum Fmoc-geschützten Aminosäure-Baustein **21** für die Festphasensynthese.

Die Synthese der Fmoc-geschützten G1-Dendren begann mit dem synthetisch leicht zugänglichen Boc-geschützten Äquivalent **16**, das mit konzentrierter HCl in THF zu 72 % in das Hydrochlorid **20** überführt werden konnte (Schema 12). Daran anschließend erfolgte die Einführung der Fmoc-Aminoschutzgruppen mit 9-Fluorenylmethyloxycarbonylchlorid (Fmoc-Cl). Dazu wurde analog einer Prozedur von *Chen* und *Benoiton*^[187] ausgehend vom Aminosäure-Hydrochlorid **20** wässrige Na₂CO₃-Lösung als Basenkomponente gewählt und anschließend mit Fmoc-Cl in THF bei 0 °C die beiden Aminogruppen geschützt. Die Fmoc-geschützte Säure **21** konnte so in guten Ausbeuten von 73 % nach Umkristallisation aus Ethylacetat/Hexan erhalten werden. Um das Monomer analog der Synthese des Boc-geschützten Bausteins **16** auch auf dem Weg über eine Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung zugänglich zu machen, wurde zunächst kommerziell erhältliches Allylamin **22** in einer ähnlichen Prozedur wie die Aminosäure **20** mittels Fmoc-Cl und Na₂CO₃ als Base in THF in guten Ausbeuten von 91 % geschützt (Schema 12). Der Vorläufer **23** stand nun nachfolgend für eine Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung mit der Säure **24** zur Verfügung, die ebenfalls mit Na₂CO₃ als Base realisierbar sein sollte. Für diesen Synthe-

seweg müßte zuvor allerdings die Stabilität der Fmoc-Schutzgruppe unter den Bedingungen der Suzuki-Miyaura-Kupplungsreaktion überprüft werden. Bei positivem Ergebnis stellt dieser synthetische Weg allerdings eine weitere potentielle Möglichkeit zur Synthese der gewünschten Fmoc-geschützten Aminosäure **21** dar, bei der insgesamt weniger Stufen durchlaufen werden müssen als beim Weg über den Boc-geschützten Baustein **16**.

4.2.1.3 Die Dendrimere

In einer divergenten Synthesestrategie wurden zunächst die Dendren **16** und **19** synthetisiert (vgl. Schema 10), die nachfolgend über eine EDC/HOBt-Amidbindungsknüpfung in wasserfreiem Dichlormethan an das Kernmolekül **5** angebunden wurden (Schema 13).



Schema 13: Synthese der wasserlöslichen Dendrimere **26** und **28** des Basis-Satzes.

Nach wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung ließen sich so die entsprechenden Boc-geschützten G1- und G2-Dendrimere **25** und **27** in guten Ausbeuten von 75 - 78 % erhalten (vgl. Schema 13). Bei den Boc-geschützten Dendrimeren wurde besonderer Wert auf eine vollständige Aufreinigung gelegt, da Verunreinigungen später aufgrund der hohen Polarität der entschützten Verbindungen nicht mehr von diesen abgetrennt werden konnten. In jedem Fall wurde die erzielte Reinheit der Dendrimere mittels NMR-Spektroskopie und analytischer „reversed-phase“ (RP)-HPLC überprüft. Abb. 20 zeigt zwei typische RP-HPLC-Läufe des Boc-geschützten G2-Dendrimers **27** nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Kieselgel (Dichlormethan / 4 % Methanol als Eluens) und nach präparativer RP-HPLC (Methanol / 10 % H₂O als Eluens). Die Reinheit des Dendrimers wurde mittels UV-Detektion und anschließender Integration bestimmt und betrug 98.2 % nach säulenchromatographischer Reinigung und 100 % nach präparativer RP-HPLC.

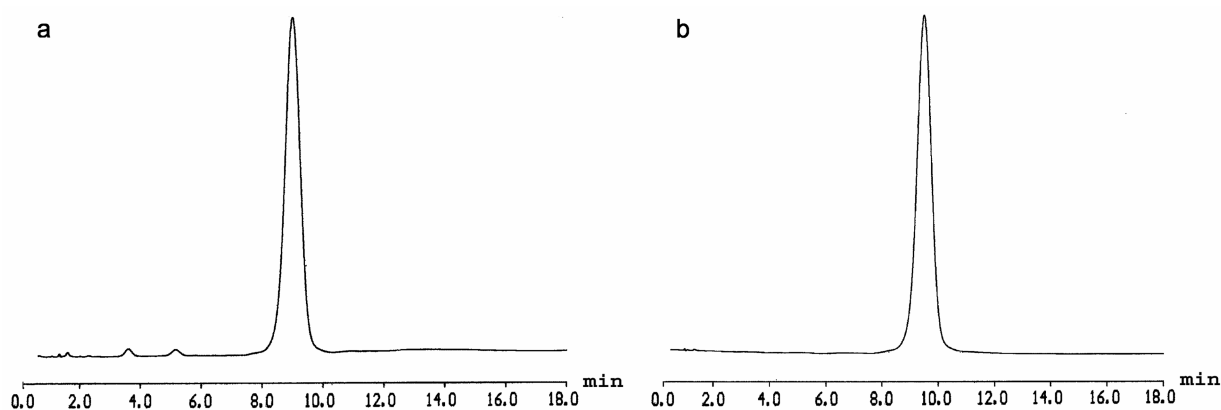


Abb. 20: Analytischer RP-HPLC-Lauf des Boc-geschützten G2-Dendrimers **27**: (a) wie erhalten nach säulenchromatographischer Aufreinigung; (b) erhalten nach präparativer RP-HPLC. *Eluent* (analytischer RP-HPLC-Lauf): Methanol / H₂O (9 : 1 / v : v); *Flußrate*: 1 ml/min.

Die nachfolgende Behandlung der Boc-geschützten Dendrimere mit TFA in Dichlormethan ergab quantitativ die entsprechenden entschützten Dendrimere **26** und **28** als vollständig wasserlösliche Trifluoracetate. Nach Gefriertrocknung aus Wasser erhielt man sie als gut handhabbare, farblose Feststoffe, die unmittelbar für die nachfolgenden Cytotoxizitäts-Tests in Zellkultur eingesetzt werden konnten (vgl. Kap. 4.3.1). Das ¹H-NMR-Spektrum des kationischen G2-Dendrimers **28** demonstriert zusätzlich die erzielte Reinheit der Verbindung (Abb. 21).

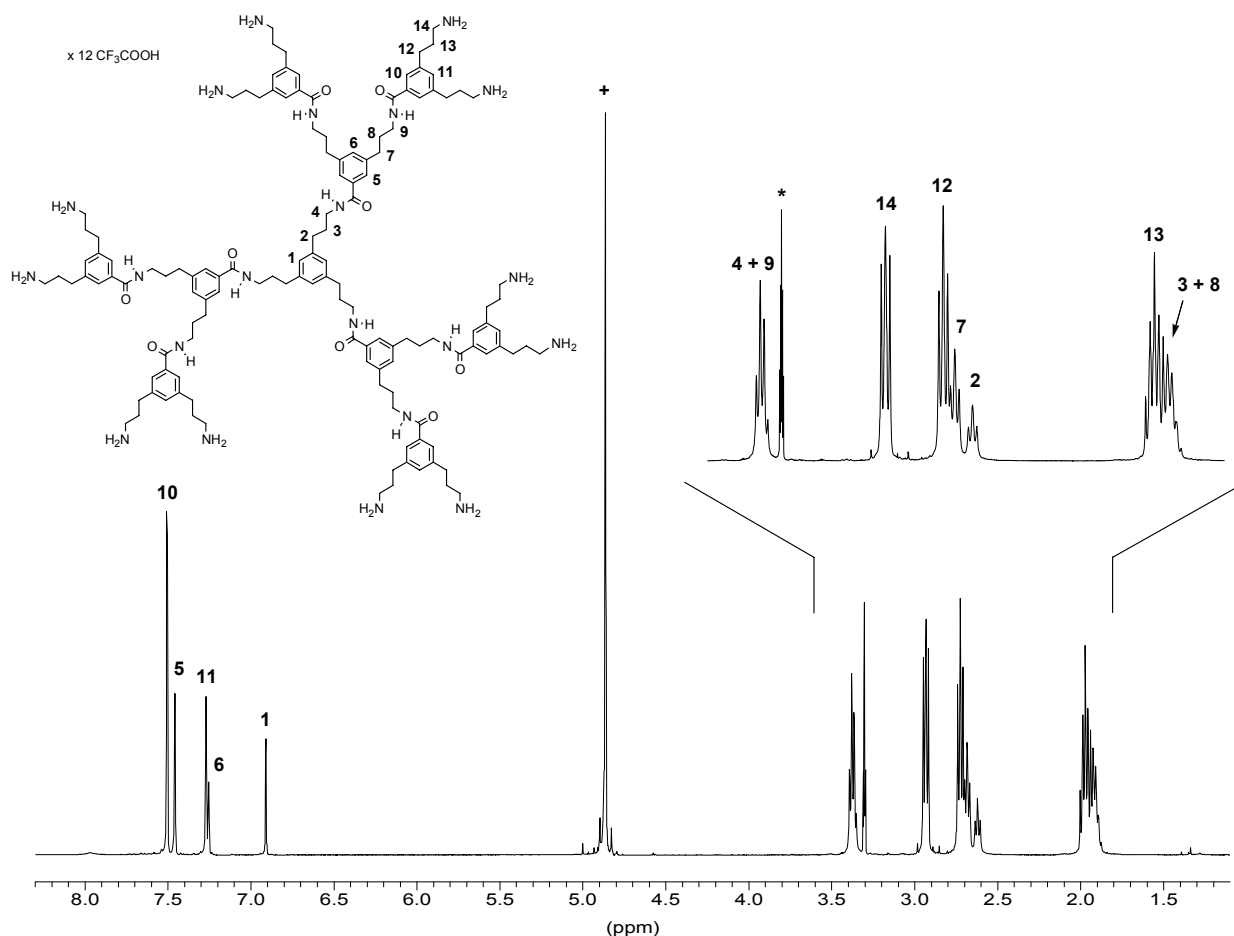


Abb. 21: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) des entschützten G2-Dendrimers **28** des Basis-Satzes in $[\text{D}_4]$ -Methanol. (*) = Methanol; (+) = H_2O .

Die Kristallisation der vorgestellten Dendrimere erwies sich unter anderem wegen ihrer relativ großen strukturellen Flexibilität und der Neigung, Lösungsmittelmoleküle in ihrem Inneren einzuschließen, als schwierig. Um dennoch nähere Einblicke in die dreidimensionale Struktur der beiden kationischen, wasserlöslichen Dendrimere **26** und **28** des Basis-Satzes zu erhalten, wurden ihre Strukturen mittels computerunterstützter Simulationsrechnungen in wässriger Umgebung modelliert.^{XVII} Die pK_B -Werte der peripheren Propylamin-„Arme“ der Dendrimere

^{XVII} Die computerunterstützten Modellrechnungen wurden im Kooperation mit der Arbeitsgruppe von S. Pricl im ‘Dipartimento di Ingegneria Chimica, dell’ Ambiente e delle Materie Prime’ (DICAMP) (Labor für computerunterstützte Systeme, Institut für Technische Chemie) an der Universität von Triest, Triest, Italien, durchgeführt. Die ‘molecular mechanics (MM)’- und ‘dynamics (MD)’-Simulationen erfolgten mit den Programmpacketen *Cerius²* (Vers. 4.2), *Discover* und *Materials Studio* (Vers. 2.2) (alle von *Accelrys Inc.*, San Diego, USA) mit selbstentwickelten Codes und einem kombinierten ‘molecular mechanics/dynamics simulated annealing’ (MDSA)-Protokoll.

Für die genauen Bedingungen zur Durchführung der Berechnungen, siehe:

S. Pricl, M. Fermeglia, ‘Molecular simulation of host-guest inclusion compounds: an approach to the lactodendrimers’, *Carbohydr. Polym.* **2001**, *45*, 23-33; M. Fermeglia, S. Pricl, ‘Computer-Aided Simulation

wurden nicht exakt bestimmt. Es schien aber sinnvoll vereinfachend davon auszugehen, daß sie sich wie voneinander unabhängige primäre Amine verhalten und vollständig protoniert vorliegen. Diese Annahme wurde, zusammen mit dem Austausch von Trifluoracetat gegen Chlorid als Gegenion, als Grundlage für die Berechnung der Dendrimmerstrukturen in Abb. 22 genommen.

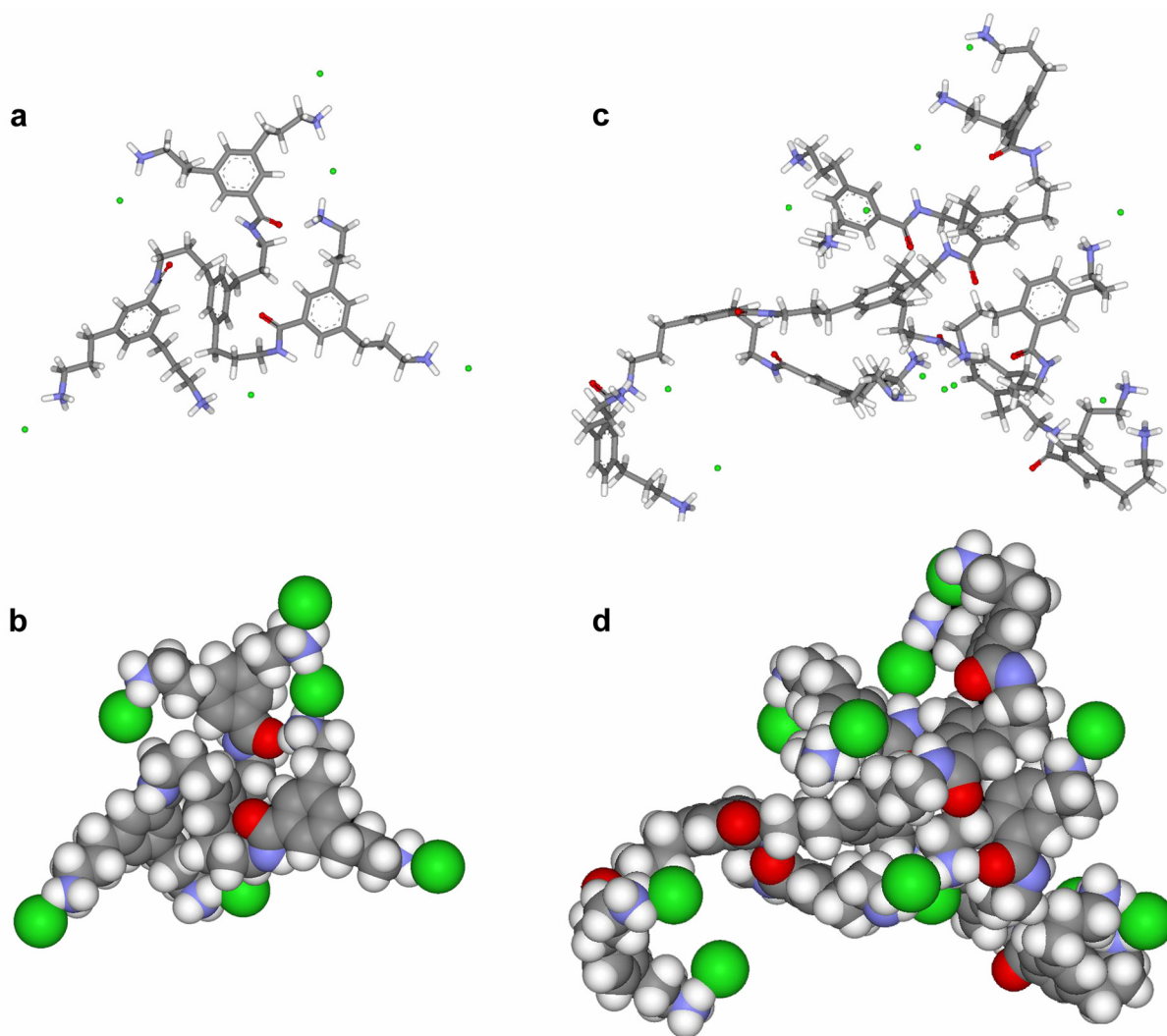


Abb. 22: MD-equilbrierte Momentaufnahmen der beiden kationischen Dendrimere (G1 und G2) des Basis-Satzes in Wasser. Beide Dendrimere wurden bei 37 °C in ihrer vollständig protonierten Form mit Chlorid als Gegenionen berechnet. (a) Bindungsmodell des G1-Dendrimers **26**; (b) Kalottenmodell (raumerfüllend) des G1-Dendrimers **26**; (c) Bindungsmodell des G2-Dendrimers **28**; (d) Kalottenmodell (raumerfüllend) des G2-Dendrimers **28**. Grau = Kohlenstoff, Blau = Stickstoff, rot = Sauerstoff, grün = Chlorid.

of a Dendrimer with a Protoporphyrinic Core as Potential, Novel Hemoprotein Mimic”, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2471-2478;

S. Pricl, M. Fermeglia, M. Ferrone, A. Asquini, “Scaling properties in the molecular structure of three-dimensional, nanosized phenylene-based dendrimers as studied by atomistic molecular dynamics simulations”, *Carbon* **2003**, *41*, 2269-2283.

Alle Dendrimerstrukturen wurden für eine Temperatur von 37 °C in Wasser optimiert, wobei davon ausgegangen wurde, daß jedes Dendrimer von einer kubischen Box von TIP3P Wassermolekülen^[188] solvatisiert ist, die sich mindestens 10 Å in jede Richtung um das Dendrimer erstrecken.

Abb. 22 zeigt, daß bei dem entschützten G1-Dendrimer **26** die aromatischen Verzweigungseinheiten der Dendren und vor allem die freien Aminogruppen der Propylamin-, „Arme“ mit ihren positiven Ladungen relativ „offen“ und strukturell zugänglich sind. Das G2-Dendrimer **28** weist allerdings bereits eine relativ kompakte Anordnung im Inneren auf, so daß hier der Kern isoliert und abgeschirmt vom umgebenden Medium scheint, während die positiv geladenen Aminogruppen in das umgebende Medium weisen. Die so berechnete dreidimensionale Struktur der Dendrimere spielt später insbesondere bei den Cytotoxizitäts-Untersuchungen eine wichtige Rolle (s. Kap. 4.3). Es wird vermutet, daß sich hierbei strukturelle Oberflächenmerkmale in Hinblick auf die beobachtete Cytotoxizität deutlich bemerkbar machen, wohingegen die innere Struktur der Dendrimere weitgehend unwichtig zu sein scheint.

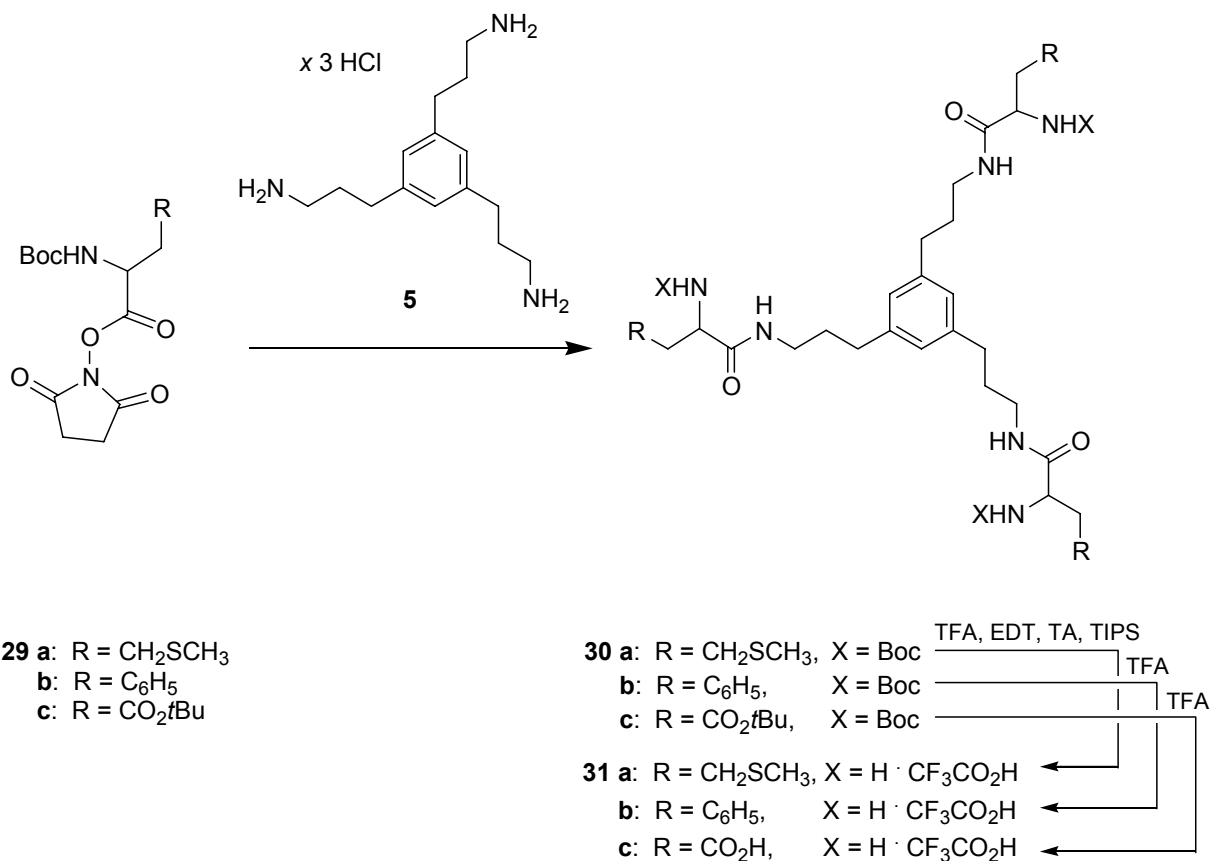
4.2.2 Dendrimere mit proteinogenen Aminosäuren

Um den Einfluß der Oberflächenfunktionalisierung auf die Cytotoxizität der jeweiligen Dendrimere zu untersuchen, wurden im folgenden Dendrimere synthetisiert, deren periphere Aminogruppen mit proteinogenen Aminosäuren funktionalisiert sind. Exemplarisch wurden dazu die drei Aminosäuren L-Methionin, L-Asparaginsäure und L-Phenylalanin gewählt. L-Methionin wurde ausgewählt, da bekannt ist, daß dieses im Körper mit Pt^{2+} -Ionen sehr stabile Komplexe bildet.^[189] Die Wechselwirkung mit in Proteinen vorkommenden Methionin- und Cysteinresten ist vermutlich auch für die rasche Inaktivierung von Cisplatin im Körper verantwortlich.^[190] Anhand dieser L-Methionin-Dendrimere sollte die selektive Anbindung von Pt^{2+} an die Dendrimeroberflächen grundlegend untersucht werden. Dabei wurde in Kauf genommen, daß die spätere Freisetzung der Platinkomplexe durch die stabile Chelatbindung vermutlich schwierig ist. Ebenso wie L-Methionin weist auch L-Aspartat an der Oberfläche von Dendrimeren chelatisierende Eigenschaften für Metallionen auf, da sich bei Metallbindung ein stabiler, sechsgliedriger Ring über die freie Amino- und Carboxylgruppe der Aminosäure ergibt. Darüber hinaus weist das gesamte Dendrimer durch die beiden freien funktionellen Gruppen der L-Asparaginsäure einen zwitterionischer Charakter auf, wobei bei neutralem pH-Wert die Aminogruppen der Asparaginsäure protoniert und positiv geladen und die Carboxylgruppen dagegen deprotoniert und negativ geladen vorliegen sollten. Zur Schaffung eines dritten Oberflächenmotivs wurde L-Phenylalanin mit seiner aromatischen, hydrophoben Seitenkette gewählt, die an der Dendrimeroberfläche in enger Nachbarschaft zur freien, bei neutralem pH-Wert protonierten Aminogruppe am α -Kohlenstoffatom vorliegt.

4.2.2.1 G0-Dendrimere mit L-Methionin, L-Phenylalanin und L-Asparaginsäure

Die Synthese der G0-Dendrimere, bei denen drei Aminosäuren direkt an das Kernmolekül angebunden sind, begann mit den drei Boc- und, im Falle von L-Asparaginsäure, Boc- und *t*Bu-geschützten Hydroxysuccinimidestern von L-Methionin, L-Phenylalanin und L-Asparaginsäure. Alle Reaktionen, bei denen die oxidationsempfindliche Aminosäure L-Methionin beteiligt war, wurden grundsätzlich unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Die direkte Umsetzung mit dem Kernmolekül **5** ergab die entsprechenden geschützten Dendrimere **30a-c** in guten isolierten Ausbeuten von 80 - 89 % nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Schema 14). Nachfolgende Entschützung mit TFA in Dichlormethan gab in allen drei Fällen quantitativ die entsprechenden entschützten Dendrimere als wasserlösliche Trifluoracetate. Die Entschützungen

wurden generell eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei nur im Falle des L-Asparaginsäure-Dendrimers **31c** eine verlängerte Entschützungszeit von drei Stunden zur vollständigen Abspaltung sowohl der Boc- als auch der *t*Bu-Schutzgruppen nötig war. Bei der Entschützung des L-Methionin-G0-Dendrimers **30a** wurde ein „Entschützungscocktail“ bestehend aus den nucleophilen Abfangreagenzien Ethandithiol (EDT), Thioanisol (TA) und Triisopropylsilan (TIPS) zugegeben, um die unerwünschte Alkylierung des Thioethers zu verhindern.

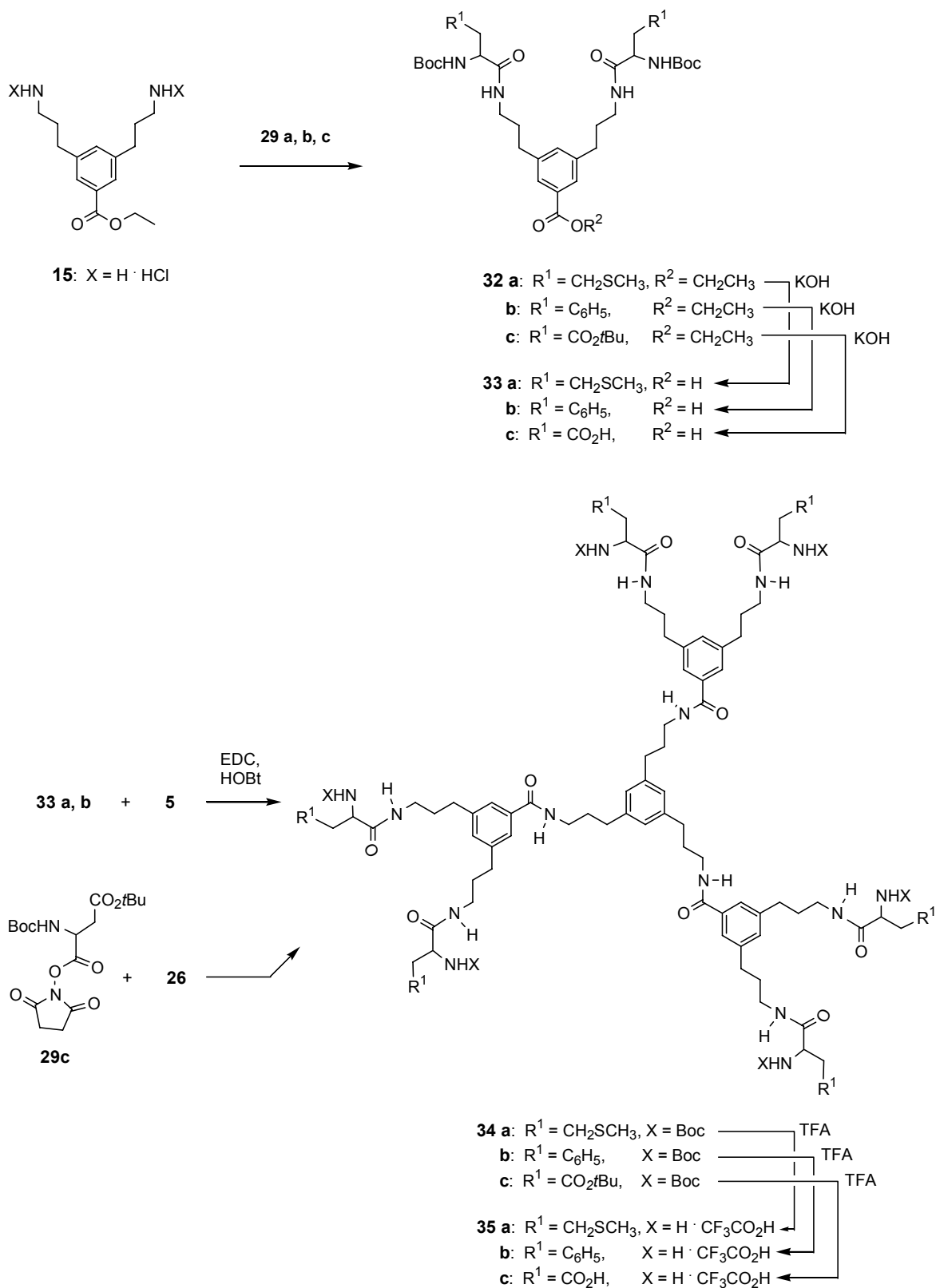


Schema 14: Synthese der L-Methionin, L-Phenylalanin und L-Asparaginsäure-terminierten G0-Dendrimere **31a-c**.

4.2.2.2 G1-Dendrimere mit L-Methionin, L-Phenylalanin und L-Asparaginsäure

Um in einer konvergenten Syntheseprozedur die Aminosäure-terminierten G1-Dendrimere **34a-b** aufzubauen, wurden zunächst die G1-Dendren **32a-b** synthetisiert (Schema 15). Die Umsetzung erfolgte dabei durch Reaktion der freien Aminogruppen des G1-Hydrochlorids **15** mit den Hydroxysuccinimidestern von L-Methionin, L-Asparaginsäure und L-Phenylalanin. Die entsprechenden G1-Dendrimere **34a** und **34b** wurden nachfolgend aus den Boc-geschützten L-Methionin- und L-Phenylalanin-G1-Dendren **32a** und **32b** zusammen mit dem Kernmolekül **5**

in einer EDC/HOBt-aktivierten Amidbindungsknüpfung synthetisiert. Im Gegensatz zum konvergenten Aufbau der Dendrimere **32a-b** wurde bei der Darstellung des L-Asparaginsäure-



Schema 15: Synthesesequenz zu den L-Methionin-, L-Phenylalanin- und L-Asparaginsäure-terminierten G1-Dendrimern **35a-c**.

G1-Dendrimers **32c** eine divergente Synthesestrategie eingesetzt, bei der der Boc- und *t*Bu-geschützte L-Asparaginsäure-Hydroxysuccinimidester **29c** direkt mit dem entschützten G1-Dendrimmer **26** umgesetzt wurde. Der Grund für diesen Wechsel in der Synthesestrategie waren die Schwierigkeiten, die bei der direkten Verseifung des L-Asparaginsäure-G1-Dendrons **32c** auftraten. Hierbei war es unter keiner der gewählten Bedingungen möglich, selektiv den Ethylester an Position R² zu verseifen ohne auch gleichzeitig den *tert*-Butylester an Position R¹ abzuspalten. Erhalten wurde ausschließlich das unerwünschte, vollständig verseifte Dendron **33c** (vgl. Schema 15). Die drei Boc-geschützten Dendrimere **34a-c** wurden nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Kieselgel in mäßigen bis guten Ausbeuten von 48 - 71 % erhalten. Abb. 23 zeigt vergleichend die ¹H-NMR-Spektren der beiden L-Asparaginsäure-Dendrimere **30c** und **34c** in [D]-Chloroform.

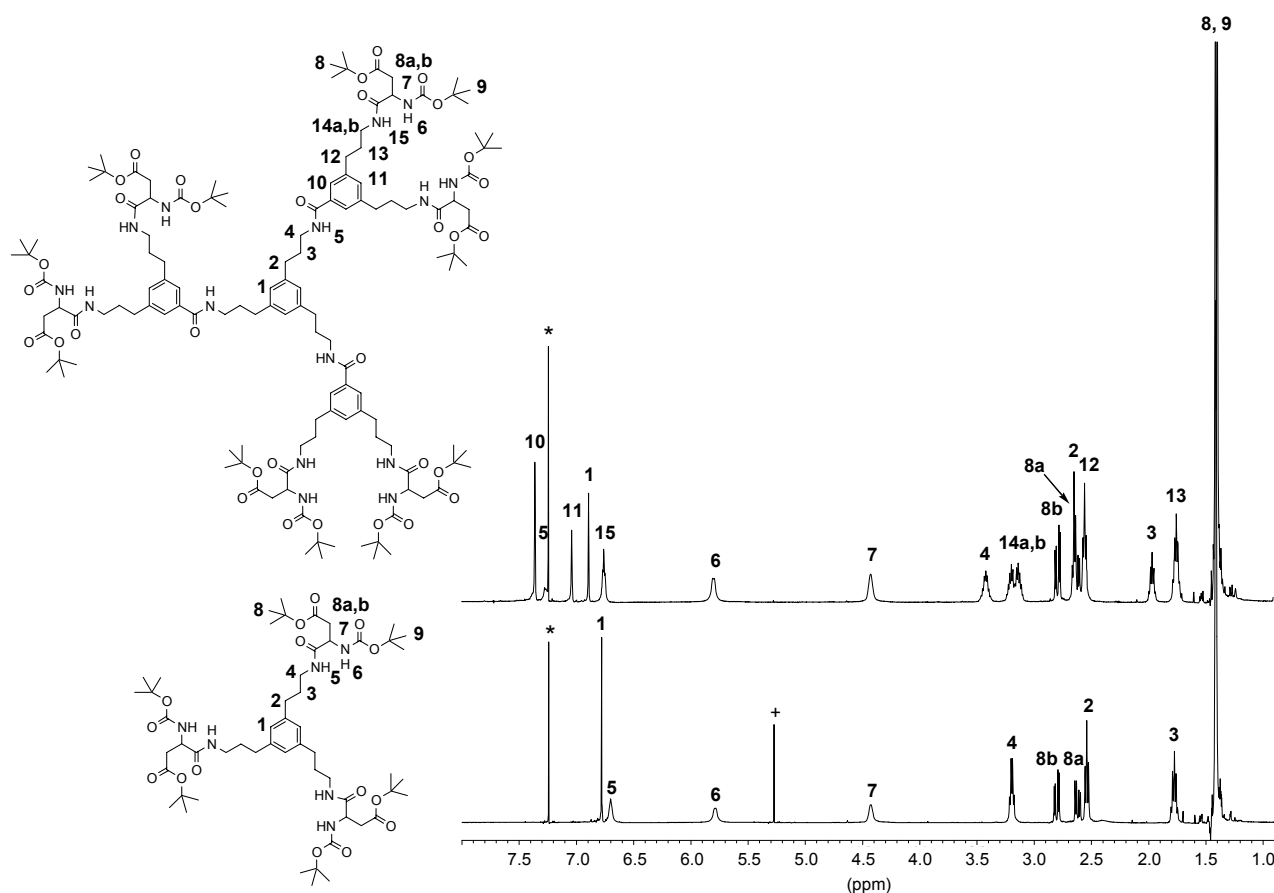


Abb. 23: ¹H-NMR-Spektren (500 MHz) der beiden Boc-geschützten G0- und G1-L-Asparaginsäure-Dendrimere **30c** (unten) und **34c** (oben) in [D]-Chloroform. (*) = CHCl₃; (+) = CH₂Cl₂.

Bei beiden Dendrimern zeigen die Protonen 8a,b eine diastereotopie Kopplung und spalten in zwei getrennte Signale bei 2.6 ppm und 2.8 ppm auf. Interessanterweise sind beim G1-Dendri-

mer **34c** auch die Signale der beiden Protonen an Position 14 als zwei getrennte Multipletts bei geringfügig anderen ppm-Werten sichtbar, ein Effekt, der auch bei den analogen L-Methionin- und L-Phenylalanin-Dendrimern zu beobachten ist. Durch die eingeschränkte Rotation und den partiellen Doppelbindungscharakter der Amidbindung könnte diese beiden Signale den entsprechenden *cis/trans*-Isomeren der Verbindung entsprechen. Erstaunlich ist allerdings, daß dies weder bei den G0-Dendrimern noch bei den anderen Amidbindungen im Molekül zu beobachten ist.

Die Entschützung wurde bei den G1-Dendrimern analog zur Prozedur bei den entsprechenden G0-Dendrimern mit TFA in Dichlormethan durchgeführt. Alle Dendrimere wurden dabei als wasserlösliche Trifluoracetate erhalten, die aus Wasser gefriergetrocknet werden konnten. Zu dem L-Methionin-Dendrimer wurde wiederum ein „Entschützungcocktail“ aus EDT, TA und TIPS zur Verhinderung unerwünschter S-Alkylierungen zugegeben. Bei dieser wie auch bei allen anderen Reaktionen und Aufreinigungsprozeduren, in denen die oxidations-

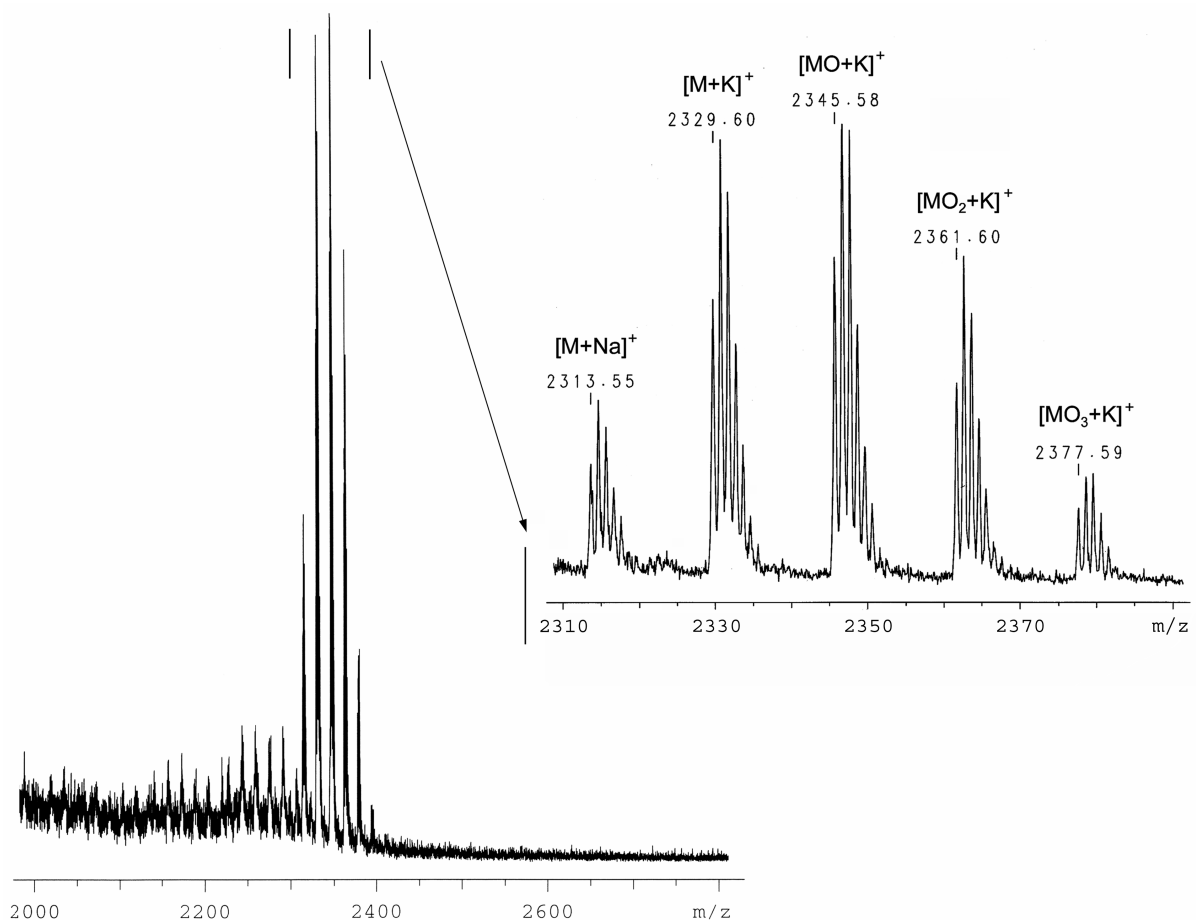


Abb. 24: MALDI-TOF Massenspektrum des Boc-geschützten L-Methionin-G1-Dendrimers **34c** (Reflektor-Modus, Matrix: Dithranol).

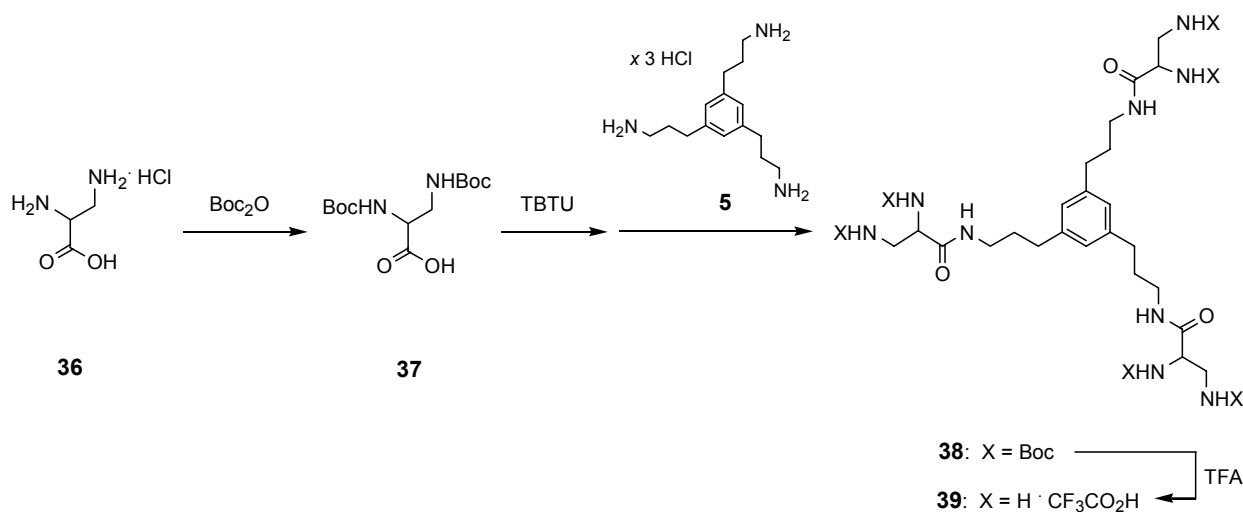
empfindliche Aminosäure Methionin involviert war, wurde ausschließlich unter Inertgas gearbeitet. Trotz aller Vorsichtsmaßnahmen konnte eine partielle Oxidation der Thioether-Gruppen des L-Methionin-G1-Dendrimers nicht vollständig verhindert werden. Dies konnte unmittelbar in einer Zunahme der Polarität des Boc-geschützten Dendrimers **34a** beobachtet werden. Auch das MALDI-TOF-Massenspektrum des G1-Dendrimers **34a** zeigte Signale, die auf die Inkorporation von bis zu drei Sauerstoffatomen zurückzuführen sind (Abb. 24).

4.2.3 Dendrimere mit Ethylendiamin-Liganden

Für die potentielle Anbindung von anticarcinogen wirksamem Pt^{2+} an dendritische Trägermoleküle wurde ein leicht zugänglicher Ligand benötigt, über den die Metallionen in einer Cisplatin-artigen Weise an der Dendrimeroberfläche komplexiert werden können. Hierzu wurde die kommerziell erhältliche, nichtproteinogene Aminosäure D/L-2,3-Diaminopropionsäure ausgewählt. Ausgehend von dieser Verbindung wurde eine konvergente Syntheseroute zur Darstellung der Ethylendiamin-terminierten Dendrimere eingeschlagen. Dabei wurden zunächst in einer leicht modifizierten synthetischen Prozedur nach *Sergheraert et al.*^[191] die beiden Aminogruppen der D/L-2,3-Diaminopropionsäure **36** Boc-geschützt (Schema 16). Die Schützung gelang mittels *tert*-Butoxycarbonylanhydrid in einer Mischung aus 2-Propanol und wässriger Kaliumhydroxid-Lösung mit guten isolierten Ausbeuten von 85 % nach Umkristallisation aus Dichlormethan/*n*-Pentan. Hier und in allen nachfolgenden Syntheseschritten wurde kein Versuch zur Trennung der beiden Enantiomere unternommen.

4.2.3.1 G₀-Dendrimere mit D/L-2,3-Diaminopropionsäure

Die Synthese des G₀-Dendrimers erfolgte ausgehend vom Boc-geschützten 2,3-Diaminopropionsäure-Baustein **37** in einer Mischung aus Dichlormethan (DCM) und N,N-Dimethylformamid (DMF). Aufgrund der starken Neigung von **37** zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und der daraus resultierenden schlechten Löslichkeit in reinem DCM erwies sich die Zugabe von etwa 5 – 10 % DMF zur Verbesserung der Löslichkeit als unverzichtbar. Die Aktivierung der Carboxylgruppe des Boc-geschützten 2,3-Diaminopropionsäure-Bausteins **37**



Schema 16: Synthese des D/L-2,3-Diaminopropionsäure-terminierten G₀-Dendrimers **39**.

wurde mit Hilfe des *O*-Aryluroniumborats TBTU durchgeführt, über dessen *in situ* erzeugten Aktivester (vgl. Schema 7) die direkte Umsetzung mit dem Kernmolekül **5** zum geschützten, Ethylendiamin-terminierten G0-Dendrimer **38** gelang (Schema 16). Für die Kupplung wurden relativ tiefe Temperaturen von -20 bis -30 °C gewählt, was die Reaktion verlangsamt, jedoch die Gesamtausbeute steigerte. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung betrug so die isolierte Ausbeute des Boc-geschützten G0-Dendrimers **38** 80 %. Das D/L-2,3-Diaminopropionsäure-terminierte Dendrimer **38** konnte anschließend mit Trifluoressigsäure in DCM quantitativ zum wasserlöslichen Trifluoracetat **39** entschützt werden. Abb. 25 zeigt vergleichend die ¹H-NMR-Spektren von **38** vor und nach der Entschützungsprozedur.

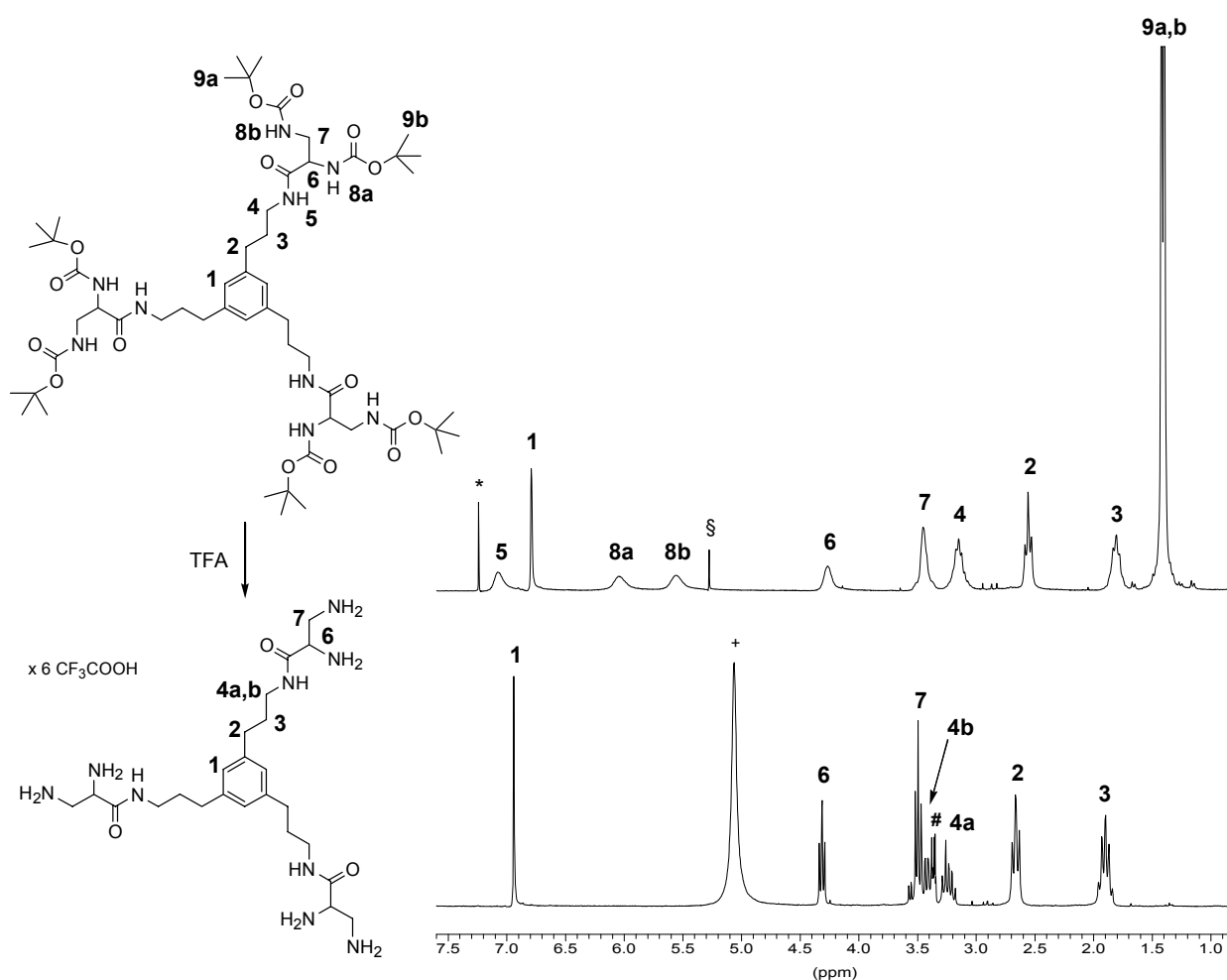


Abb. 25: Vergleichende Darstellung der ¹H-NMR-Spektren (250 MHz) des Boc-geschützten G0-Dendrimers **38** in [D]-Chloroform (oben) und des entschützten Dendrimers **39** in [D₄]-Methanol (unten). (*) = Chloroform; (#) = Methanol; (+) = H₂O; (§) = DCM.

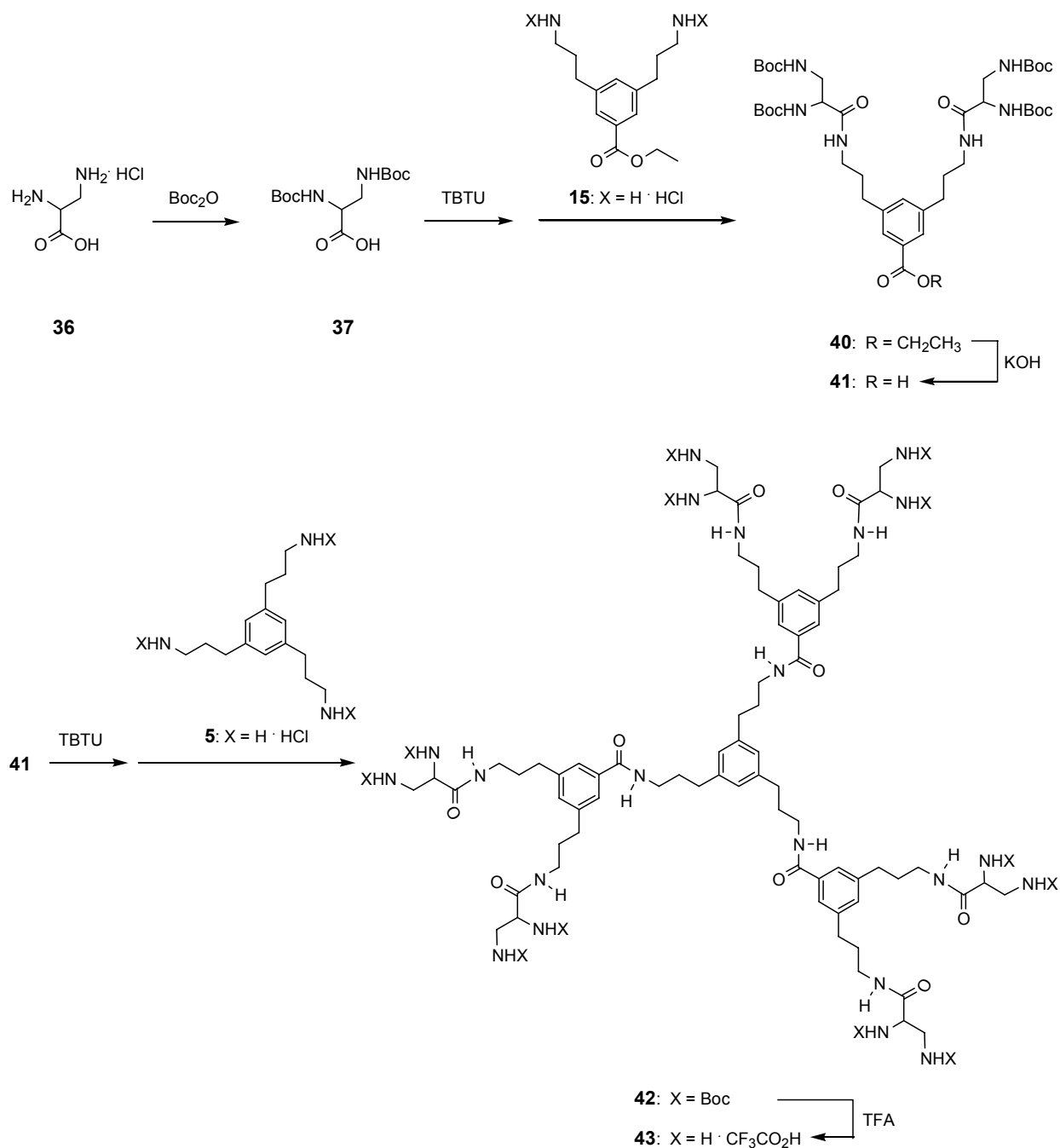
Interessanterweise konnten in den FAB(+)-Massenspektren des entschützten Dendrimers **39** nicht nur die Signale der entsprechenden [M+H]⁺-Ionen detektiert werden, sondern es zeigten

sich auch solche, die von der Bindung des relativ seltenen Metallions Cs^+ zeugten. Im Einklang mit den drei potentiellen Ethylendiamin-Chelatliganden des G0-Dendrimers fanden sich im Massenspektrum drei Signale mit einer zusätzlichen Masse von 133 g/mol.

4.2.3.2 G1-Dendrimere mit D/L-2,3-Diaminopropionsäure

Analog der Aktivierung des D/L-2,3-Diaminopropionsäure-Bausteins **37** zur Synthese des Boc-geschützten G0-Dendrimers **39** wurde auch zum Aufbau des G1-Dendrons **40** Verbindung **37** mit TBTU in den entsprechenden Aktivester überführt und *in situ* bei einer Temperatur von $-20\text{ }^\circ\text{C}$ weiter zum Boc-geschützten AB_2 -Monomer umgesetzt (Schema 17). Auch hier war die Zugabe von etwa 5 % DMF zum Reaktionsansatz nötig, um sowohl den Boc-geschützten D/L-2,3-Diaminopropionsäure-Baustein **37** als auch das resultierende G1-Dendron **40** vollständig löslich zu halten. Das Boc-geschützte Dendron **40** (Schema 17) zeigte eine starke Neigung zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, was sich neben seiner relativ schlechten Löslichkeit in reinem DCM und Chloroform auch in den entsprechenden NMR-Spektren der Verbindung zeigte. In dem in [D]-Chloroform aufgenommenen ^1H -NMR sind die Signale relativ breit und schlecht aufgelöst. Das entsprechende ^{13}C -NMR-Spektrum des Dendrons **40** in [D]-Chloroform zeigt eine interessante Duplizierung einiger Kohlenstoffsignale, während die Signale in $[\text{D}_6]$ -DMF als Lösungsmittel nicht aufgespalten sind (Abb. 26). Bei den duplizierten Signalen handelt es sich um die drei Methylenkohlenstoffe 8, 9 und 10 sowie den Arylkohlenstoff 4 und das Carbonylkohlenstoffatom 3. Dies könnte für die Ausbildung einer asymmetrischen Wasserstoffbrückenbindung sprechen, die das Dendron in Lösungsmitteln wie Chloroform oder DCM in einer stabilen Konformation hält und somit eine chemisch nicht mehr äquivalente Umgebung für einige charakteristische Kohlenstoffatome bedingt.

Die Verseifung des geschützten Dendrons **40** gelang wie bei den vergleichbaren Aminosäure-terminierten Dendren **32a-c** bei $50\text{ }^\circ\text{C}$ mit wässriger KOH in einer Methanol/Tetrahydrofuran (THF)/Wasser-Mischung. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde die Säure **41** mittels TBTU in den entsprechenden Aktivester überführt, der mit dem Kern-Hydrochlorid **5** das D/L-2,3-Diaminopropionsäure-terminierte G1-Dendrimer **42** ergab (vgl. Schema 17). Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnten immer noch Reste von DMF in der Probe nachgewiesen werden. Auch wiederholtes Lösen des Dendrimers in Methanol und Destillation des Lösungsmittels mit anschließenden langen Trocknungsperioden im Hochvakuum reichten nicht aus, um verbleibendes DMF vollständig aus der Probe zu entfernen. Daher konnte für dieses Dendrimer nur eine hochaufgelöste Masse und keine Elementaranalyse



Schema 17: Konvergente Synthesestrategie zum D/L-2,3-Diaminopropionsäure-terminierten G1-Dendrimer 43.

erhalten werden. Abb. 27 zeigt die isotopenaufgelösten $[M+\text{Na}]^+$ - und $[M+\text{K}]^+$ -Signale des MALDI-TOF-Massenspektrums von Dendrimer **42** sowie sein analytisches RP-HPLC-Eluogramm. Die Reinheit des Dendrimers wurde mittels UV-Detektion bei 254 nm und anschließender Integration bestimmt und betrug 98.3 % nach „Flash“-Säulenchromatographie über Kieselgel. Wie das kleine G₀-Dendrimer **38** und die Vorläufer-Dendren **40** und **41** zeigte auch Dendrimer **42** eine starke Neigung zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Im Gegen-

satz zum Dendron **40** wurde hier mittels NMR-Spektroskopie jedoch kein Hinweis auf eine stabile bevorzugte Konformation gefunden. In jedem Fall mußten bei allen Umsetzungen polare

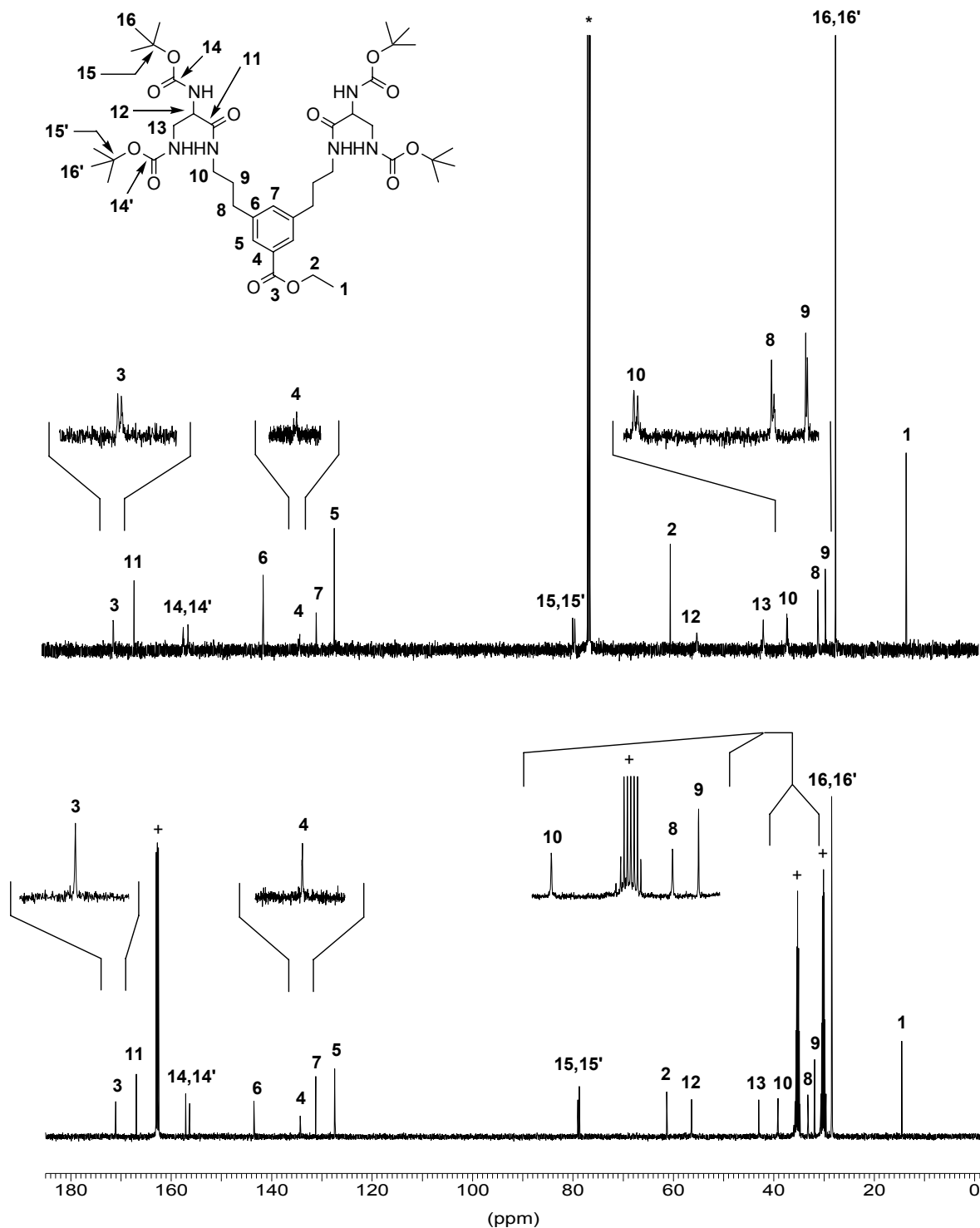


Abb. 26: Vergleichende Darstellung der ^{13}C -NMR-Spektren (126 MHz) des Boc-geschützten D/L-2,3-Diaminopropionsäure-Dendrons **37** in $[\text{D}]\text{-CHCl}_3$ (oben) und in $[\text{D}_6]\text{-DMF}$ (unten). (*) = Chloroform, (+) = DMF.

Lösungsmittel wie DMF oder Methanol zugegeben werden, um die Diaminopropionsäure-modifizierten Dendren und Dendrimere vollständig zu lösen.

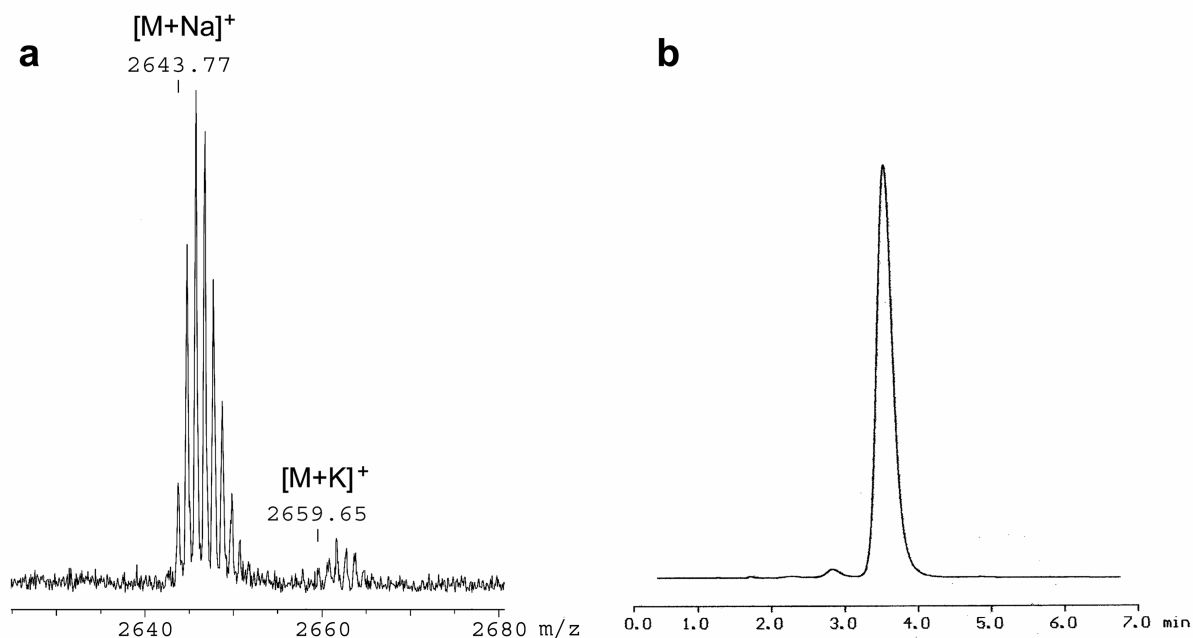


Abb. 27: (a) MALDI-TOF-Massenspektrum des Boc-geschützten D/L-2,3-Diaminopropionsäure-G1-Dendrimers **42** (Reflektor-Modus, *Matrix*: Dithranol). Aus dem gesamten Spektrum ist hier nur der vergrößerte Bereich der isotopenaufgelösten $[M+Na]^+$ - und $[M+K]^+$ -Signale gezeigt; Signale höherer Masse traten nicht auf. (b) Analytischer RP-HPLC-Lauf des Dendrimers **42** (*Eluent*: Methanol / H₂O (9 : 1 / v : v); *Flußrate*: 1 ml/min; Reinheit nach UV-Detektion (254 nm) und anschließender Integration: 98.3 %).

Die Umsetzung des Boc-geschützten Dendrimers **42** mit Trifluoressigsäure in DCM bei Raumtemperatur ergab analog zur Prozedur bei den Aminosäure-terminierten G1-Dendrimern **34a-c** das vollständig entschützte, wasserlösliche G1-Dendrimer **43** in einer quantitativen Umsetzung.

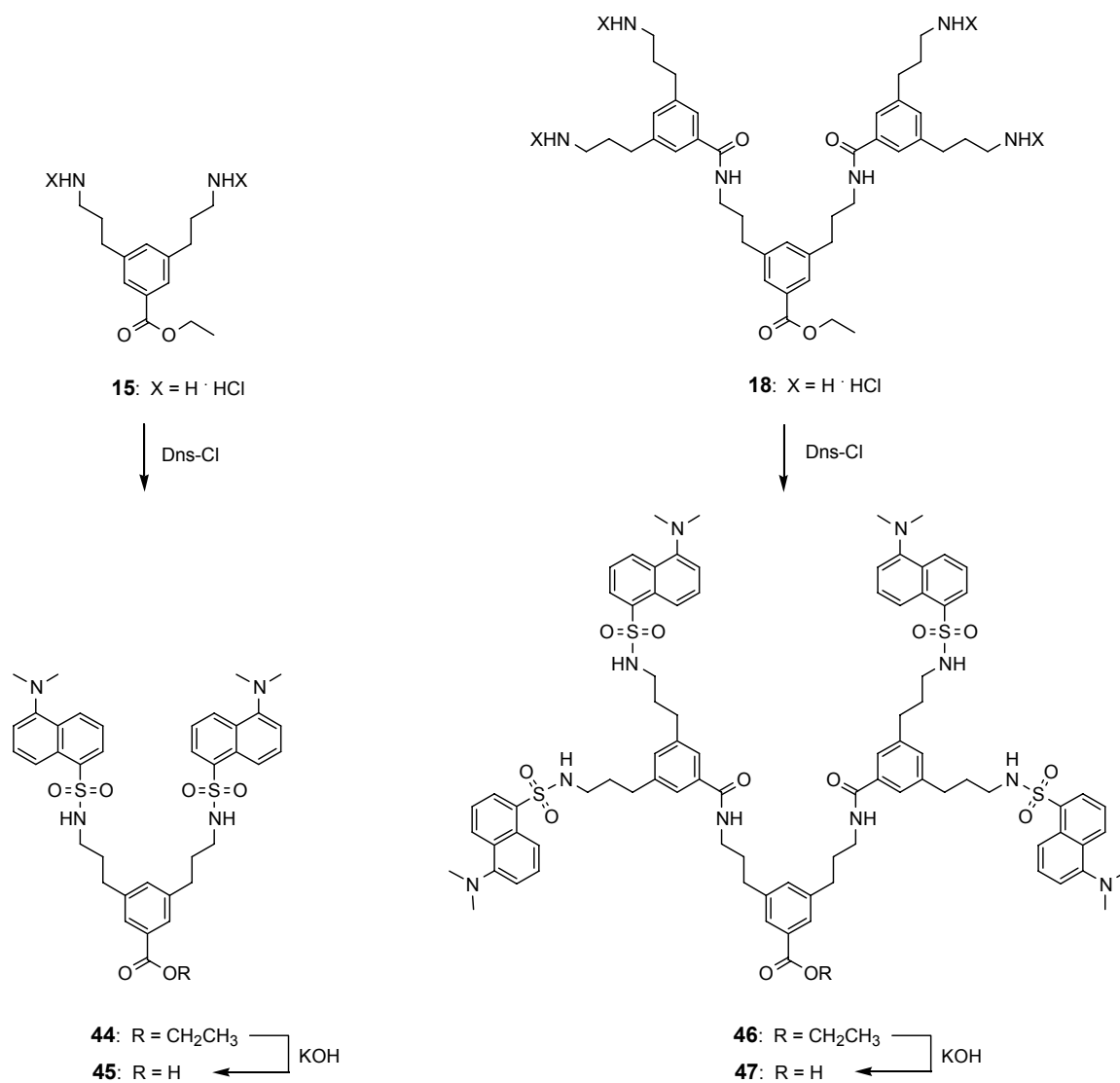
4.2.4 Dendrimere mit Fluoreszenzmarkern

Um das Verhalten der Dendrimere in Zellkultur und ihre Lokalisation nach eventueller Aufnahme in die Zelle bestimmen zu können, wurden Dendrimere synthetisiert, die in der Peripherie Fluoreszenzmarker tragen. Als Fluoreszenzmarker wurde die 5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonyl (Dansyl)-Gruppe gewählt.^[192] Sie erschien aufgrund ihrer hohen Fluoreszenzintensität und der Emission im grünen Spektralbereich zum Einsatz für die Zellaufnahmetests als besonders geeignet, da bei ähnlichen Wellenlängen auch viele der in Biologie und Medizin eingesetzten Proteinmarker wie Fluoresceinisothiocyanat (FITC)^[193], Fluorescamin^[194] und das 'Green Fluorescent Protein' (GFP)^[195] absorbieren und emittieren. Die entsprechenden Filter sind demnach standardmäßig in den meisten Fluoreszenzmikroskopen vorhanden. Weiterhin waren die erzeugten dansylierten Dendren und Dendrimere aufgrund der hohen Reaktivität des entsprechenden Sulfonsäurechlorides im Gramm-Maßstab zugänglich.

Neben Dansylchlorid wurde in ersten Versuchen auch Fluorescamin zur Markierung der Dendrimeroberflächen eingesetzt. Aufgrund des hohen Preises der Verbindung wurden die Umsetzungen nur qualitativ mittels Dünnschichtchromatographie über die Bildung von fluoreszierenden Produkten verfolgt. Die entsprechenden Dendrimere wurden dabei jedoch nie in Mengen erzeugt, die eine vollständige Charakterisierung erlaubt hätten.

4.2.4.1 Dansylierte Dendren

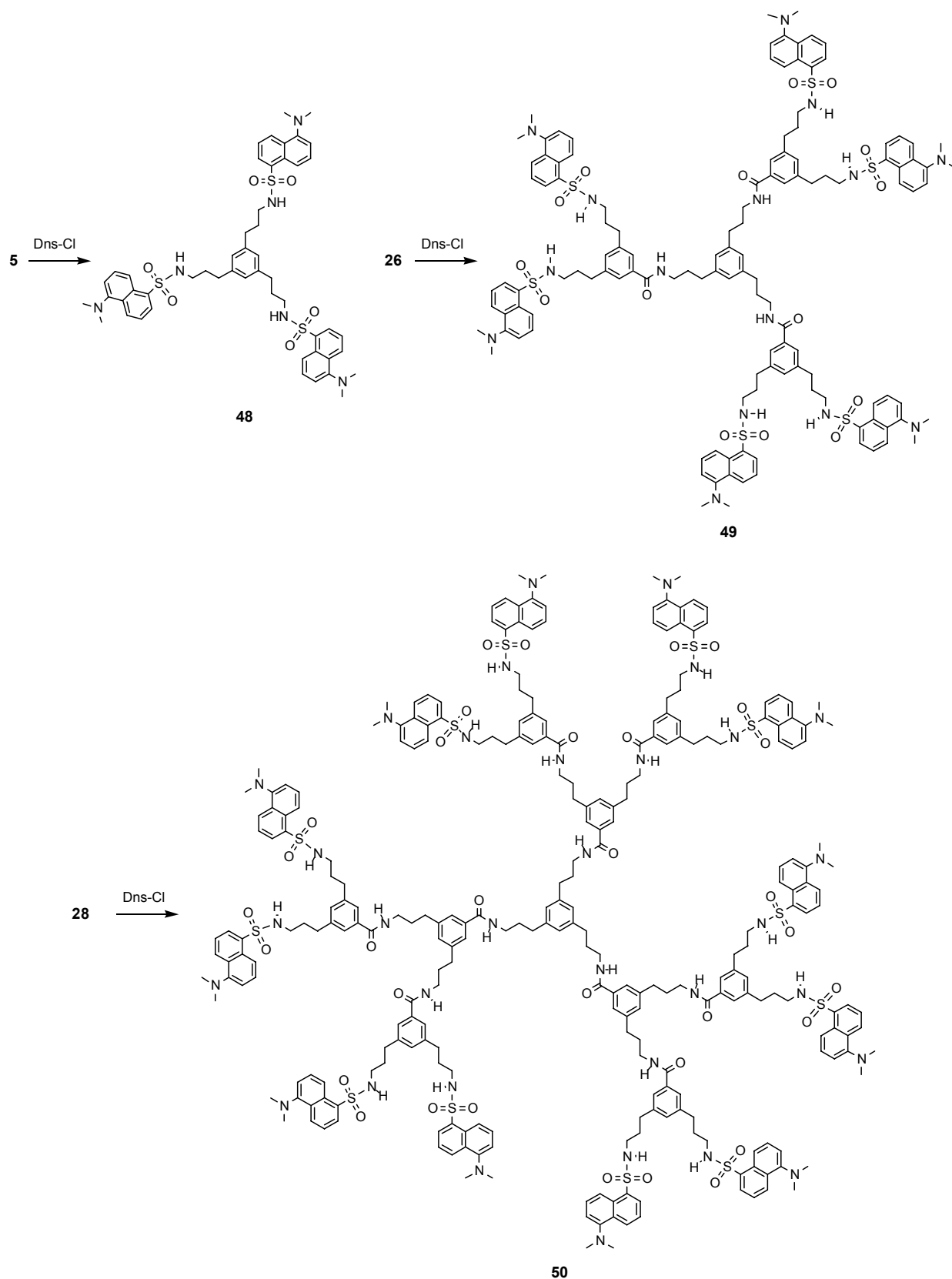
Die leicht zugänglichen Dendren **15** und **18** wurden in ersten Testreaktionen durch direkte Umsetzung mit einem 1,5 fachen Überschuß an Dansylchlorid pro Aminogruppe in die entsprechenden vollständig dansylierten Verbindungen **44** und **46** überführt (Schema 18). Dazu wurden die Salze der beiden Dendren zunächst in absolutem Methanol gelöst und anschließend unter Lichtausschluß langsam zu der vorgelegten Lösung von Dansylchlorid in wasserfreiem DCM getropft. Die Reaktion lief schon bei Raumtemperatur innerhalb von einer Stunde vollständig ab. Die Detektion der dansylierten Dendren gelang dabei sehr empfindlich mittels Dünnschichtchromatographie und anschließender Anregung bei 366 nm. Um zu testen, ob diese Bausteine für eine nachfolgende konvergente Dendrimersynthese geeignet sind, wurden die beiden dansylierten Dendren **44** und **46** unter Standardbedingungen bei 40 °C mit wässriger KOH in einem Lösungsmittelgemisch aus THF, Methanol und Wasser verseift. Unter den gewählten Bedingungen erwies sich die Dansylgruppe als stabil, und die dansylierten Säuren **45** und **47** konnten nach säulenchromatographischer Reinigung in Ausbeuten von 92 % im Falle des G1-Dendrons **45** und 85 % für das G2-Dendron **47** erhalten werden.



Schema 18: Synthese der dansylierten Dendren 45 und 47 als fluoreszenzmarkierte Bausteine für einen konvergenten Dendrimeraufbau.

4.2.4.2 Dansylierte Dendrimere

Analog der Prozedur zur Synthese der beiden dansylierten Dendren **45** und **47** wurden in einer divergenten Syntheseroute sowohl das Kernmolekül **5** als auch die beiden Dendrimere **26** und **28** mit einem Überschuß von 1.5 - 3 Äquivalenten Dansylchlorid pro Aminogruppe dansyliert (Schema 19). Im Gegensatz zu der von *Vögtle et al.* publizierte Synthesestrategie zur Dansylierung ihrer Poly(propylenamin)- und Polylysin-Dendrimere^[196] verliefen hier die Reaktionen sehr schnell und waren in den meisten Fällen auch schon bei Raumtemperatur innerhalb von einer Stunde beendet (DC-kontrolliert). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von *Bartzatt*, der ebenfalls die vollständige Umsetzung von primären und sekundären Aminen mit Dansylchlorid in wässriger Na₂CO₃-Pufferlösung innerhalb von einer Stunde beschrieb.^[197]



Schema 19: Synthese der drei vollständig dansylierten Dendrimere **48**, **49** und **50** durch direkte Umsetzung der entschützten Dendrimere **5**, **26** und **28** mit Dansylchlorid.

Die drei dansylierten Dendrimere **48**, **49** und **50** konnten nach säulenchromatographischer Aufreinigung in Ausbeuten von 65 - 92 % erhalten werden. Die Abtrennung von nicht vollständig dansylierten Dendrimeren mittels Säulenchromatographie über Kieselgel gestaltete sich aufgrund ihrer deutlich höheren Polarität als einfach, so daß die vollständig fluoreszenzmarkierten Dendrimere in hoher Reinheit isoliert werden konnten. Der Grad der Dansylierung konnte nachfolgend mittels NMR-Spektroskopie zu mehr als 95 % bestimmt werden. Abb. 28 zeigt exemplarisch das ^1H -NMR-Spektrum des vollständig dansylierten und aus Dioxan gefriergetrockneten G1-Dendrimers **49** bei 50 °C in $[\text{D}]\text{-Chloroform}$.

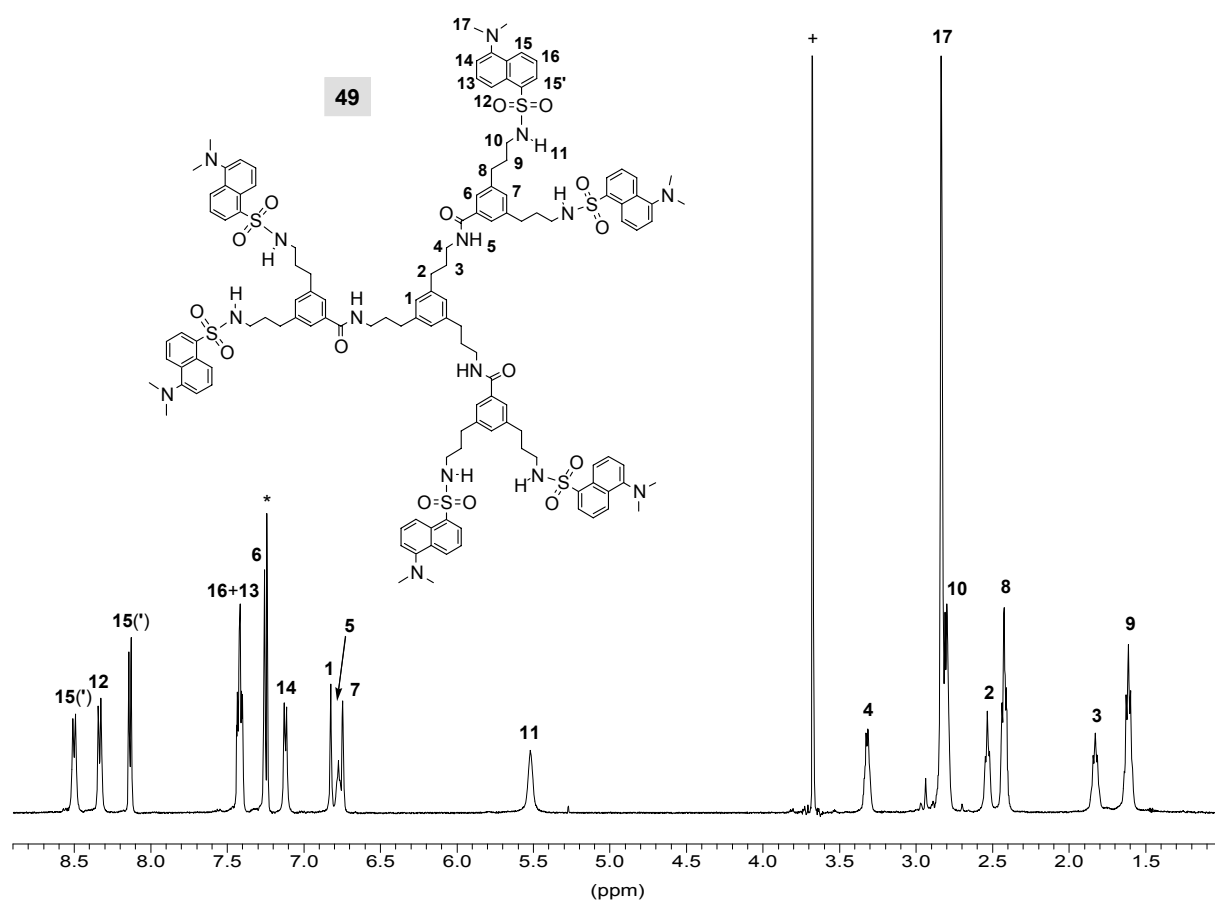


Abb. 28: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) des vollständig dansylierten G1-Dendrimers **49** bei 50 °C in $[\text{D}]\text{-Chloroform}$. (*) = Chloroform, (+) = Dioxan.

Von allen drei Dendrimeren konnten auch MALDI-TOF-Massenspektren erhalten werden. Diese zeigten neben den $[\text{M}+\text{H}]^+$ -, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ - und $[\text{M}+\text{K}]^+$ -Signalen noch ein weiteres Signal mit einer Masse $[\text{M}-234]^+$, was der Abspaltung oder dem Fehlen einer Dansylgruppe entspricht. Die beiden MALDI-TOF-Massenspektren der Dendrimere **49** und **50** sind in den Abb. 29 und 30 gezeigt.

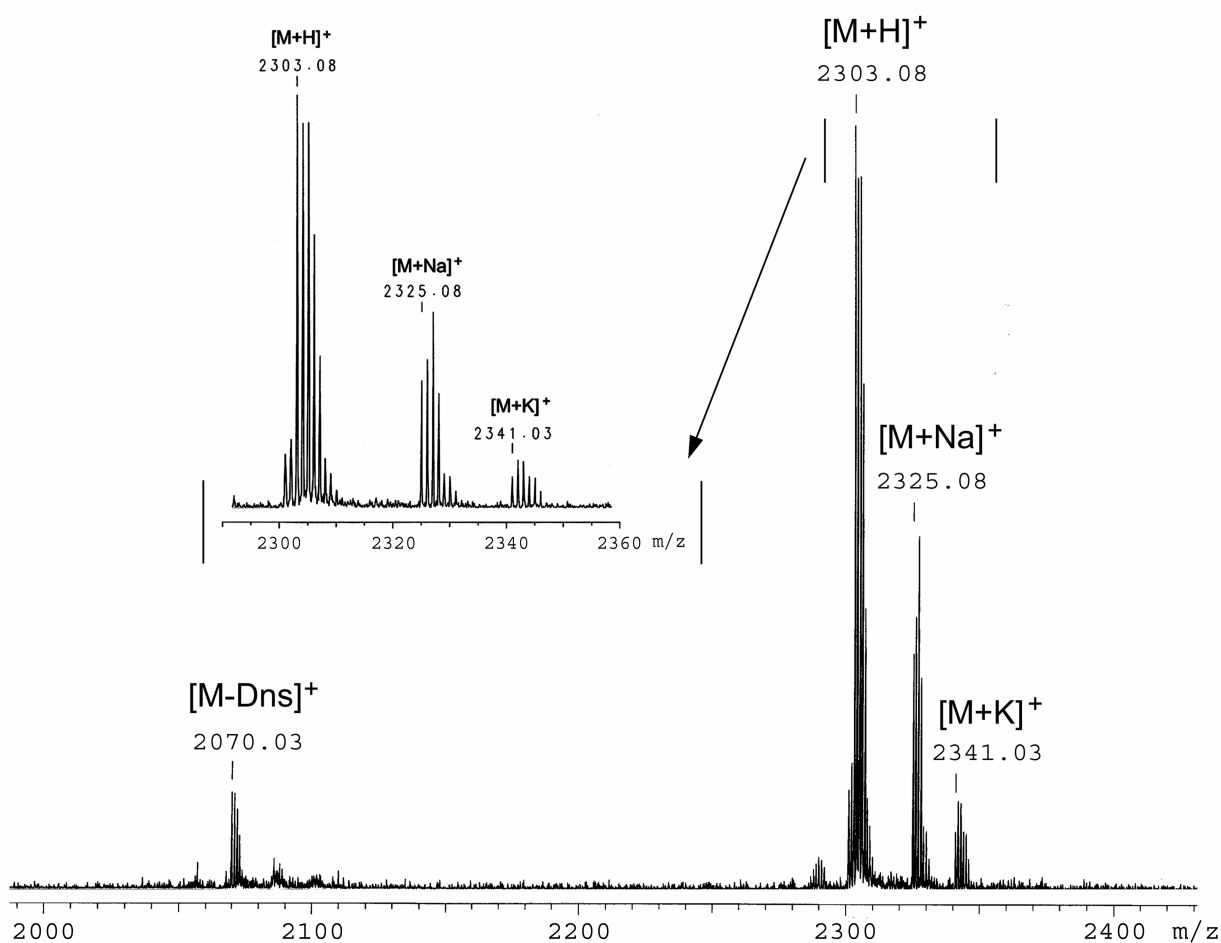


Abb. 29: MALDI-TOF-Massenspektren des vollständig dansylierten G1-Dendrimers **49** (Reflektor-Modus, *Matrix*: Dithranol). Vergrößert gezeigt ist die Region der isotopenaufgelösten [M+H]⁺-, [M+Na]⁺- und [M+K]⁺-Signale.

Aufgrund der geringen Empfindlichkeit der NMR-Messungen kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß zu einem geringen Anteil (< 5 %) auch unvollständig dansylierte Dendrimere in den Proben vorlagen. Es erscheint jedoch wahrscheinlicher, daß die Dansylgruppe erst während der Aufnahme der MALDI-TOF-Massenspektren vom Dendrimer abgelöst wurde, da sich ein solches „defektes“ Dendrimer aufgrund der Empfindlichkeit der UV-Detektion schon mittels Dünnschichtchromatographie leicht hätte nachweisen lassen sollen. Ähnlich wie bei den hier untersuchten dansylierten Dendrimern **48**, **49** und **50** detektierten auch *Vögtle* und Mitarbeiter die Abspaltung von bis zu drei Dansylgruppen bei der Aufnahme der MALDI-TOF-Massenspektren ihrer dansylierten Poly(propylenamin)-Dendrimere.^[198] Die Autoren vermuteten, daß die Fragmentierung durch die Einstrahlung des Laserlichtes bei der Aufnahme der MALDI-TOF-Massenspektren verursacht wurde, dessen Wellenlänge ($\lambda = 337$ nm) zufällig mit

dem Absorptionsmaximum des Dansylamid-Chromophors übereinstimmt. Weiterhin fanden sie, daß die relative Intensität der Fragmentensignale mit steigender Laserintensität zunahm. Eine Laser-induzierte Anregung des Dansylchromophors und das daraus folgende Aufbrechen der Sulfonamid-Bindung schien den Autoren dementsprechend wahrscheinlich zu sein.^[198]

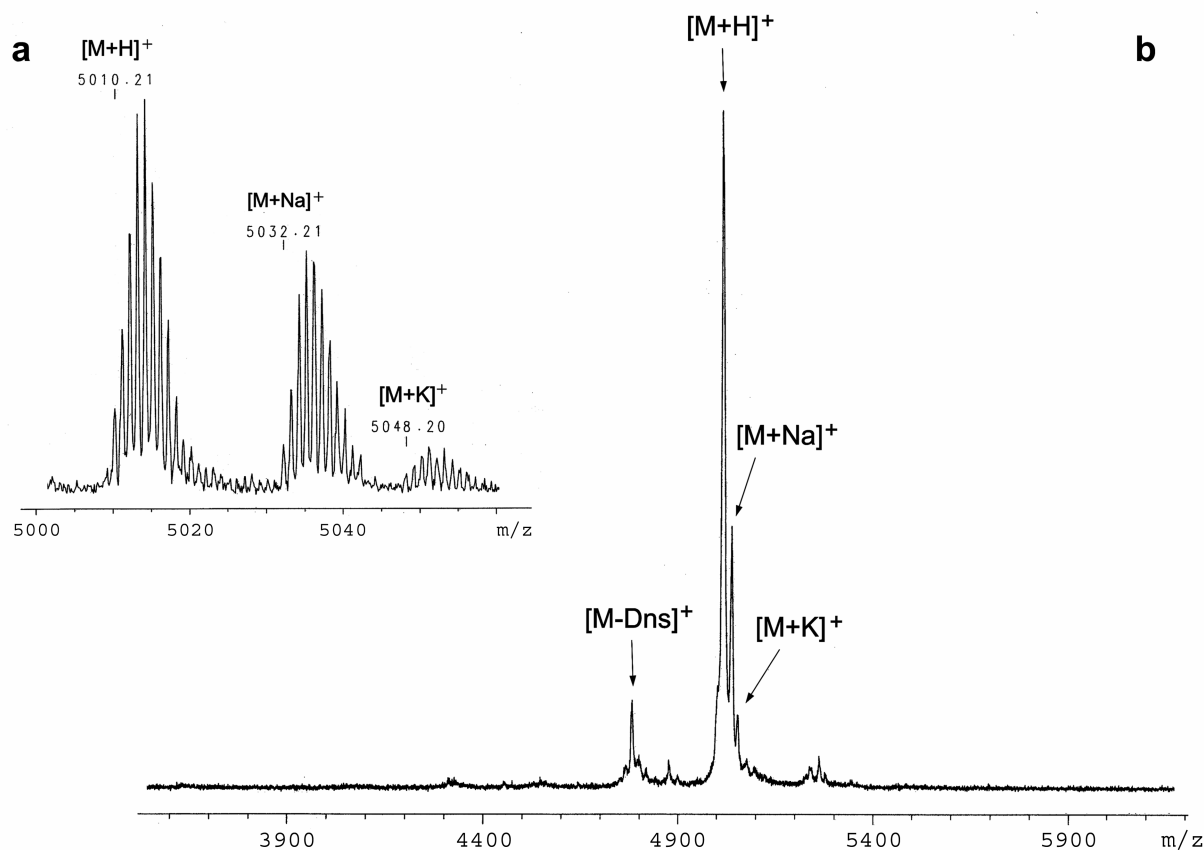


Abb. 30: MALDI-TOF-Massenspektrum des vollständig dansylierten G2-Dendrimers **50** (*Matrix*: Dithranol): (a) gesamtes Spektrum (linearer Modus); (b) vergrößerte Region der isotopenaufgelösten [M+H]⁺, [M+Na]⁺ und [M+K]⁺-Signale (Reflektor-Modus).

4.2.4.3 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der dansylierten Dendrimere

In Ethanol als Lösungsmittel zeigen die drei Dendrimere **48**, **49** und **50** intensive Absorptionsbanden (Abb. 31a) im nahe-ultravioletten Spektralbereich ($\lambda_{\text{max}} = 254$ und 338 - 345 nm) analog der von *Vögtle et al.* vermessenen dansylierten Polylysin- und Poly(propylenamin)-Dendrimere.^[196] Die intensiven, breiten Fluoreszenzbanden der drei Dendrimere weisen ein Maximum bei 510 - 528 nm in sichtbaren grünen Spektralbereich auf (Abb. 31b). Damit entsprechen sowohl die Absorptions- als auch die Fluoreszenzdaten den bekannten Werten für Dendrimere, die die Dansylgruppe als Chromophor tragen.^{[196], [199]} Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_f

der drei Dendrimere wurde nicht bestimmt. Dennoch zeigt Abb. 31b klar, daß die Fluoreszenzintensität mit steigender Anzahl der am Dendrimer befindlichen Dansylgruppen zunimmt.

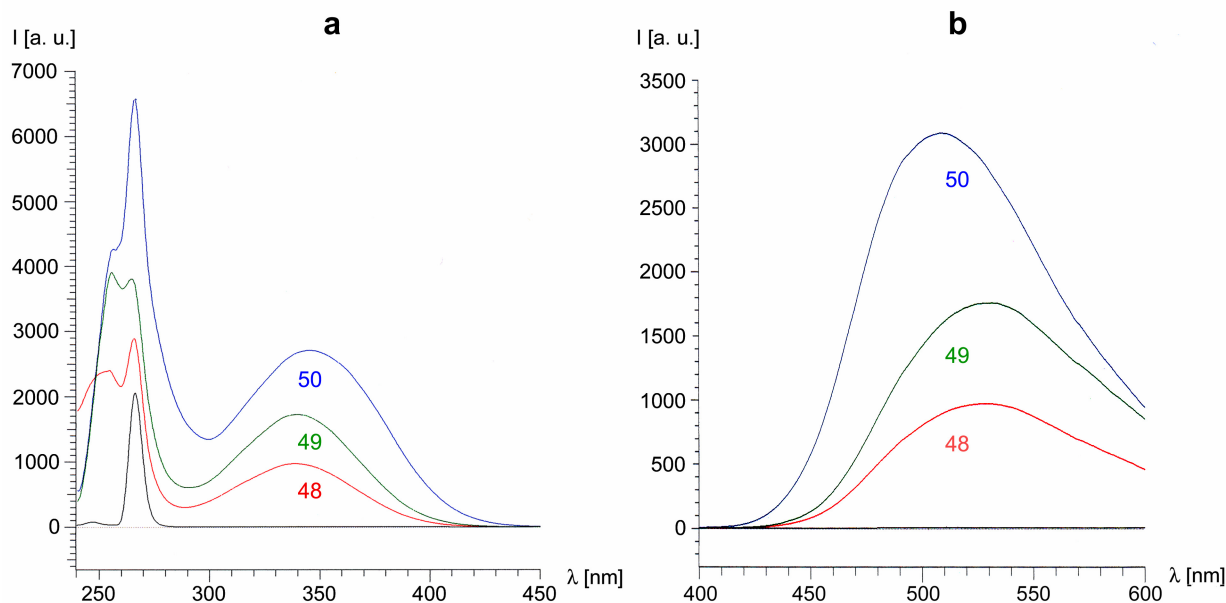


Abb. 31: Absorptions- (a) und Fluoreszenzspektren (b) der drei Dendrimere 48, 49 und 50 in Ethanol: (— = Ethanol, — = Dendrimer 48, — = Dendrimer 49, — = Dendrimer 50). Die Konzentration der Dendrimere betrug 0,5 μ M; die Emissionsspektren wurden durch Anregung bei 340 nm erhalten.

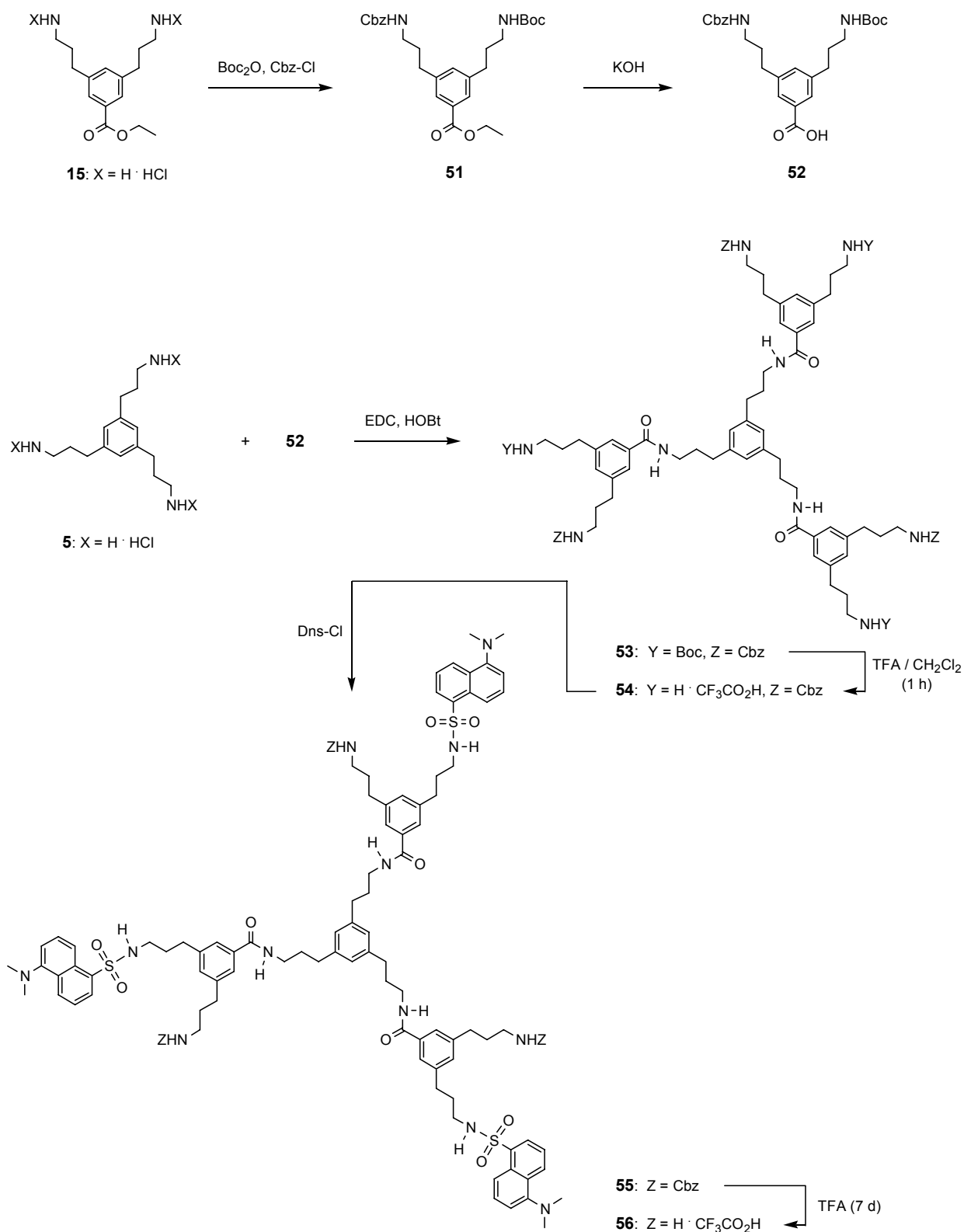
Aus den gut untersuchten fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften der Dansylgruppe ist bekannt, daß dieses Fluorophor eine deutliche Solvatochromie zeigt.^[200] So verursachen polare Lösungsmittel eine relativ große Rotverschiebung in den Fluoreszenzspektren dieser Verbindungen. Ebenso wird die Fluoreszenzbande der Dansylgruppe in polaren Lösungsmitteln deutlich breiter.^[200] Auch bei den hier untersuchten dansylierten Dendrimern **48**, **49** und **50** konnte der beschriebene Effekt der Rotverschiebung in polaren Lösungsmitteln qualitativ beobachtet werden. Fluoreszieren die Verbindungen in relativ unpolaren Solventien wie Dichlormethan oder Chloroform noch deutlich blaugrün, so erhalten sie in Methanol oder Ethanol schon eine stärker gelbgrüne Färbung. Durch die Breite der Fluoreszenzbande konnte in den nachfolgenden Zellverteilungsstudien (vgl. Kap. 4.4) die Detektion am Fluoreszenzmikroskop problemlos mit den Standard-Grünfiltern in ausreichender Sensitivität erfolgen.

4.2.5 „Gemischte“ Dendrimere mit zwei funktionellen Gruppen

Neben den vollständig dansylierten Dendrimeren des Kapitels 4.2.4 war es weiterhin wünschenswert Dendrimere zu erhalten, die neben einer Fluoreszenzmarkierung noch eine zweite funktionalisierbare Gruppe zur Anbindung von Cytostatika aufweisen. Weiterhin besaßen vor allem die beiden größeren in Kap. 4.2.4.2 vorgestellten dansylierten Dendrimere **49** und **50** eine relativ schlechte Wasserlöslichkeit, was ihren Einsatz in Zellkultur erschwerte. Es war daher naheliegend Dendrimere synthetisch zugänglich zu machen, die neben der Fluoreszenzmarkierung noch eine zweite, löslichkeitsvermittelnde und weiter funktionalisierbare Gruppe tragen. Dazu wurde im folgenden eine synthetische Route über den orthogonal Amin-geschützten Dendron-Baustein **51** eingeschlagen (Schema 20). Diese Synthesestrategie unterscheidet sich deutlich von der direkten Sulfonamid-Derivatisierung, wie sie beispielsweise von *Vögtle* und Mitarbeitern^[192c] zur Markierung ihrer lichtsammelnden Dendrimere mit verschiedenen chromophoren Gruppen eingesetzt wurde, und ist im folgenden Kapitel näher beschrieben.

4.2.5.1 Dansylierte Dendrimere mit freien Aminen

Als Schlüsselkomponente in der Syntheseroute zu Dendrimeren mit zwei funktionellen Gruppen diente die orthogonal geschützte Verzweigungseinheit **51**. Diese wurde analog einer bekannten Eintopfreaktion^[201] in einem synthetischen Schritt mit annähernd statistischer Verteilung neben den beiden einheitlich Boc- oder Benzyloxycarbonyl (Cbz)-geschützten Dendren in Ausbeuten von 35 % nach säulenchromatographischer Aufreinigung erhalten (Schema 20). Die anschließende Verseifung zur freien Carbonsäure **52** gelang ebenfalls glatt unter Standardbedingungen mit KOH in einer Lösungsmittelmischung aus Methanol und Wasser bei 50 °C über eine Dauer von 12 Stunden. Der konvergente Aufbau zum orthogonal geschützten G1-Dendrimer **53** erfolgte bei -20 °C mit EDC und HOBt in absolutem Dichlormethan und ergab das Produkt nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 63 %. Abb. 32 zeigt exemplarisch das 500 MHz ¹H-NMR-Spektrum des orthogonal geschützten G1-Dendrimers **53**. Man erkennt, daß sowohl die den Aminogruppen benachbarten Methylenprotonen der Propylamin-Arme der Dendren als auch die beiden aromatische Protonen aufgrund des unterschiedlichen Substitutionsmusters der Verzweigungseinheit in getrennte Signale aufspalten und bei unterschiedlichen ppm-Werten erscheinen. Die nachfolgende Entschützung mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan verlief problemlos zum partiell entschützten Dendrimer **54**. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur durchgeführt und genau nach einer Stunde abgebrochen und aufgearbeitet, um neben der



Schema 20: Synthesesequenz zum wasserlöslichen, dansylierten G1-Dendrimer **56** mit freien, protonierten Aminen.

erwünschten Boc-Entschützung eine Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe zu vermeiden. Dennoch zeigten sich im NMR-Spektrum des Produktes immer geringe Spuren von auch partiell Cbz-

entschütztem Dendrimer. Dies konnte auch durch eine Verkürzung der Reaktionszeit nicht vollständig unterdrückt werden, jedoch führte dies zu einer unvollständigen Abspaltung der Boc-Schutzgruppe. Eine Reaktionsdauer von einer Stunde erwies sich demzufolge als optimal zur Gewährleistung einer vollständigen Boc-Entschützung. Der kleine Anteil von ebenfalls Cbz-entschütztem Dendrimer konnte in dem darauf folgenden Dansylierungsschritt aufgrund der sehr unterschiedlichen R_f -Werte der teildansylierten Dendrimere mittels Säulenchromatographie leicht vom nur Boc-entschützten Dendrimer abgetrennt werden und stellte somit kein weiteres Problem dar. Insgesamt verlief in diesem Schritt die Fluoreszenzmarkierung mit Dansylchlorid wie auch bei der Synthese der vollständig dansylierten Dendrimere **48**, **49** und **50** nahezu quantitativ und mit sehr guten Ausbeuten von 99 % nach säulenchromatographischer Aufreinigung.

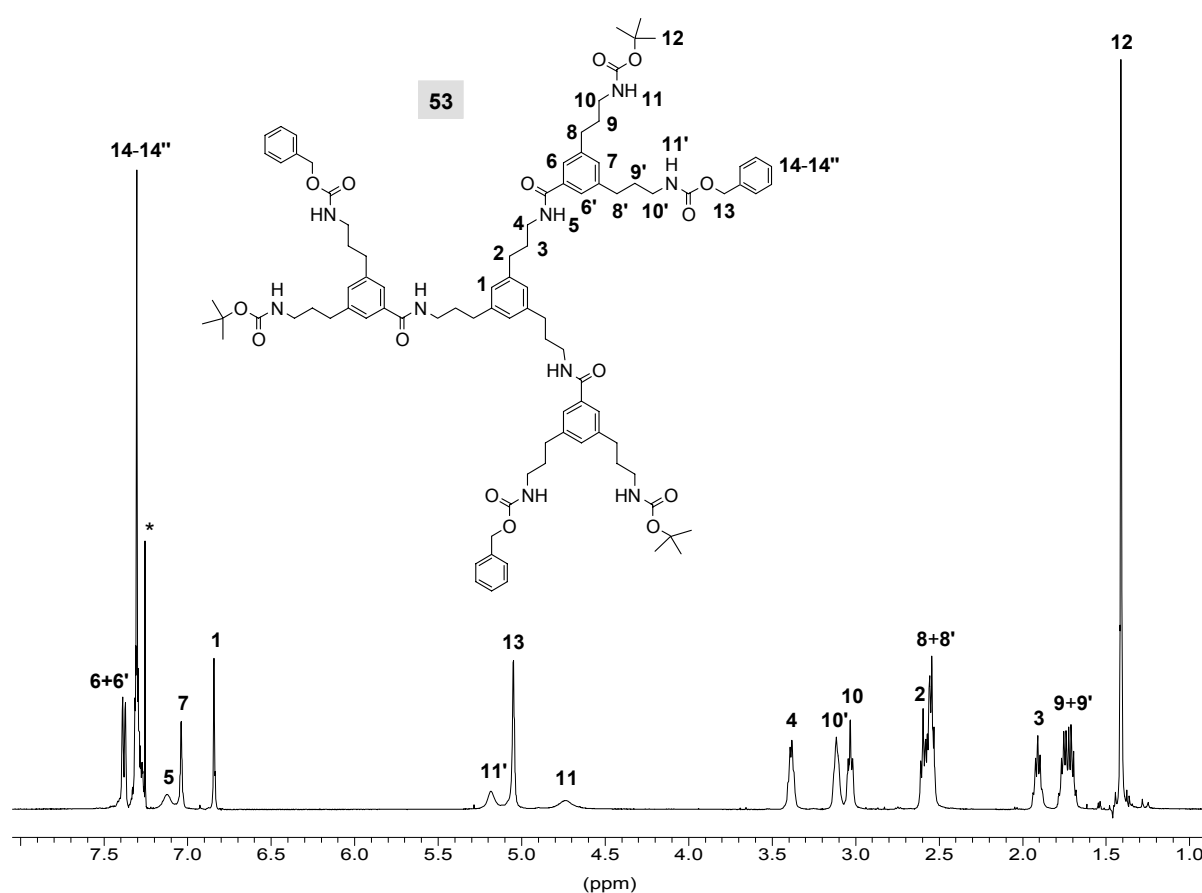


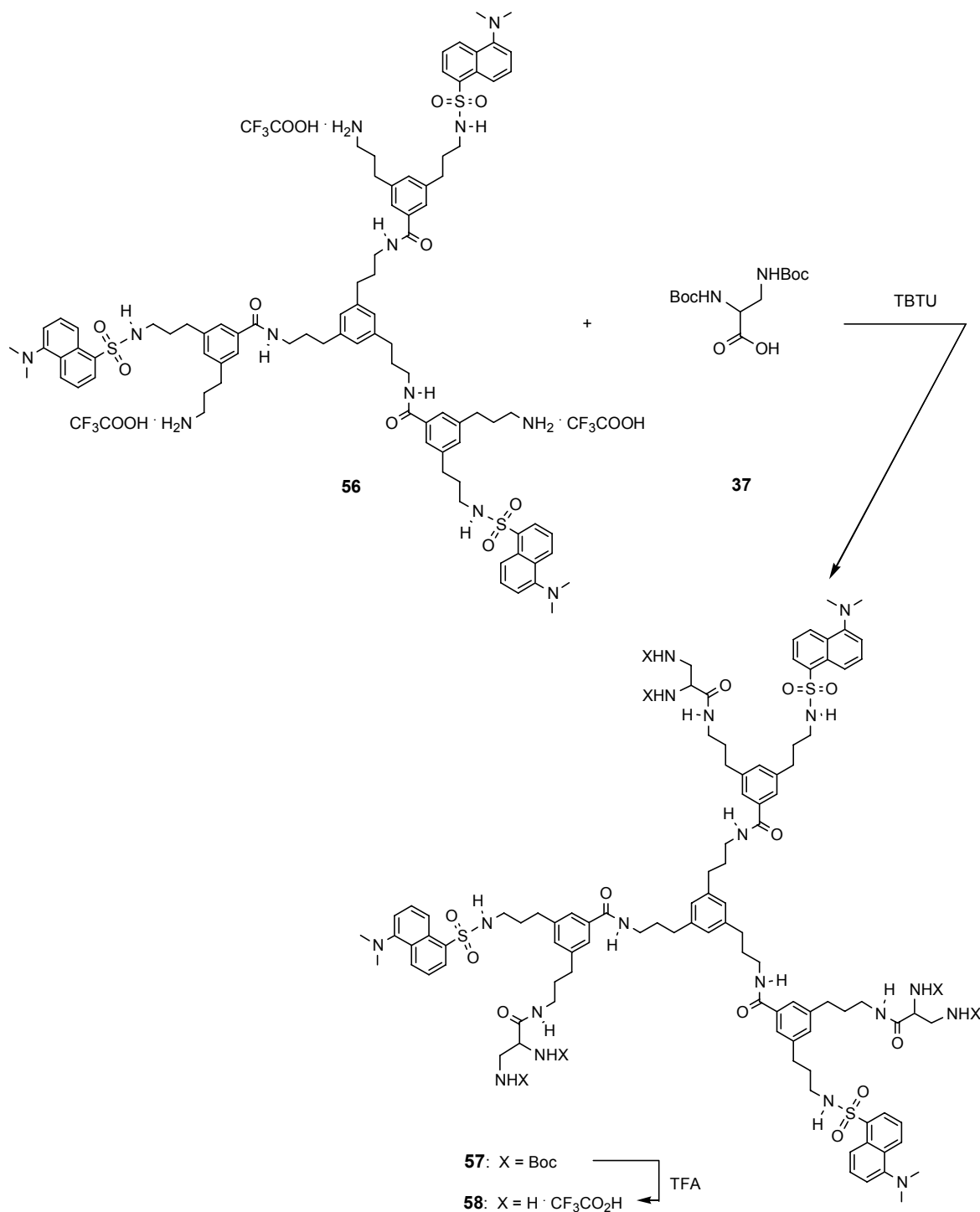
Abb. 32: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) des gemischt Boc- und Cbz-geschützten G1-Dendrimers **53** in $[\text{D}]-\text{Chloroform}$. (*) = Chloroform.

Bei der nachfolgenden Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe erwies sich das Dansyl-Fluorophor als stabil sowohl unter den Bedingungen einer katalytischen Hydrierung als auch über eine längere Periode in reiner TFA. Zunächst wurde versucht, die Cbz-Schutzgruppe wie allgemein üblich

unter Zugabe von Palladium auf Aktivkohle zu hydrieren.^[202] Diese Versuche führten jedoch auch in verschiedenen Lösungsmitteln und Lösungsmittelmischungen (Methanol, Ethanol, Ethylacetat) und bei unterschiedlich langen Hydrierungsdauern, -temperaturen und H₂-Partialdrücken allesamt nicht zum Erfolg. Die Abspaltung der Cbz-Gruppe zum wasserlöslichen, teildansylierten Dendrimer **56** gelang erst unter extremen Entschützungsbedingungen in reiner Trifluoressigsäure über eine Dauer von sieben Tagen. Während der gesamten Zeit wurde der Fortschritt der Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Trotz wiederholter Entschützungszyklen mit reiner Trifluoressigsäure konnten häufig auch noch nach sieben Tagen Reaktionszeit mittels 126 MHz ¹³C-NMR-Untersuchungen Reste von nicht vollständig entschütztem Dendrimer nachgewiesen werden. Als charakteristisch und empfindlich nachweisbar erwies sich dabei die Kohlenstoff-Resonanz der Cbz-Methylengruppe bei 65.2 ppm, die häufig noch als kleines Signal in den entschützten Proben detektiert werden konnte. Die Entschützungen wurden daraufhin in reiner TFA so lange wiederholt, bis dieses charakteristische Signal nicht mehr nachweisbar war.

4.2.5.2 *Dansylierte Dendrimere mit Ethylendiamin-Liganden*

Ausgehend vom entschützten, teildansylierten Dendrimer **56** wurde in einer „attach-to“-Route der Boc-geschützte D/L-2,3-Diaminopropionsäure-Baustein **37** analog der bereits in Kap. 4.2.3 beschriebenen Amidbindungsknüpfungs-Reaktionen mit TBTU in einer Lösungsmittelmischung aus DCM und DMF an die freien Aminogruppen des Dendrimers angebunden. Wässrige Aufarbeitung und anschließende säulenchromatographische Reinigung ergaben das „gemischte“ 2,3-D/L-Diaminopropionsäure- und Dansylgruppen tragende Dendrimer **57** in einer mäßigen isolierten Ausbeute von 33 % als gelbgrünen Feststoff nach Gefriertrocknung aus Dioxan (Schema 21). Die Löslichkeit des „gemischten“ Dendrimers **57** in relativ unpolaren, aprotischen Lösungsmitteln wie DCM war mäßig bis schlecht. Vollständig gelöst werden konnte das Dendrimer nur durch Zugabe von polaren Lösungsmitteln wie Methanol oder DMF, die dessen Neigung zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen entgegenwirkten. Die schlechte Löslichkeit von **57** in den gängigen organischen Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen erschwerte die säulenchromatographische Aufreinigung und ist vermutlich für die mäßigen bis schlechten isolierten Ausbeuten nach säulenchromatographischer Trennung über Kieselgel verantwortlich. Die anschließende Entschützung von **57** gelang problemlos und quantitativ unter



Schema 21: Synthese des dansylierten G1-Dendrimers **58** mit Ethylendiamin-Liganden ausgehend vom 2,3-D/L-Diaminopropionsäurebaustein **37** über eine Aktivierungssequenz mit TBTU zur Amidbindungsknüpfung und nachfolgender Entschützung.

Standardbedingungen mit TFA in DCM bei Raumtemperatur innerhalb von einer Stunde. Das entschützte, D/L-2,3-Diaminopropionsäure- und Dansyl-terminierte Dendrimer **58** konnte nach Gefriertrocknung aus Wasser als hellgrüner Feststoff erhalten werden. Dendrimer **58** zeigte sich nach optischer Beurteilung vollständig löslich in Methanol und destilliertem Wasser, jedoch

verursachte es in „Phosphate Buffered Saline“ (PBS)- und anderen Pufferlösungen sofort eine Trübung der Lösung. Diese Aggregate, die vermutlich aus dem protonierten Dendrimer mit Phosphat als Gegenion gebildet wurden, waren nur durch kurze Ultraschallbehandlung wieder in Lösung zu bringen. Abb. 33 zeigt vergleichend die 500 MHz ^1H -NMR-Spektren des fluoreszenzmarkierten, entschützten Dendrimers **58** mit Ethylendiamin-Liganden und dessen Boc-geschütztem Vorläufer **57**.

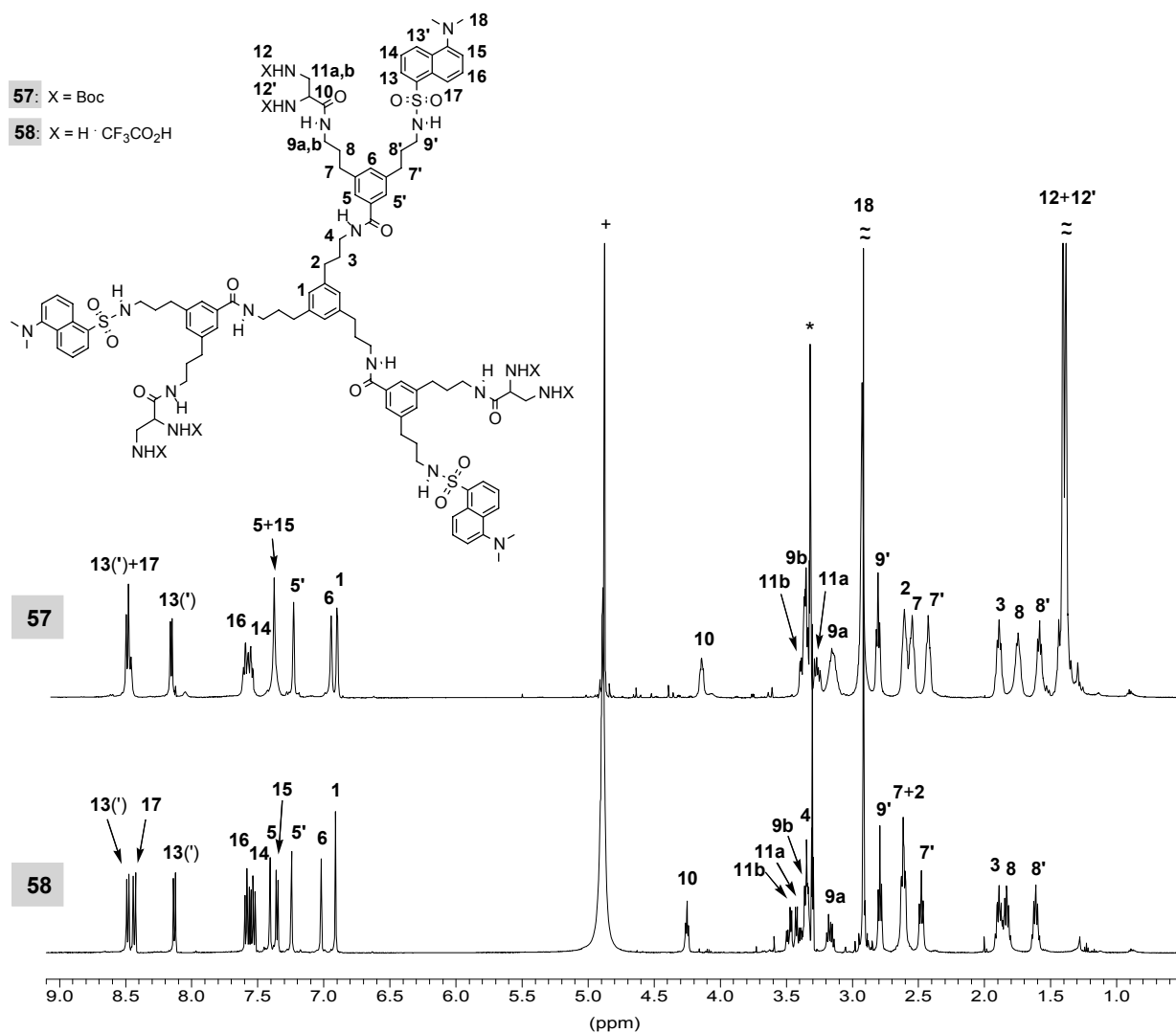


Abb. 33: Vergleichende Darstellung der ^1H -NMR-Spektren (500 MHz) des Boc-geschützten, D/L-2,3-Diaminopropionsäure- und Dansyl-terminierten Dendrimers **57** (oben) und des entschützten Produktes **58** (unten) in $[\text{D}_4]$ -Methanol. (*) = Methanol, (+) = H_2O .

Die breiten, relativ schlecht aufgelösten Signale der Methylengruppen der Dendron-„Arme“ und der aromatischen Dansyl-Protonen beim Spektrum des geschützten Dendrimers **57** sind durch die schlechte Löslichkeit des Dendrimers in reinem Methanol verursacht. Dagegen sind alle

Signale des entschützten Dendrimer-Analogons **58** in $[D_4]$ -Methanol scharf und gut aufgelöst. In beiden Spektren erscheinen die Methylenprotonen der verschieden substituierten Dendron-„Arme“ als getrennte Signale mit deutlich unterschiedlichen chemischen Verschiebungen, wie dies auch schon beim orthogonal geschützten Vorläufer **53** der Fall war.

4.2.5.3 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen der „gemischt“-dansylierten Dendrimere

Analog der vollständig dansylierten Dendrimere des Kapitels 4.2.4 zeigen auch die „gemischt“-dansylierten Dendrimere **55 - 58** die typischen Absorptionsbanden im nahe-ultravioletten Spektralbereich bei $\lambda_{\max(1)} = 250 - 254 \text{ nm}$ und $\lambda_{\max(2)} = 338 - 340 \text{ nm}$ (Abb. 34a). Das Maximum der breiten Fluoreszenzbande nach Anregung bei 340 nm liegt sowohl bei den entschützten als auch bei den Boc-geschützten Dendrimeren ebenfalls bei 527 - 531 nm (Abb. 34b).

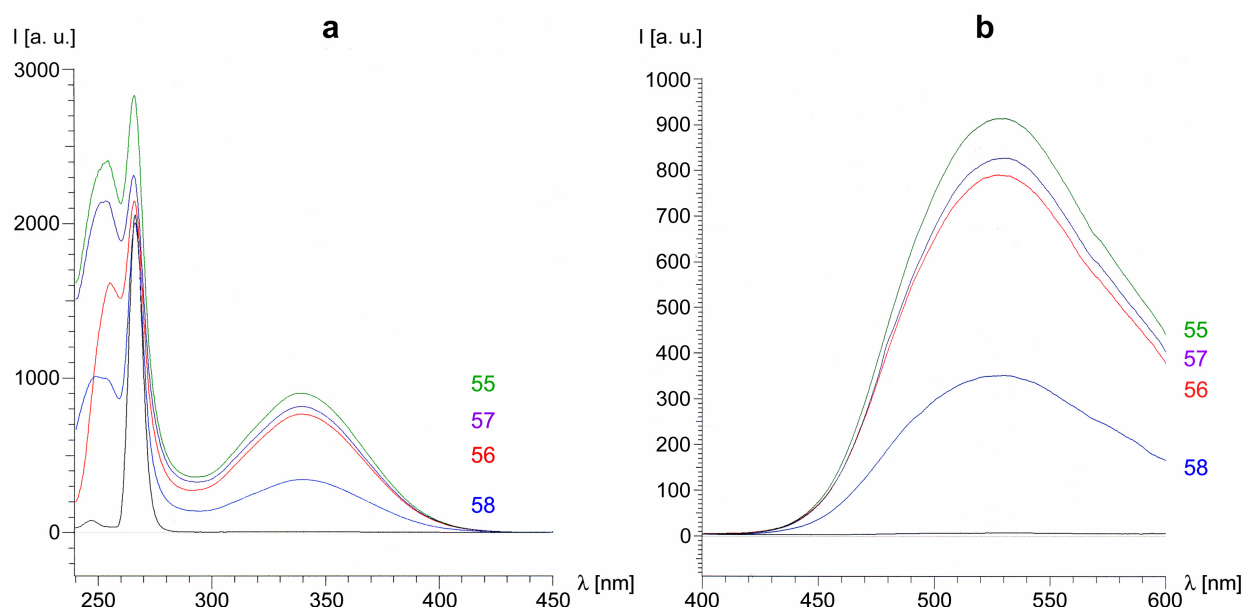


Abb. 34: Absorptions- (a) und Fluoreszenzspektren (b) der beiden Boc-geschützten, „gemischt“-dansylierten Dendrimere **55** und **57** und der beiden vollständig entschützten Analoga **56** und **58** und in Ethanol: (— = Ethanol, — = Dendrimer **55**, — = Dendrimer **56**, — = Dendrimer **57**, — = Dendrimer **58**). Die Konzentration der Dendrimere betrug $0,5 \mu\text{M}$; die Emissionsspektren wurden durch Anregung bei 340 nm erhalten.

Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_f wurde auch bei diesen Verbindungen nicht bestimmt, jedoch entspricht die Fluoreszenzintensität der drei „gemischt“-dansylierten Dendrimere **55**, **56** und **57** in etwa der Intensität, die für das vollständig dansylierte G0-Dendrimer **48** mit der gleichen Anzahl an Dansylgruppen gemessen wurde (vgl. Abb. 31). Auffällig ist allein die deutlich

geringere Fluoreszenzintensität des entschützten, D/L-2,3-Diaminopropionsäure-terminierten Dendrimers **58**, das weniger als halb so intensiv fluoresziert als das vergleichbare, ebenfalls entschützte Dendrimer **56**. Dies kann zum einen durch die unterschiedliche Polarität der beiden Verbindungen verursacht sein. So konnten auch *Kaifer* und *Bright* an ihren wasserlöslichen, am Fokalkpunkt einfach dansylierten Dendrimern zeigen, daß die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_f der Moleküle in wässrigen Pufferlösungen mit steigender Dendrimergeneration zunahm.^[199] Die Autoren führten diesen Effekt auf die größere effektive Hydrophobizität in unmittelbarer Umgebung des Dansylrestes bei höheren Dendrimergenerationen zurück. Eine weitere Ursache für die Unterschiede in den beobachteten Fluoreszenzintensitäten könnte die vermutete unterschiedliche Basizität der Propylamine des Dendrimers **56** im Vergleich zu den Diaminopropionsäure-Gruppen des Dendrimers **58** sein. Es ist bekannt, daß die Absorptions- und Emissionseigenschaften der Dansylgruppe sehr empfindlich auf die Zugabe von Säure reagieren.^{[196a], [203]} Mit der Protonierung der tertiären Aminogruppe des Dansylfluorophors geht allgemein auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität einher. So beschreiben *Vögtle et al.* bei der Titration ihrer vollständig dansylierten Poly(propylenimin)- und Polylysin-Dendrimere mit Trifluormethansulfonsäure ein vollständiges Verschwinden der intensiven Fluoreszenzbande bei $\lambda_{\max} = 514$ nm im Verlaufe der Titration.^{[196a], [196c]} Parallel dazu tauchte eine wesentlich schwächere Fluoreszenzbande bei $\lambda_{\max} = 336$ nm und einer deutlich kürzeren Halbwertszeit auf. Weiterhin zeigte das vollständig dansylierte G5-Dendrimer einen besonders drastischen Abfall in der Fluoreszenzintensität bei 514 nm, wenn in der Titration Trifluormethansulfonsäure durch Trifluoressigsäure ersetzt wurde.^[196a] Lösungen, die partiell protonierte Dendrimere enthielten, wiesen darüber hinaus eine multiexponentielle Fluoreszenzabnahme im Vergleich zu den nicht protonierten Dendrimern auf.^[196a] Eine schwächere Basizität der Aminogruppen der D/L-2,3-Diaminopropionsäure könnte folglich eine teilweise Protonierung der Dansylgruppe bewirken, was die Abnahme der Fluoreszenzintensität beim „gemischten“ Dendrimer **58** erklären würde.

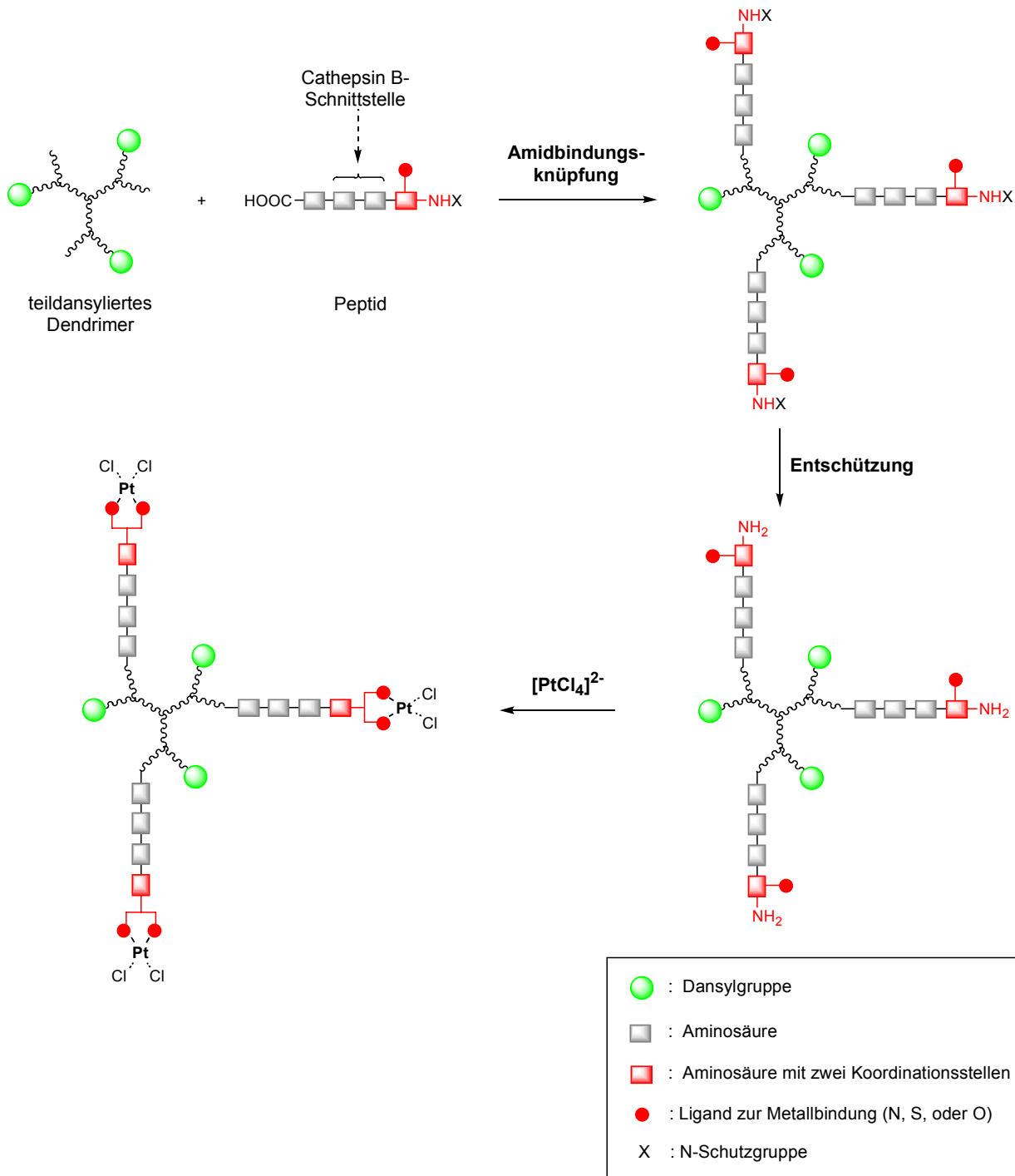
4.2.6 Peptid-tragende Dendrimere mit einer Cathepsin B-Schnittstelle

Die fluoreszenzmarkierten Dendrimere des Kapitels 4.2.5 mit D/L-2,3-Diaminopropionsäure als Ligand zur Pt^{2+} -Komplexierung können prinzipiell anticarcinogen wirksames Platin binden und ebenfalls nach Aufnahme in Tumorzellen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie in diesen lokalisiert werden. Was durch diese Dendrimere ist allerdings nicht gewährleistet ist, ist eine selektive Freisetzung der Platinkomplexe in den Tumorzellen. Um dies zu erreichen, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein an die Dendrimeroberfläche anbindbarer „Spacer“ synthetisiert werden, der die gebundenen Metallkomplexe selektiv in Tumorzellen freisetzen kann und somit deren gezielte Bindung an die Tumorzell-DNA sicherstellt.

Der vorgeschlagene Inkorporationsweg für Dendrimere und/oder Dendrimer-Cytostatika-Konjugate verläuft über die gezielte Aufnahme der Dendrimere mittels Endocytose in eukaryotische Zellen.^{[100c], [113]} Zunächst befinden sich die aufgenommenen Dendrimere in kleinen, membranumschlossenen und mit Clathrin umhüllten Vesikeln, den sogenannten „coated pits“. Nach dem Abbau der Clathrinhülle werden diese dann zu Endosomen. Diese fusionieren daraufhin mit Lysosomen, membranumschlossenen Organellen mit einem Durchmesser von etwa 1 μm , die sich im Cytoplasma jeder eukaryotischen Zelle befinden. Dieser Vorgang entspricht dem normalen intrazellulären Verteilungs- und Verdauungsweg in der Zelle. Lysosomen dienen der Zelle zum Abbau und zur Wiederverwertung von komplexen Molekülen, die durch Endocytose in die Zelle gelangt sind. Sie enthalten dementsprechend Enzyme, die Proteine, Polysaccharide, Nucleinsäuren und Lipide abbauen können. Durch eine ATP-getriebene Protonenpumpe in der Lysosomenmembran ist der pH-Wert in den Lysosomen ($\text{pH} \leq 5$) deutlich niedriger als der im Cytoplasma ($\text{pH} \approx 7$).^[204] Daraus folgt, daß ein „Spacer“ für eine gezielte Cytostatikum-Freisetzung in diesen Lysosomen entweder eine säurelabile Schnittstelle aufweisen oder enzymatisch spaltbar sein muß.

Es ist bekannt, daß aufgrund der erhöhten Stoffwechsellätigkeit von Tumorzellen, die sie zur Invasion und Metastase befähigt, einige spezifische Enzyme in Krebszellen überexprimiert sind. Dazu gehören unter anderem die Protein-abbauenden Cathepsine.^[112b] Cathepsine sind lysosomale Cysteinproteasen aus der Papain-Familie, die entsprechend dem Milieu in den Lysosomen ihr Aktivitätsoptimum bei leicht sauren pH-Werten haben.^[112a] Eine wichtige Rolle im Prozeß des Tumorwachstums, der Tumordinvasion und der Metastase spielt insbesondere die Endopeptidase Cathepsin B. Diese Protease wird vermehrt von malignen und metastasierenden Tumoren gebildet.^{[205], [206]} Mittlerweile ist ein enger Zusammenhang zwischen der Cathepsin B-Aktivität und dem metastatischen Potential einiger Tumore bekannt^[206], auf dem bereits einige

Assays zum Hinweis auf potentielle Krebswucherungen im Organismus beruhen. Insbesondere weist dabei eine erhöhte Cathepsin B-Konzentration und -Aktivität auf das Vorliegen eines metastasierenden Tumors hin. Die erhöhte Cathepsin B-Aktivität in Tumorgewebe kann man sich nun zum Design eines selektiv spaltbaren „Spacers“ zur gezielten Wirkstofffreisetzung in Krebszellen zunutze machen.



Schema 22: Synthesestrategie zur Darstellung der teildansylierten Peptidodendrimere mit potentieller Cathepsin B-Schnittstelle und N-terminalen Liganden zur Pt²⁺-Komplexierung.

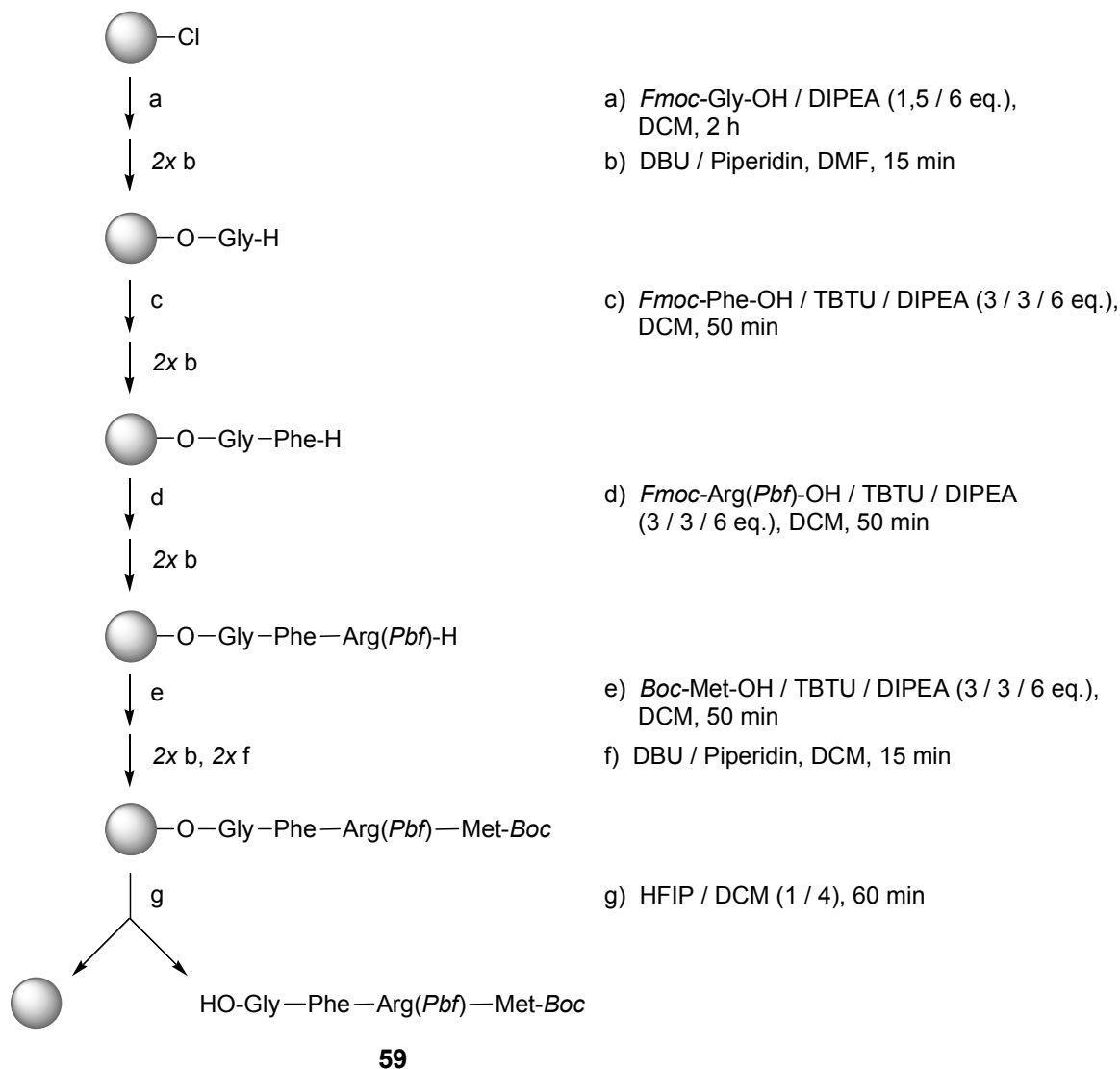
Für das „Spacer“-Molekül, über das die cytostatisch wirksamen Platinkomplexe an das zuvor synthetisierte Dendrimer **56** (s. Kap. 4.2.5.1) angebracht werden sollten, wurde im folgenden ein Peptid-„Spacer“ mit einer Cathepsin B-Schnittstelle ausgewählt. Die in Krebszellen überexprimierte Protease Cathepsin B sollte dann in der Lage sein, die gebundenen Platinkomplexe selektiv in den Tumorzellen freizusetzen. So wurde zum einen ein Tetrapeptid-„Spacer“ mit einem N-terminalen Methionin als zweizähnigem Liganden zur Pt^{2+} -Komplexierung und zum anderen ein Pentapeptid-„Spacer“ mit einer N-terminalen D/L-2,3-Diaminopropionsäure mittels manueller Festphasen-Peptidsynthese dargestellt (siehe Kap. 4.2.6.1). Über die Carboxy-Termini der Peptide sollte die Anbindung der Peptid-„Spacer“ an die freien Aminogruppen der Dendrimere erfolgen, wobei die Methoden der klassischen Peptidsynthese Anwendung finden sollten. Die Synthesestrategie zur Darstellung der teildansylierten, Ligand-tragenden Peptidodendrimere mit Cathepsin B-Schnittstelle ist in Schema 22 schematisch gezeigt.

4.2.6.1 Auswahl und Synthese der Peptide

Cathepsin B wirkt als Endopeptidase mit einer relativ breiten Spezifität bei deutlicher Bevorzugung von basischen Aminosäureresten oder Phenylalanin neben einer basischen Aminosäure wie z. B. Arginin.^{[207], [208]} Beispielsweise konnte gezeigt werden, daß das synthetische Hexapeptid H-Leu-Trp-Met-Arg-Phe-Ala-OH von Cathepsin B in die beiden Fragmente H-Leu-Trp-Met-Arg-OH und H-Phe-Ala-OH zerlegt wird.^[208] Daher wurde im folgenden für die Synthese der Peptid-„Spacer“ mit Cathepsin B-Schnittstelle die Aminosäureabfolge H-Arg-Phe-Gly-OH ausgewählt. Am Aminoterminus sollte sich zusätzlich noch eine Aminosäure mit chelatisierenden Gruppen zur Anbindung der anticarcinogen wirksamen Pt^{2+} -Metallkationen befinden. Zu diesem Zweck wurde zum einen die natürliche Aminosäure L-Methionin und zum anderen die bereits zuvor eingesetzte Aminosäure D/L-2,3-Diaminopropionsäure verwendet.

Die Synthese des gewünschten Tetrapeptides H-Met-Arg-Phe-Gly-OH mit aminoterminalem L-Methionin wurde mittels manueller Festphasensynthese am hoch säurelabilen *o*-Chlortrityl-Harz (Barlos Harz)^[209] durchgeführt, bei dem die Abspaltung eines geschützten Peptides vom Harz möglich ist. Dies war für die nachfolgenden Syntheseschritte essentiell, da anschließend die Anbindung des Peptides an das Dendrimer erfolgen mußte (vgl. Schema 22). Als Schutzgruppen wurden zum einen die Boc-Schutzgruppe zur Maskierung der Aminofunktion des L-Methionins und zum anderen die 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf)^[210]-Gruppe zur Schützung der Arginin-Seitenkette ausgewählt, da beide Schutzgruppen unter den Bedingungen der Sheppard-Festphasensynthesestrategie^[185] (vgl.

Kap. 4.2.1.2) stabil sind, eine Abspaltung des geschützten Peptides vom hoch säurelabilen *o*-Chlortrityl-Harz möglich ist und sie nachfolgend in einem einzigen finalen Entschützungs-schritt mit TFA vom Peptidodendrimer abgespalten werden können. Schema 23 zeigt schematisch die Abfolge der synthetischen Schritte zum Aufbau des geschützten Tetrapeptides **59** am *o*-Chlortrityl-Harz.



Schema 23: Schematische Darstellung der Syntheseabfolge (manuelle Festphasensynthese) zum geschützten Tetrapeptid **59** mit potentieller Cathepsin B-Schnittstelle und N-terminalem L-Methionin am *o*-Chlortrityl-Harz (HFIP = 1,1,1,3,3,3,-Hexafluoroisopropanol).

Die Beladung des Harzes mit der C-terminalen Aminosäure Glycin erfolgte innerhalb von zwei Stunden durch Reaktion von *Fmoc*-Gly-OH mit dem *o*-Chlortrityl-Harz in Anwesenheit von DIPEA. Das „end-capping“ verbliebener reaktiver Gruppen am Harz wurde danach durch Zugabe von Methanol erreicht. Die anschließende *Fmoc*-Entschützung erfolgte für zweimal 15 Mi-

nuten mit einer Mischung aus gleichen Teilen 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) und Piperidin in DMF. Alle weiteren Aminosäure-Kupplungsschritte wurden analog der *Sheppard-Fmoc-Strategie*^[185] durch eine repetitive Synthesefolge beginnend mit der Anbindung der jeweiligen Fmoc-geschützten Aminosäure mit TBTU in Anwesenheit der nicht-nucleophilen Base DIPEA in DMF und anschließender Fmoc-Abspaltung mit DBU und Piperidin in DMF durchgeführt. Zwischen allen Amidbindungsknüpfungs- und Entschützungs-schritten wurde das Harz ausgiebig mit DMF und DCM, nach den Entschützungen auch jeweils dreimal mit Isopropanol gewaschen. Zur Reaktionskontrolle wurde nach jedem Syntheseschritt eine kleine Menge Harz entnommen, das Peptid mit TFA vom Harz abgespalten und das Rohprodukt mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. Die Abspaltung des Boc- und Pbf-geschützten Peptides vom *o*-Chlortrityl-Harz erfolgte am Ende der Synthesesequenz mit einer Mischung aus 1,1,1,3,3,3,-Hexafluoroisopropanol (HFIP) und DCM im Verhältnis 1 : 4 (v:v). Nach Abtrennung des Harzes durch Filtration wurde das Rohprodukt mittels RP-HPLC unter Verwendung eines linearen Laufmittelgradienten von 0 - 100 % Acetonitril in Wasser aufgereinigt. Es gelang allerdings nicht, das geschützte Tetrapeptid zu 100 % sauber zu erhalten. Auch nach wiederholten Aufreinigungsversuchen verblieb eine Fraktion mit geringfügig niedrigerer Polarität zu etwa 5 % in der Probe von **59** enthalten. Abb. 35 zeigt die analytischen RP-HPLC-Elugramme des geschützten Tetrapeptides vor und nach der präparativen RP-HPLC-Reinigung. Das geschützte, vom Harz abgespaltene Tetrapeptid wies eine mäßig gute Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln wie Acetonitril und Methanol auf. In weniger polaren Lösungsmitteln wie DCM oder Chloro-

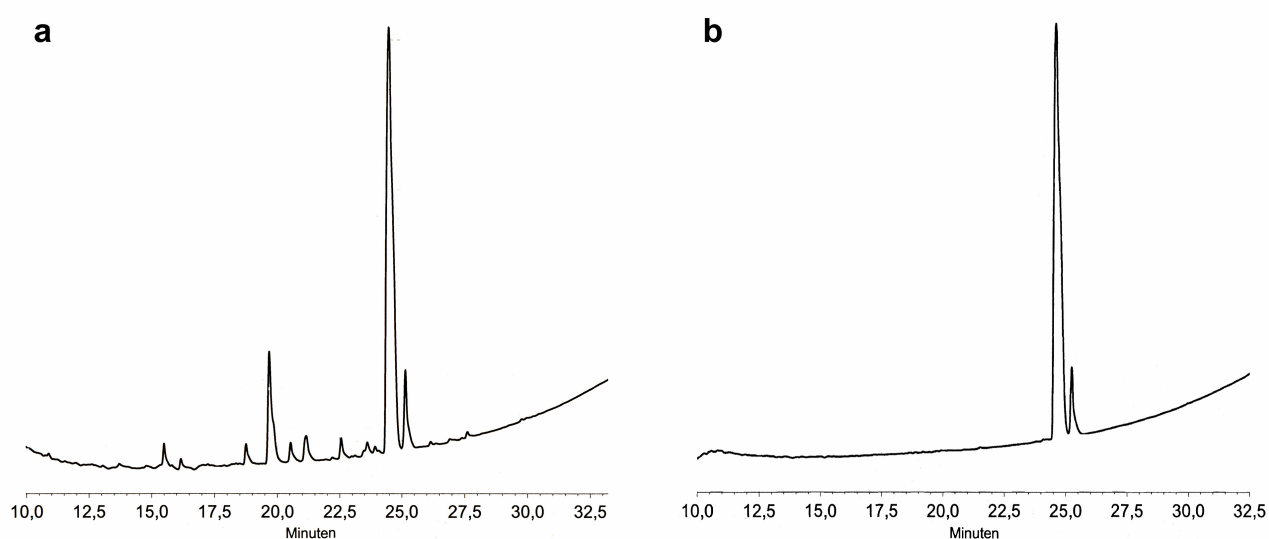


Abb. 35: Analytische RP-HPLC-Elugramme des geschützten Tetrapeptides **59**: (a) wie erhalten nach Abspaltung vom Harz und (b) erhalten nach präparativer RP-HPLC-Reinigung. *Eluent* (analytisches RP-HPLC-Eluogramm): linearer Gradient 0 - 100 % Acetonitril / Wasser in 30 min); *Flußrate*: 1 ml/min.

form neigte es darüber hinaus zur Aggregation, vermutlich durch die Ausbildung von relativ stabilen Wasserstoffbrückenbindungen.

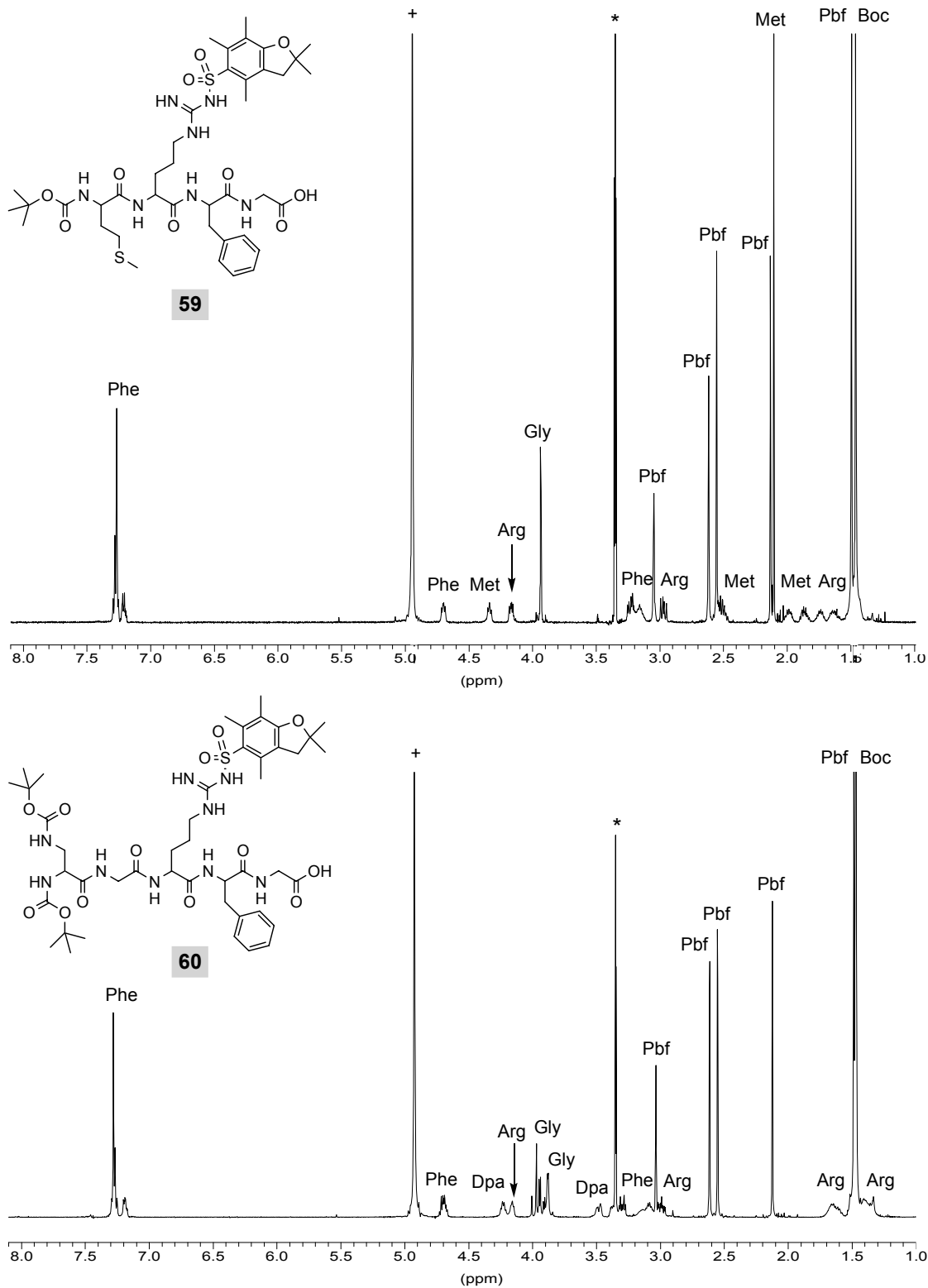


Abb. 36: Vergleichende Darstellung der ¹H-NMR-Spektren (500 MHz) des geschützten Tetrapeptides 59 (oben) und des geschützten Pentapeptides 60 (unten) in [D₄]-Methanol. (*) = Methanol, (+) = H₂O.

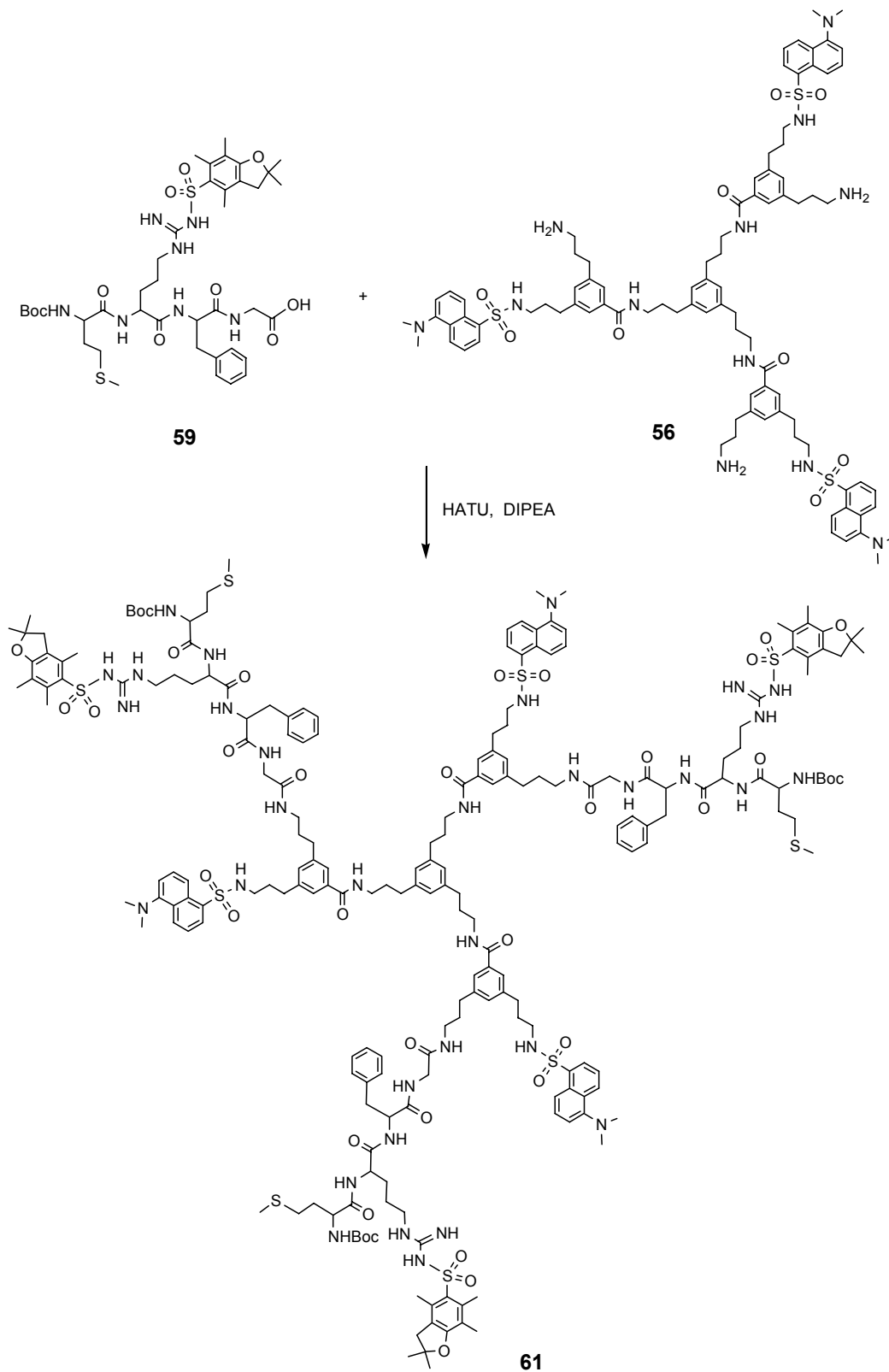
In einer analogen Festphasen-Synthesestrategie wurde ein weiteres Peptid synthetisiert^{XVIII}, das anstelle des L-Methionins den Boc-geschützten D/L-2,3-Diaminopropionsäurebaustein **37** als terminalen Chelatliganden trägt. Um einen genügend großen Abstand zur Cathepsin B-Erkennungssequenz zu gewährleisten, wurde hier zwischen den beiden Aminosäuren L-Arginin und der D/L-2,3-Diaminopropionsäure ein weiteres Glycin eingebaut. Im Unterschied zur vorherigen manuellen Synthese wurde die Aktivierung und Kupplung der Fmoc-geschützten Aminosäuren hier automatisiert und mit HBTU als Kupplungsreagenz durchgeführt. Die Anbindung der N-terminalen Aminosäure D/L-2,3-Diaminopropionsäure erfolgte schließlich manuell unter Verwendung von 2-(1*H*-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Tetrafluoroborat (TATU) in Gegenwart von DIPEA in DMF. Das resultierende Pentapeptid (Boc)₂-Dpa-Gly-Arg(*Pbf*)-Phe-Gly-OH **57** wurde analog zum geschützten Tetrapeptid **59** nach Abspaltung vom *o*-Chlortrityl-Harz mittels HFIP in DCM und anschließender präparativer RP-HPLC als farbloser Feststoff erhalten. Abb. 36 zeigt vergleichend die beiden ¹H-NMR-Spektren der aufgereinigten Peptide **59** und **60** in [D₄]-Methanol. Die entsprechenden FAB(+)-Massenspektren zeigen die [M+H]⁺- und [M+Na]⁺-Signale der beiden Verbindungen und belegen die Identität der synthetisierten Peptide. Beim Tetrapeptid **59** tauchen zusätzlich dazu noch Signale geringer Intensität mit der Masse [M+H+16] und [M+Na+16] auf, was zeigt, daß auch hier, ähnlich wie bereits beim L-Methionin-Dendrimer **34a** (vgl. Kap. 4.2.2.2), die Thioether-Liganden durch die Aufreinigungsprozedur zum Teil oxidiert wurden. Obwohl das Peptid während der gesamten Syntheseprozedur und auch, wann immer möglich und praktikabel, während der präparativen RP-HPLC unter Inertgas gehandhabt wurde, konnte die teilweise Oxidation des terminalen L-Methionins nicht vollständig verhindert werden. Die dadurch bedingte schlechte Löslichkeit ist vermutlich mit verantwortlich für die schlechteren Ausbeuten und die schwierige Handhabung im daran anschließenden Amidbindungs-knüpfungsschritt bei der Anbindung des Peptides an den Dendrimer-Grundkörper (siehe Kap. 4.2.6.2).

4.2.6.2 Dansylierte Dendrimere mit einer Cathepsin B-Schnittstelle

Zur Anbindung des geschützten Peptids **59** mit terminalem L-Methionin an das teildansylierte Dendrimer **56** wurde das Kupplungsreagenz HATU in Anwesenheit von DIPEA in DMF verwendet. Der bei 0 °C erzeugte Aktivester des Peptides wurde anschließend bei tiefen Tempe-

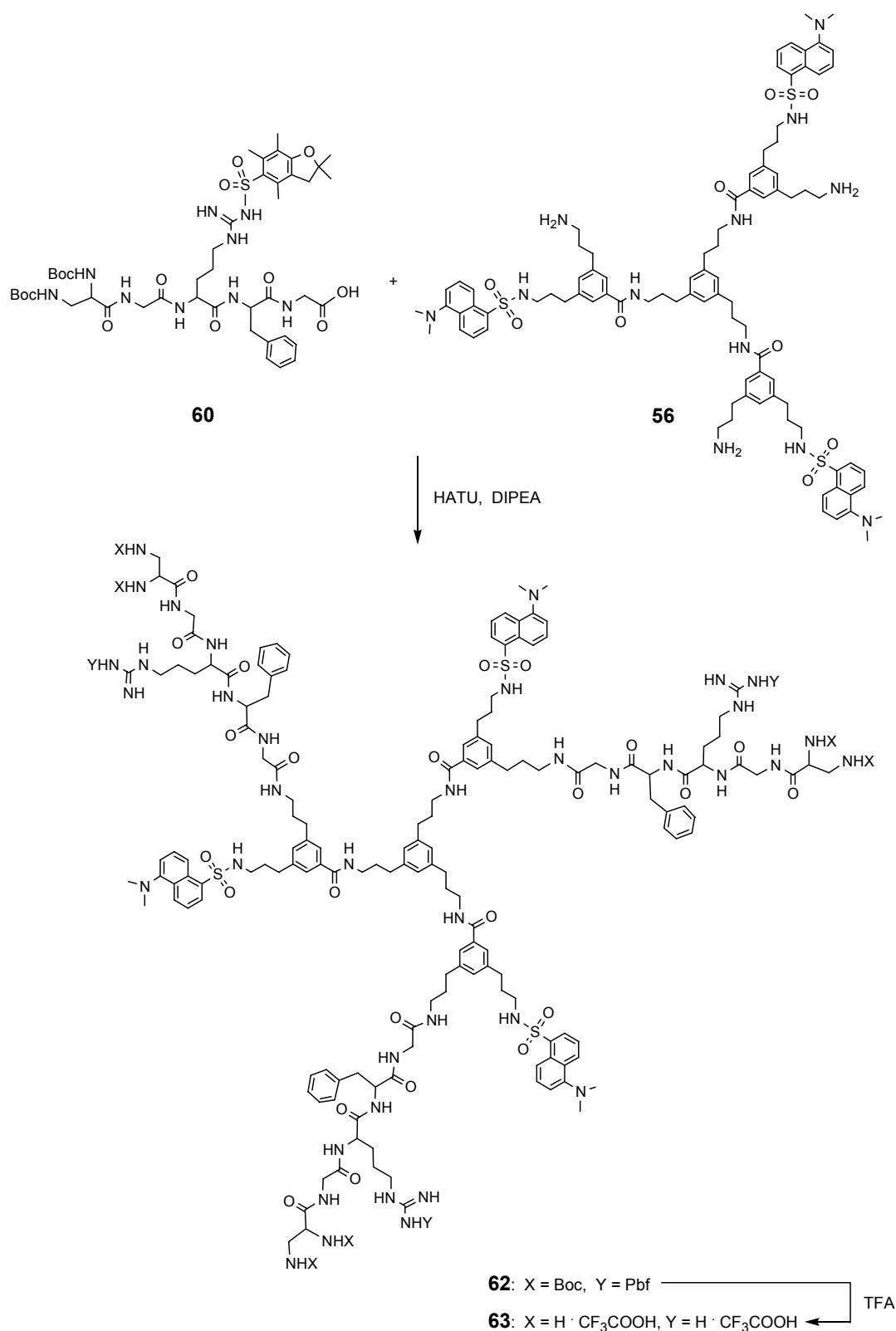
^{XVIII} Für die Überlassung danke ich Stefan Jehle, der die Synthese des Peptides unter Anleitung von Dr. P. Henklein in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P.-M. Kloetzel (Humboldt-Universität zu Berlin) im Rahmen seines Forschungspraktikums durchgeführt hat.

raturen (-20 °C) *in situ* weiter zu den entsprechenden teildansylierten Peptidodendrimeren **61** (Schema 24) umgesetzt. Sowohl die Aktivierungs- als auch die anschließende Kupplungsreak-



Schema 24: Syntheseversuch zum teildansylierten Peptidodendrimer **61** mit potentieller Cathepsin B-Schnittstelle und terminalem Methionin.

tion wurden unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt, um eine Oxidation der empfindlichen Thioether-Liganden zu vermeiden. Während der gesamten Zeit wurde der Reaktionsfortschritt



Schema 25: Synthesesequenz zum entschützten, partiell dansylierten und D/L-2,3-Diaminopropionsäure-terminierten Peptidodendrimer **63**.

mittels DC kontrolliert, wobei bereits hier die relativ hohe Polarität des Produktes auffiel. Durch die hohe Polarität des Peptidodendrimers **61** gestaltete sich dessen Aufreinigung mittels Säulenchromatographie über Kieselgel als schwierig; erst bei einer Lösungsmittelpolarität von 10 % Methanol in DCM konnten die Peptidodendrimer-Fractionen von der Säule eluiert werden. Das erhaltene MALDI-TOF Massenspektrum der aufgereinigten Dendrimer-Fractionen zeigte Signale der Masse des geschützten Peptidodendrimers **61** zuzüglich zwei oder drei Sauerstoffatomen. Das $[M+H]^+$ -Signal des nicht oxidierten Peptidodendrimers konnte hingegen nicht detektiert werden. Diese Daten, zusammen mit der ungewöhnlich hohen Polarität des erhaltenen Dendrimers, legten den Schluß nahe, daß ein Großteil der Probe entweder im Zuge der Synthese

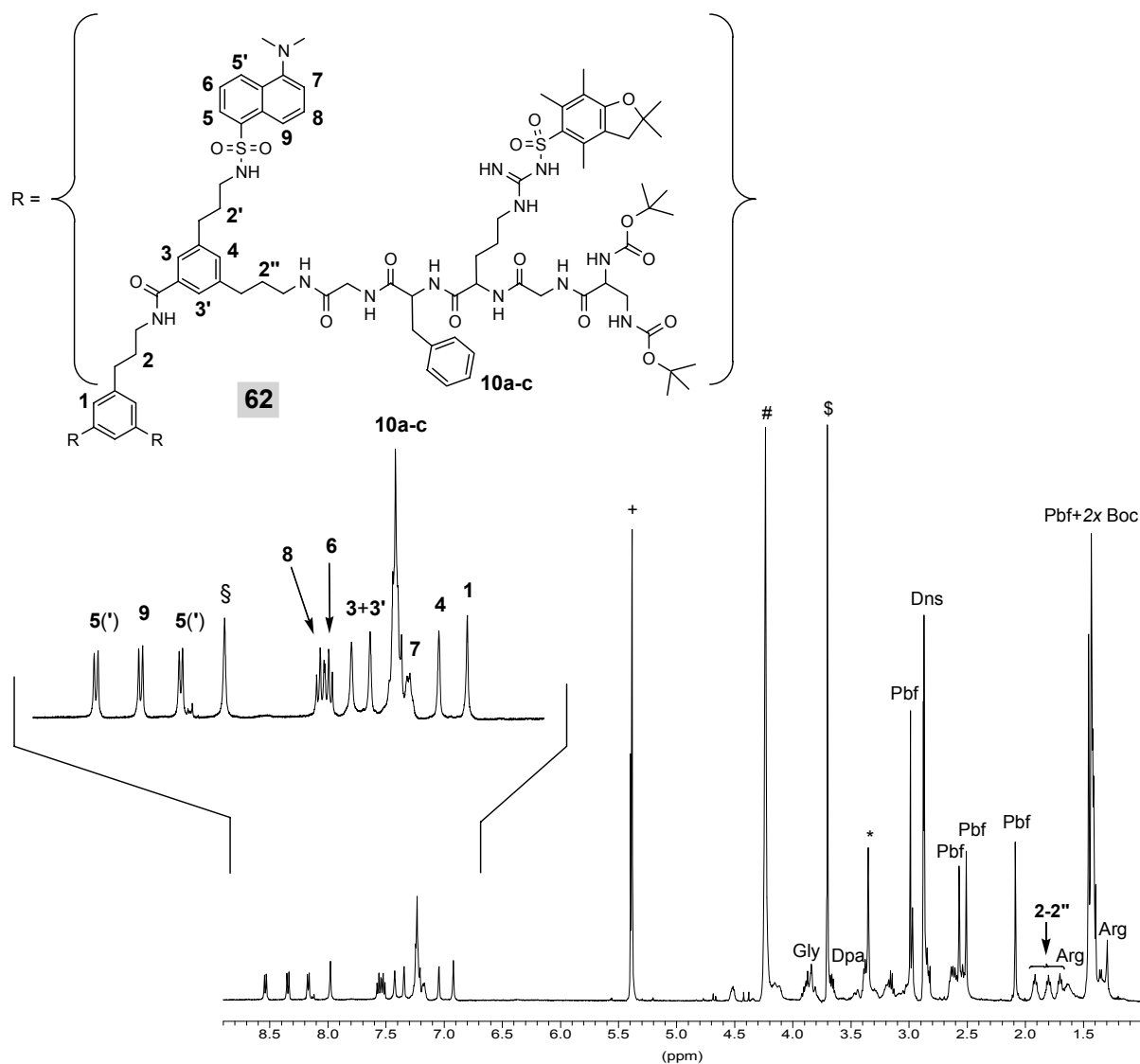


Abb. 37: ^1H -NMR-Spektrum (500MHz) des geschützten, teildansylierten Peptidodendrimers **62** mit terminaler D/L-2,3-Diaminopropionsäure in einer Lösungsmittelmischung aus $[\text{D}_2]$ -DCM und $[\text{D}_4]$ -Methanol wie erhalten nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Kieselgel (DCM mit 7 % Methanol als Eluens). (*) = Methanol; (+) = DCM; (\$) = Dioxan; (#) = H_2O ; (§) = DMF.

und Aufreinigungsprozedur, oder bereits durch das teilweise oxidierte Edukt ebenfalls mehrfach oxidiert vorlag. Ein Versuch zur Reduktion der Thioetherliganden des Peptidodendrimers wurde aufgrund der kleinen erhaltenen Gesamtmenge und der schlechten Löslichkeit des Produktes nicht mehr unternommen.

Die Amidbindungsknüpfungs-Reaktion zur Anbindung des Pentapeptides **60** an das teildansylierte Dendrimer **56** gelang dagegen problemlos und in Ausbeuten von 69 % (Schema 25). Zur Bildung des Aktivesters wurde ebenfalls HATU in Gegenwart von DIPEA bei 0 °C in DMF eingesetzt. Die weitere Umsetzung erfolgte wie zuvor beschrieben bei einer Reaktionstemperatur von -20 °C in DMF und wurde kontinuierlich mittels DC verfolgt. Nach wässriger Aufarbeitung konnte hier das Peptidodendrimer-Rohprodukt effektiv mittels Standard-Säulenchromatographie über Kieselgel und einer Laufmittelmischung aus 5 % Methanol in DCM aufgereinigt und als intensiv gelbgrün gefärbtes Öl erhalten werden. Abb. 37 zeigt das 500 MHz ^1H -NMR-Spektrum des geschützten Peptidodendrimers **62** mit terminalem Ethylen-diamin-Liganden in einer Lösungsmittelmischung aus $[\text{D}_4]$ -Methanol und $[\text{D}_2]$ -DCM. In Abb. 38 ist zusätzlich das MALDI-TOF-Massenspektrum der Verbindung nach säulenchromatographischer Aufreinigung und Gefriertrocknung aus Dioxan dargestellt.

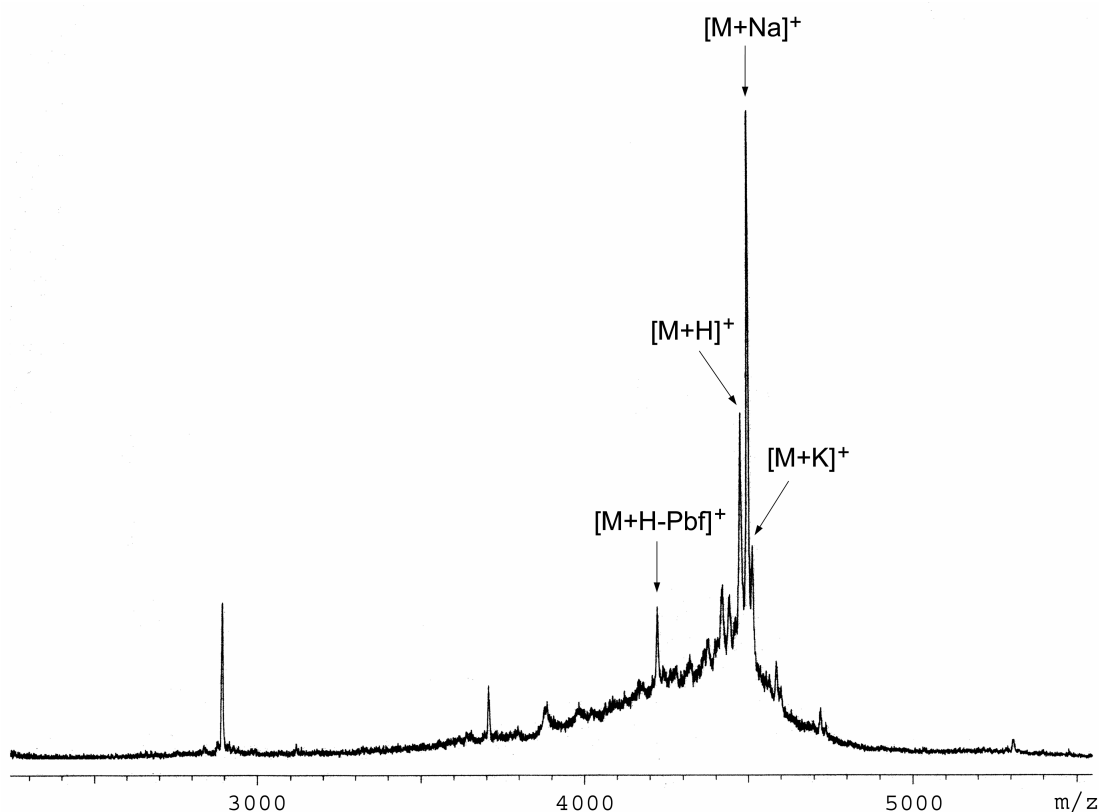


Abb. 38: MALDI-TOF-Massenspektrum des geschützten, partiell dansylierten Peptidodendrimers **62** mit terminaler D/L-2,3-Diaminopropionsäure (linearer Modus; *Matrix*: Dithranol).

Versuche zur präparativen HPLC-Reinigung des geschützten Peptidodendrimers **62** wurden nicht mehr unternommen. Analytische RP-HPLC-Läufe der Produktfraktionen zeigten das Vorliegen von drei Hauptkomponenten mit deutlich unterschiedlichen Retentionszeiten. Die erhaltenen 500 MHz $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der drei Fraktionen unterschieden sich jedoch nicht, und auch die entsprechenden MALDI-TOF massenspektrometrische Untersuchungen ergaben in allen drei Fällen identische Spektren. Dies deutet auf das Vorliegen von relativ stabilen Konformeren des Peptidodendrimers hin.

Mit dem nach Säulenchromatographie über Kieselgel erhaltenen geschützten Peptidodendrimer **62** wurden erste Versuche zur Abspaltung der Schutzgruppen unternommen. Um gleichzeitig mit den Boc-Gruppen der terminalen D/L-2,3-Diaminopropionsäure auch die Pbf-Schutzgruppen der Arginin-Seitenketten des Peptid-„Spacers“ abzuspalten, waren stark saure Bedingungen nötig. Bekannt und für die Festphasen-Peptidsynthese beschrieben war die acidolytische Pbf-Entschützung mit 90-95 % iger wässriger TFA^[210b], wobei das enthaltene Wasser als Kationenfänger fungiert^[185c]. Analog hierzu wurde die gleichzeitige Boc- und Pbf-Entschützung des Peptidodendrimers **63** mit 95 % iger wässriger TFA bei Raumtemperatur vorgenommen. Für die Geschwindigkeit der säurekatalysierten Pbf-Schutzgruppenabspaltung wurden von *Carpino et al.* Halbwertszeiten von 8 Minuten berichtet.^[210a] Die Entschützung des Peptidodendrimers **63** wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch über einen Zeitraum von 3 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt, um eine vollständige Abspaltung aller am Peptid-„Spacer“ des Dendrimers vorhandenen Schutzgruppen zu gewährleisten. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen wiesen jedoch darauf hin, daß bereits nach 30 Minuten nur noch das vollständig entschützte Peptidodendrimer im Reaktionsansatz vorlag. In zukünftigen Entschützungszprozeduren könnte die Reaktionszeit dementsprechend deutlich kürzer ausfallen. Abb. 39 zeigt den vergrößerten, isotopenaufgelösten Bereich der $[\text{M}+\text{H}]^+$ - und $[\text{M}+\text{K}]^+$ -Signale des MALDI-TOF-Massenspektrums und den aromatischen Bereich des 500 MHz $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums des entschützten, teildansylierten Peptidodendrimers **63**. Signale größerer Masse tauchten in dem entsprechenden MALDI-TOF-Massenspektrum nicht auf, so daß von einer vollständigen Entschützung des Dendrimers ausgegangen werden kann. Schwierig gestaltete sich allein die Abtrennung des aromatischen Abspaltproduktes der Pbf-Schutzgruppe aus der Probe des Peptidodendrimers. In der klassischen Peptidsynthese wird dies durch einfache wässrige Extraktion und Filtration der Reaktionslösung erreicht, da normalerweise die erhaltenen entschützten Peptide im Gegensatz zu dem aromatischen Abspaltprodukt der Pbf-Gruppe gut wasserlöslich sind.^[210c] In diesem Fall gelang die wässrige Extraktion des Peptidodendrimers **63** jedoch nicht,

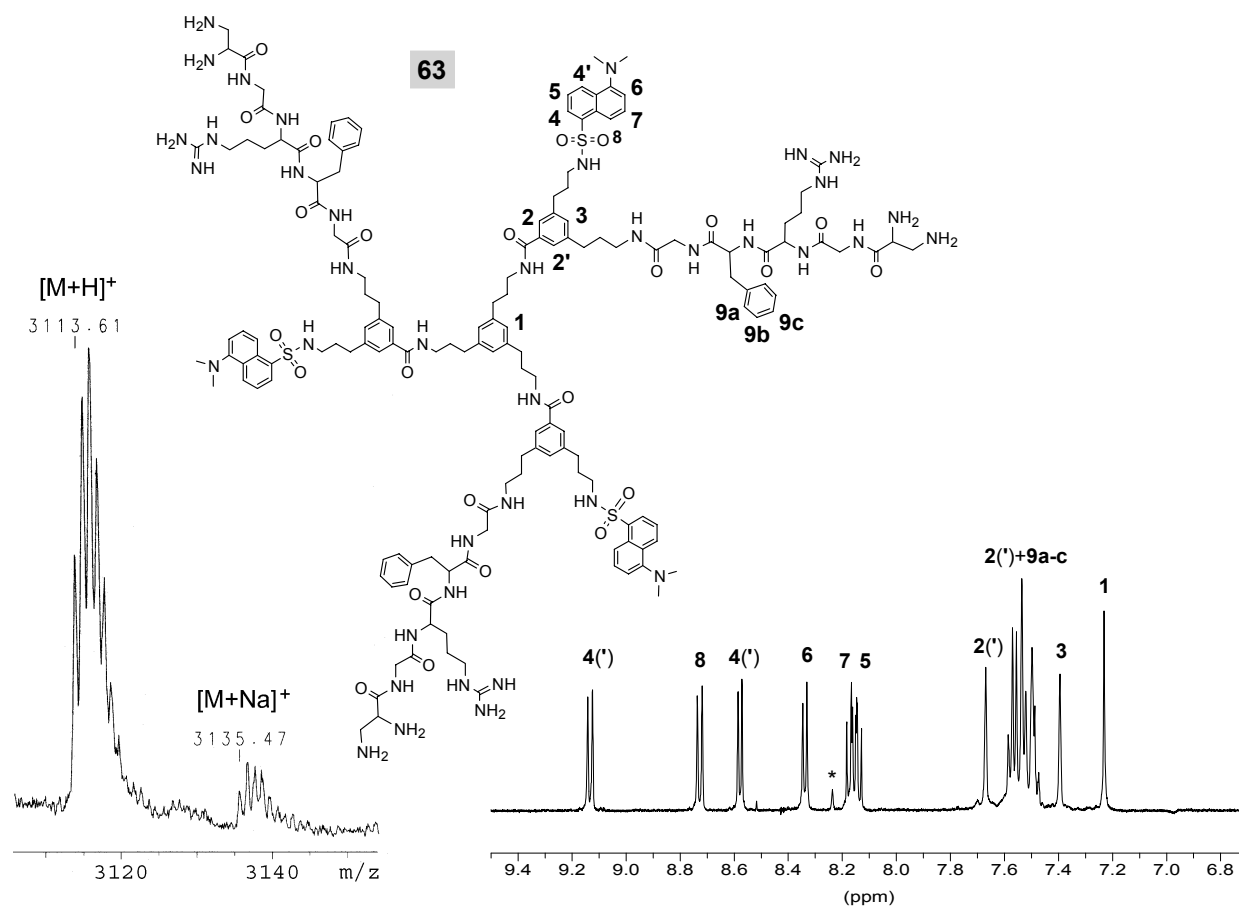


Abb. 39: Ausschnitte aus dem (a) MALDI-TOF-Massenspektrum (Reflektor-Modus; Matrix: CCA) und dem (b) 1H -NMR-Spektrum (500 MHz) (Lösungsmittelmischung: $[D_2]$ -Wasser, $[D_3]$ -Acetonitril; (*) = DMF) des entschützten, teildansylierten Peptidodendrimers **63** mit terminalen Ethylendiamin-Liganden. Im MALDI-TOF MS wurden keine Signale mit größerer Masse beobachtet.

da dieses nur in einer Lösungsmittelmischung aus Wasser und Acetonitril im Mengenverhältnis 1 : 1 vollständig löslich war. Aufgrund der schlechten Löslichkeit des erhaltenen Peptidodendrimers gestaltete sich auch eine HPLC-Aufreinigung der Verbindung unter Standardbedingungen als schwierig. Hier wäre eine weitere Optimierung der Aufreinigungsbedingungen zwingend notwendig, die aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr durchgeführt werden konnte. Dennoch zeigen die Ergebnisse dieser ersten Entschützungsversuche, daß die gewählte Methode prinzipiell geeignet ist das vollständig entschützte, teildansylierte Peptidodendramer **63** mit einer potentiellen Cathepsin B-Schnittstelle und terminalen Ethylendiamin-Liganden in ausreichenden Mengen und mit zufriedenstellenden Ausbeuten zur Verfügung zu stellen.

4.3 *In vitro* Cytotoxizität der synthetisierten Dendrimere

Die Cytotoxizitäts-Untersuchungen aller synthetisierten Dendrimere wurden an der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 durchgeführt.^{XIX} Dazu wurden die Dendrimere in Konzentrationen von 1 - 20 μM über einen Zeitraum von neun Tagen mit den in Zellkultur wachsenden Zellen inkubiert und die Anzahl der überlebenden Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt. Die Durchführung der Cytotoxizitäts-Untersuchungen und deren Auswertung ist im Experimentellen Teil (Kap. 7.6) erläutert.

Die Ammoniumsalze der meisten primären Amine weisen pK_S -Werte von 9 - 10 auf. Bei $\text{pH} = 7$ liegen die meisten Amine dementsprechend protoniert vor. Es ist jedoch bekannt, daß die Standard PAMAM-Dendrimere aufgrund der überraschend niedrigen pK_S -Werte ihrer terminalen ($\text{pK}_\text{S} = 6.9$)^[5] und internen Amine ($\text{pK}_\text{S} = 3.9$)^[5] bei physiologischem pH -Wert nur zum Teil protoniert sind.^[68] Obwohl der Grad der Protonierung der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Dendrimere nicht bestimmt wurde, erschien es dennoch sinnvoll vorläufig davon auszugehen, daß die meisten Aminogruppen der Dendrimere sich wie voneinander unabhängige primäre Amine verhalten. Im folgenden werden daher die entschützten Dendrimere unspezifisch als „polykationisch“ bezeichnet, wobei allerdings keine Aussage über die absolute Anzahl an Ladungen gemacht werden kann.

Die entschützten Dendrimere des Kapitels 4.2 waren allesamt vollständig löslich in Wasser und in gepufferten Zellkulturmedien, so daß sie unmittelbar und ohne weitere Vorbehandlung in Zellkultur untersucht werden konnten. Die einzige Ausnahme bezüglich der Löslichkeit in wässrigen Medien war das „gemischt“ dansylierte Dendrimer **58** mit terminaler D/L-2,3-Diaminopropionsäure, das zwar vollständig löslich in destilliertem Wasser war, jedoch bei einer Konzentration von 1 μM in PBS-Puffer, vermutlich mit Phosphat als Gegenion, schlecht lösliche Aggregate bildete. Neben den entschützten, vollständig wasserlöslichen Dendrimeren des Kapitels 4.2 wurden auch deren Boc-geschützte Vorläufer und die vollständig dansylierten Dendrimeren des Kapitels 4.2.4 in MCF-7 Zellkultur auf ihre Cytotoxizität hin untersucht. Sowohl bei den untersuchten Boc-geschützten als auch bei den dansylierten Dendrimeren wurde bei einer Temperatur von 37 °C, bei der alle Cytotoxizitäts-Untersuchungen durchgeführt wurden, nie eine Präzipitation der Dendrimere beobachtet. Auch wiederholte Zentrifugation der Proben führte nicht zu einer Sedimentation der Dendrimere, so daß die Ansätze nach kurzer Ultraschall-

^{XIX} Die Cytotoxizitäts-Untersuchungen wurden von Timo Kapp in der Arbeitsgruppe von Prof. R. Gust am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin durchgeführt und ausgewertet.

behandlung zumeist sofort in Zellkultur eingesetzt werden konnten. Aufgrund der erwarteten schlechteren Wasserlöslichkeit wurden alle Boc-geschützten Dendrimere nur in zwei Konzentrationen (5 und 10 μM) eingesetzt. Kontrollexperimente, in denen gleiche Konzentrationen der Natriumsalze der Dendrimer-Gegenionen (Chlorid oder Trifluoracetat) eingesetzt wurden, konnten sicherstellen, daß alle beobachteten Cytotoxizitäts-Effekte ausschließlich durch die Dendrimere selbst verursacht wurden.

4.3.1 Cytotoxizität der Dendrimere des Basis-Satzes

Die wasserlöslichen Dendrimere des Basis-Satzes (vgl. Kap. 4.2.1.3) zeigten in MCF-7 Zellkultur eine konzentrations- und generationsabhängige Cytotoxizität (Abb. 40b).

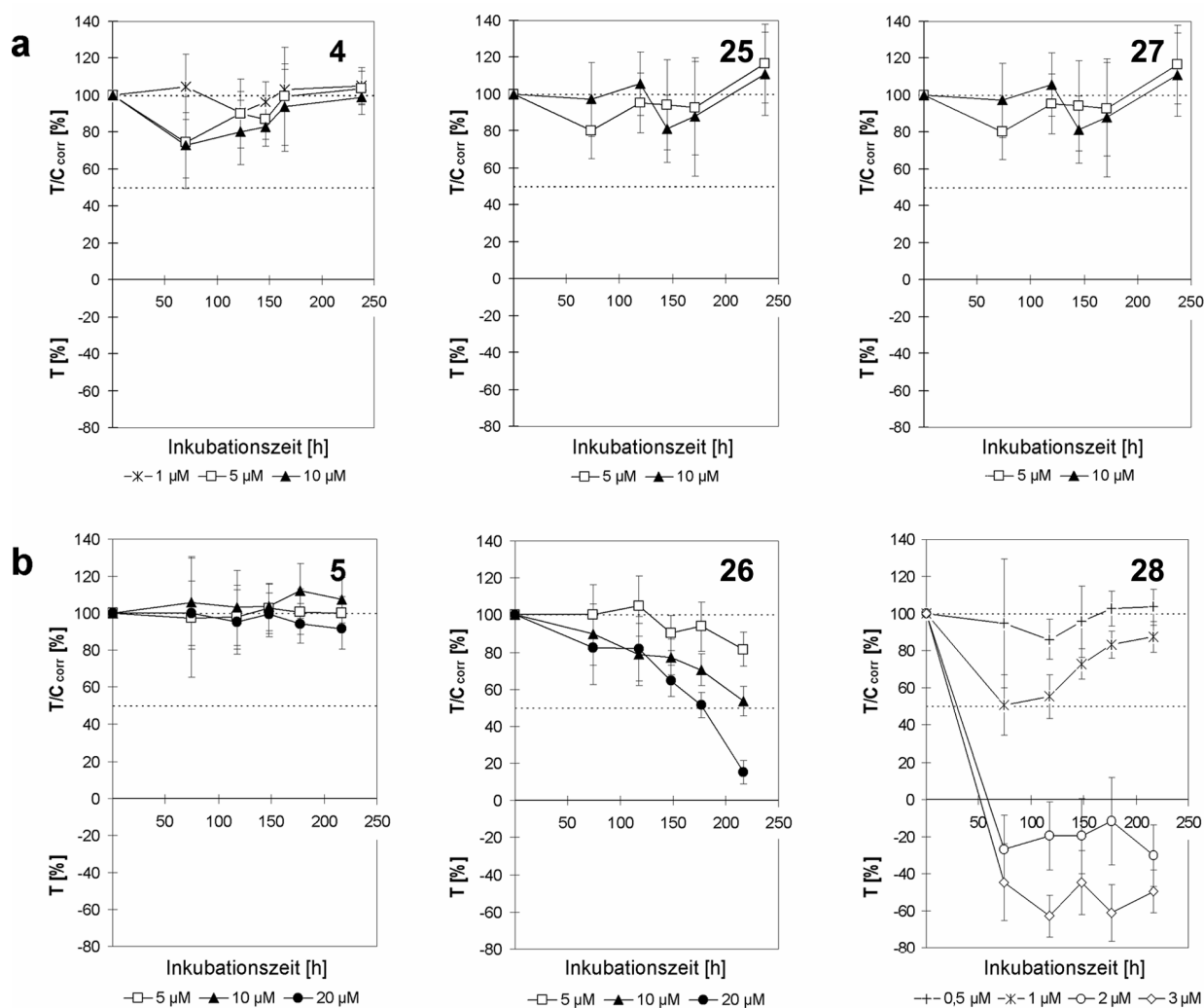


Abb. 40: *In vitro* Cytotoxizität des Kernmoleküls 5 und der Dendrimere 26 und 28 des Basis-Satzes. Vergleich der (a) Boc-geschützten und der (b) entschützten, polykationischen Formen. Die T/C_{corr} [%] und T [%]-Werte geben den prozentualen Anteil der überlebenden Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe an. Detaillierte Informationen zur Ermittlung der Werte finden sich im Experimentellen Teil (Kap. 7.6).

Während das entschützte Kernmolekül **5** in allen drei untersuchten Konzentrationen (5, 10 und 20 μM) keinen Effekt auf die in Zellkultur wachsenden Zellen ausübte, zeigte das G1-Dendrimer **26** eine konzentrationsabhängige Cytotoxizität. Schon bei einer Konzentration von 10 μM bewirkte das wasserlösliche Dendrimer eine deutliche Reduktion der Zellproliferation, ein Effekt, der bei einer Konzentration von 20 μM am Ende des Testes noch deutlich ausgeprägter war (Abb. 40b: nach 220 Stunden bei 20 μM Konzentration: $T/C_{\text{corr.}} = 15\%$). Der antiproliferative Effekt war bei dem entsprechenden G2-Analogon **28** noch weitaus stärker als beim G1-Dendrimer **26**. Bei Konzentrationen von 5 - 10 μM wurden in der Testgruppe bereits keine überlebenden Zellen mehr gefunden. Aus diesem Grunde wurde hier ein Konzentrationsbereich von 0,5 - 3 μM ausgewählt, um die konzentrationsabhängige Cytotoxizität des entschützten G2-Dendrimers zu zeigen. Seine absolute Cytotoxizität war die höchste unter allen untersuchten Dendrimeren des Kapitels 4.2; bereits eine 2 μM Konzentration verringerte die Anzahl der überlebenden Zellen unter die Zahl, die zu Beginn des Tests vorlag (Abb. 40b). Im Vergleich zu den entschützten G1- und G2-Dendrimeren zeigen deren Boc-geschützte Analoga **25** und **27** und auch das Boc-geschützte Kernmolekül **4** allesamt keine cytostatischen oder cytotoxischen Effekte in MCF-7 Zellkultur (Abb. 40a).

Die Ergebnisse der entschützten, polykationischen Dendrimere des Basis-Satzes stimmen gut mit den Beobachtungen von *Roberts et al.*^[109] und *Duncan et al.*^[160] überein, die in ihren Untersuchungen ebenfalls feststellten, daß polykationische Dendrimere in Abhängigkeit von der Generation und ihrer Konzentration im Zellkulturmedium cytotoxisch auf die untersuchten eukaryotischen Zelltypen (V79, B16F10, CCRF und HepG2) wirkten. Ebenso wie bei den hier untersuchten Dendrimeren fanden auch die beiden Autoren eine Zunahme der Cytotoxizität bei höheren Generationen und mit steigender Konzentration der untersuchten Dendrimere. Cytotoxische Effekte wurden nicht nur für Dendrimere, sondern vor allem auch für positiv geladene Polyelektrolyte wie Poly(ethylenimin) (PEI), Poly(L-Lysin) Hydrobromid (PLL), Pol(diallyldimethyl) Ammoniumchlorid (DAD-MAC), Diethylaminoethyl (DEAE)-Dextran und Chitose berichtet.^{[211], [212]} Obwohl es noch keine genaue Vorstellung über die toxischen Mechanismen dieser Verbindungen in lebenden Zellen gibt ist die Annahme naheliegend, daß die beobachtete Cytotoxizität mit der Anwesenheit von positiven Ladungen einhergeht. Die cytotoxischen Effekte von Polykationen werden manchmal mit Eigenschaften wie Ladungsdichte und Flexibilität der jeweiligen Makromoleküle erklärt.^{[211], [213]} So machte schon *Ryser* 1967 die dreidimensionale Struktur von Molekülen für deren biologische Interaktion mit Zellmembranen verantwortlich.^[214] Verzweigte Makromoleküle waren allgemein effektiver in der Neutralisation der Ladungen an der Zelloberfläche als Polymere mit linearen oder globulären Strukturen, und

relativ kompakte Moleküle wie Dendrimere verhielten sich weniger toxisch als lineare oder verzweigte Polymere.^[211] *Fischer et al.* schlossen aus ihren Experimenten, daß bei Zellen, die kationischen Polymeren ausgesetzt sind, zuerst die Membranintegrität zerstört wird und anschließend eine schnelle Abnahme der metabolischen Aktivität der Zellen erfolgt.^[211] Dennoch kann die polykationische Natur der Dendrimere allein die beobachtete Cytotoxizität der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen nicht vollständig erklären, wie auch die Ergebnisse der Cytotoxizitäts-Untersuchungen der Aminosäure-modifizierten Dendrimere zeigen (s. Kap. 4.3.2 und Kap. 4.3.3). Neben nekrotischen Effekten kann zum jetzigen Zeitpunkt auch das Auslösen von Apoptose durch polykationische Dendrimere als Ursache für die beobachtete Cytotoxizität nicht ausgeschlossen werden. Hinweise darauf konnten bisher allerdings noch von keiner Arbeitsgruppe gefunden werden.^[211] Jedoch kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, daß die „innere“ Struktur der hier untersuchten Dendrimere, speziell die aromatischen Verzweigungseinheiten, nicht für die beobachteten toxischen Effekte verantwortlich ist, da in den analog durchgeführten Untersuchungen die Boc-geschützten Dendrimer-Vorläufer **4**, **25** und **27** allesamt nicht cytotoxisch waren (vgl. Abb. 40a). Es muß allerdings beachtet werden, daß diese Verbindungen eine deutlich geringere Löslichkeit in den verwendeten Zellkulturmedien aufweisen und somit ihre Bioverfügbarkeit damit reduziert sein könnte.

4.3.2 Cytotoxizität der Dendrimer mit proteinogenen Aminosäuren

Die zuvor beschriebenen Cytotoxizitäts-Untersuchungen wurden auch mit den geschützten Aminosäure-modifizierten Dendrimeren des Kapitels 4.2.2 durchgeführt. Dabei verhielten sich die meisten, wenn auch nicht alle, geschützten Dendrimere analog den Boc-geschützten Dendrimeren **4**, **25** und **27** des Basis-Satzes (vgl. Abb. 40a) und zeigten in MCF-7 Zellkultur keine Cytotoxizität. Unerwartete Ausnahmen waren die beiden Boc-geschützten L-Methionin und L-Phenylalanin-modifizierten G0-Dendrimere **30a** und **30b**. Abb. 41 zeigt die Entwicklung der MCF-7 Zellpopulation innerhalb von neun Tagen nach Zugabe der geschützten, Aminosäure-terminierten G0- und G1-Dendrimere. Während das Boc-geschützte L-Phenylalanin-G0-Dendrimer **30b** eine klare Konzentrationsabhängigkeit des antiproliferativen Verhaltens in Zellkultur erkennen ließ, waren bei den beiden getesteten Konzentrationen (5 und 10 µM) des L-Methionin-G0-Dendrimer **30a** keine Unterschiede in ihrem Effekt auf die MCF-7 Zellen sichtbar (Abb. 41a). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß die verfügbare Menge von **30a** in Lösung nicht höher als 5 µM ist. Der Grund für die unerwartete Toxizität dieser beiden ge-

geschützten G0-Dendrimere in Zellkultur ist unklar. Alle anderen geschützten Dendrimere mit natürlichen Aminosäuren zeigten keinen Effekt auf die MCF-7 Zellproliferation.

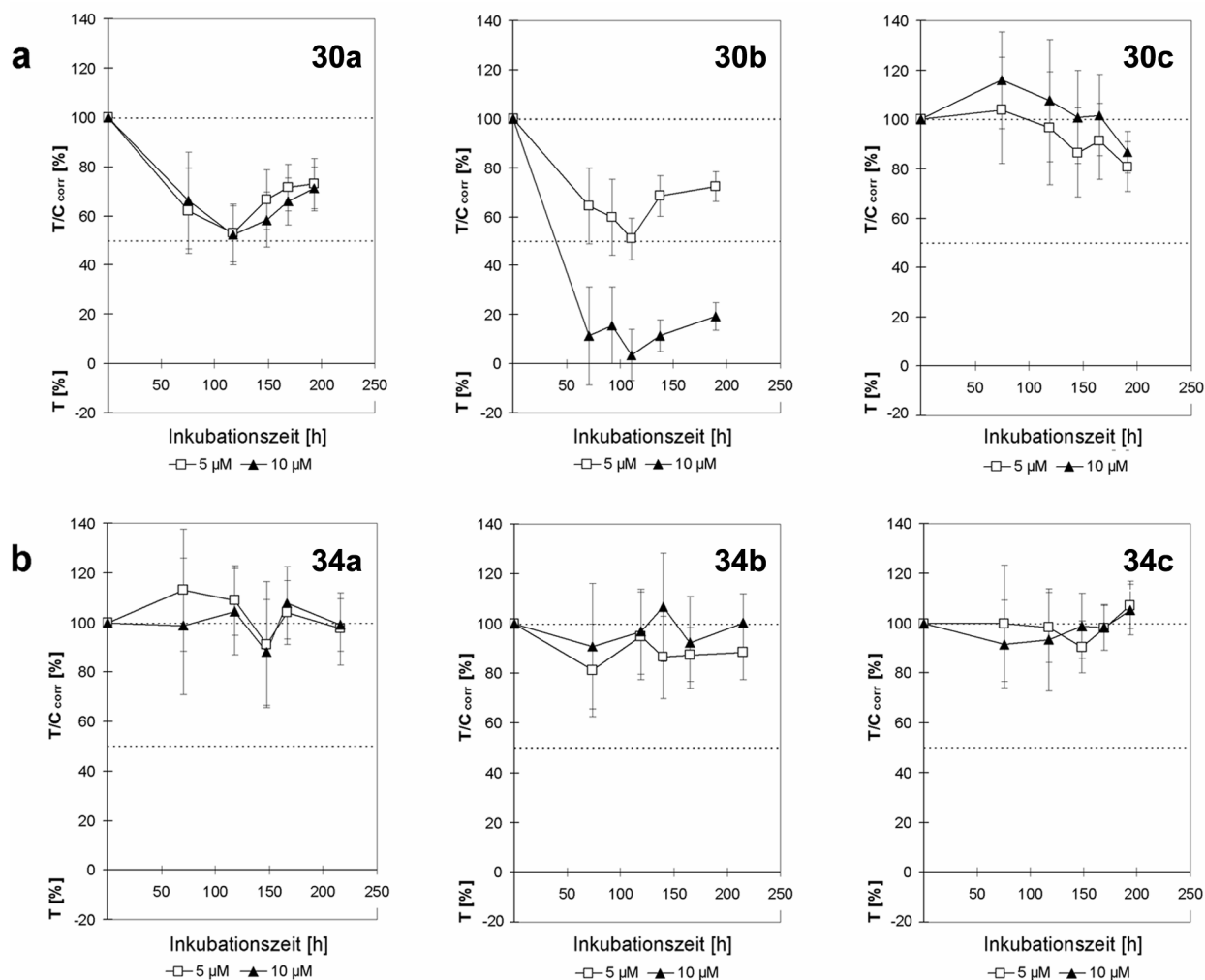


Abb. 41: *In vitro* Cytotoxizität der Boc- und, im Falle von L-Asparaginsäure, Boc/tBu-geschützten, Aminosäure-terminierten (a) G0-Dendrimere 30a (Boc-L-Methionin), 30b (Boc-L-Phenylalanin) und 30c (Boc/tBu-L-Asparaginsäure) und (b) der entsprechenden G1-Dendrimere 34a (Boc-L-Methionin), 34b (Boc-L-Phenylalanin) und 34c (Boc/tBu-L-Asparaginsäure). Die T/C_{corr} [%] und T [%]-Werte geben den prozentualen Anteil der überlebenden Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe an.

Die gleichen Untersuchungen wurden auch mit den analogen entschützten Aminosäure-terminierten Dendrimern durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen an den G0-Dendrimern 31a-c und den entsprechenden G1-Dendrimern 35a-c zeigt Abb. 42. Das kationische L-Methionin-G0-Dendrimer 31a und das zwitterionische L-Asparaginsäure-G0-Dendrimer 31c bewirkten selbst bei der höchsten eingesetzten Konzentration (20 µM) keinen signifikanten antiproliferativen Effekt in MCF-7 Zellkultur. Im Gegensatz dazu zeigte das L-Phenylalanin-G0-Dendrimer 31b eine deutliche Zunahme der Cytotoxizität bei steigender Konzentration

(Abb. 42a). Den stärksten Effekt wies das G0-Dendrimere **31b** nach einer Inkubationszeit von 70 - 100 Stunden auf. Bis zum Ende des Untersuchungszeitraums war jedoch eine gewisse Regeneration der Zellpopulation zu beobachten. Dies könnte bedeuten, daß die Zellen nach einiger Zeit eine Resistenz gegen die Verbindung entwickeln. Ob dies tatsächlich der Fall ist, oder ob das erneute Zellwachstum nach einer Inkubationszeit von etwa 100 Stunden andere Ursachen hat, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abschließend beantwortet werden; dies erfordert die Durchführung und Auswertung weiterer Zelluntersuchungen.

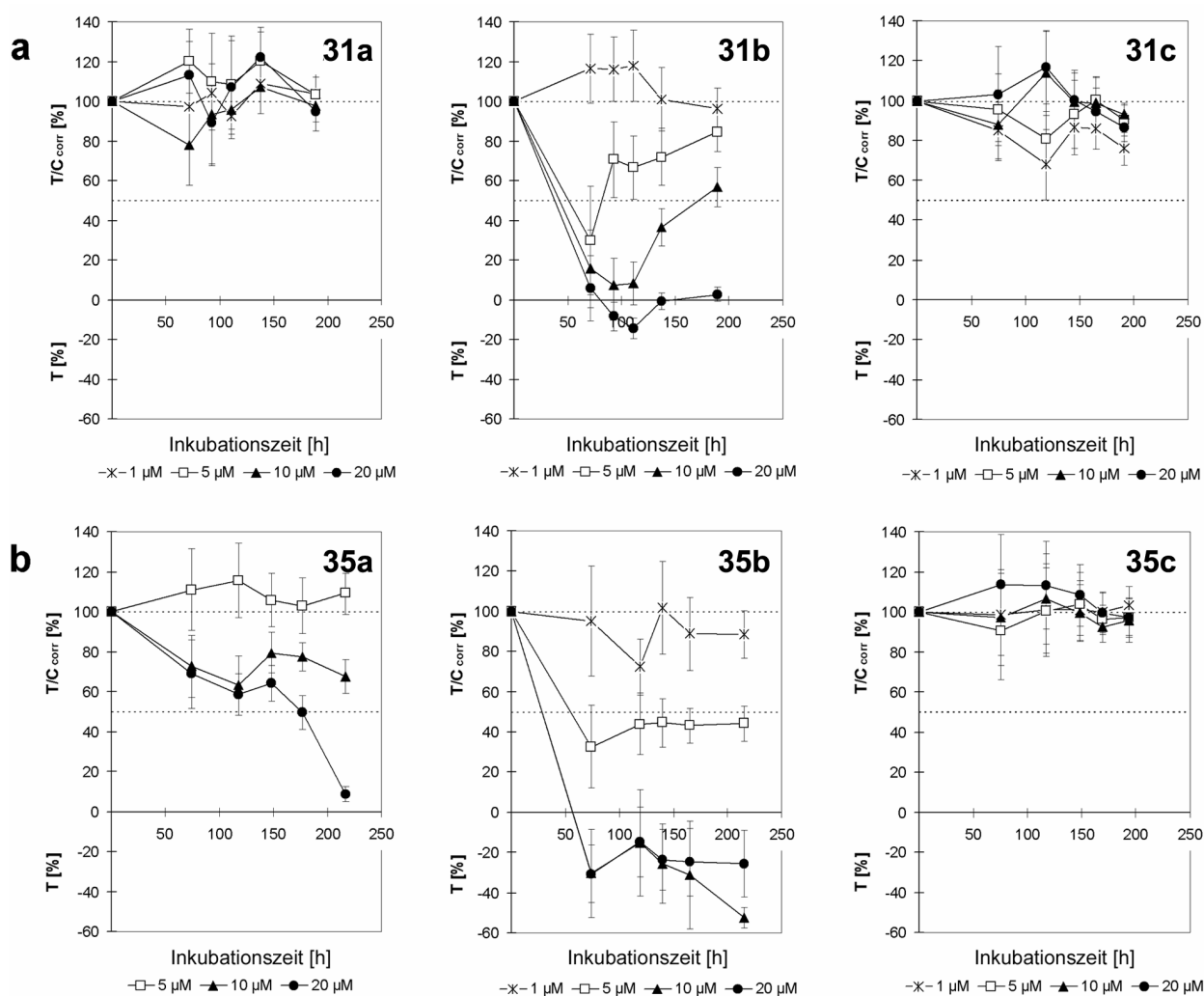


Abb. 42: *In vitro* Cytotoxizität der entschützten, Aminosäure-terminierten (a) G0-Dendrimere **31a** (L-Methionin), **31b** (L-Phenylalanin) und **31c** (L-Asparaginsäure) und (b) der entsprechenden G1-Dendrimere **35a** (L-Methionin), **35b** (L-Phenylalanin) und **35c** (L-Asparaginsäure). Die T/C_{corr} [%] und T [%]-Werte geben den prozentualen Anteil der überlebenden Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe an.

Prinzipiell wurde der Trend, der bei den Aminosäure-terminierten G0-Dendrimern zu beobachten war, auch bei den entsprechenden G1-Dendrimern **35a-c** gefunden. Während das zwitterionische L-Asparaginsäure-Dendrimere **35c** in MCF-7 Zellkultur selbst bei der höchsten

eingesetzten Konzentration (20 μM) keinen antiproliferativen Effekt zeigte, wirkte das L-Methionin-Analogon **35a** bei höheren Konzentrationen bereits leicht cytotoxisch, während das entsprechende L-Phenylalanin-Dendrimer **35b** die höchste Cytotoxizität der gesamten Dendrimergruppe aufwies. Ein Hinweis auf Resistenzentwicklung war hier jedoch nicht zu beobachten. Auffällig war bei den durchgeführten Untersuchungen, daß sich bei beiden L-Phenylalanin-terminierten Dendrimeren im Verlauf der Cytotoxizitäts-Untersuchungen eine große Anzahl von toten und strukturell völlig zerstörten Zellen in den jeweiligen Testgruppen fand. Beim G1-Dendrimer **35c** waren am Ende des Tests sogar überhaupt keine überlebenden Zellen mehr vorhanden.

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen war insbesondere bemerkenswert, daß die beiden L-Asparaginsäure-Dendrimere **31c** und **35c** in Zellkultur nicht cytotoxisch wirkten. Dies ergänzt und unterstützt die Ergebnisse von *Duncan et al.*^[160] und *Witvrouw et al.*^[215], die bei ihren Untersuchungen an verschiedenen eukaryotischen Zelllinien feststellten, daß anionische Dendrimere im Gegensatz zu deren kationischen Analoga nicht cytotoxisch wirken. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Cytotoxizitäts-Untersuchungen legen nun die Vermutung nahe, daß dies ebenfalls bei zwitterionischen Dendrimeren wie den hier untersuchten L-Asparaginsäure-Dendrimeren der Fall ist. Die rein kationischen L-Methionin-Dendrimere verhalten sich dagegen prinzipiell wie die anderen kationischen Dendrimere des Basis-Satzes mit einer äquivalenten Anzahl von Ladungen, wobei das G1-Dendrimer **35a** eine deutlich konzentrationsabhängige Cytotoxizität aufweist (vgl. Abb. 42b). Dies gilt im Prinzip auch für die beiden L-Phenylalanin-Dendrimere, wobei hier jedoch die deutlich größere Toxizität des G1-Dendrimers **35b** im Vergleich zu dessen L-Methionin-Analogon **35a** auffällt, das in bedeutend höheren Konzentrationen von den MCF-7 Zellen toleriert wurde (vgl. Abb. 42b). Auch ist das L-Phenylalanin-G0-Dendrimer das einzige der drei „kleinen“ Dendrimere, das in dem gewählten Konzentrationsbereich (1-20 μM) eine deutlich konzentrationsabhängige Cytotoxizität zeigt (vgl. Abb. 42a). Der Grund für die deutlich größere Cytotoxizität der beiden L-Phenylalanin-Dendrimere im Vergleich zu den anderen Dendrimerarten dieser Gruppe ist unklar. Es liegt jedoch die Vermutung nahe, daß die beobachteten Effekte auf eine Wechselwirkung der positiven Dendrimerladungen mit negativ geladenen Gruppen der Zellmembran und eine gleichzeitige Interaktion der hydrophoben Gruppen zur Zerstörung der Zellmembran („Tensid“-Effekt) und damit zum Tod der Zellen führen könnte. Auf Grundlage der hier durchgeführten Untersuchungen kann die Frage nach der Struktur/Wirkungs-Beziehung und dem Toxizitätsmechanismus zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch nicht abschließend beantwortet werden.

4.3.3 Cytotoxizität der Dendrimere mit Ethylendiamin-Liganden

Die Cytotoxizitäts-Untersuchungen der beiden D/L-2,3-Diaminopropionsäure-terminierten Dendrimere des Kapitels 4.2.3 führten zu dem überraschenden Ergebnis, daß nicht nur die Bocgeschützten Vorläufer **38** und **42** sondern vor allem auch die beiden entschützten Dendrimere **39** und **43** trotz ihrer positiven Ladungen allesamt in MCF-7 Zellkultur nicht cytotoxisch wirkten. Die Resultate der Cytotoxizitäts-Untersuchungen der beiden entschützten Vertreter **39** und **43** sind in Abb. 43 dargestellt.

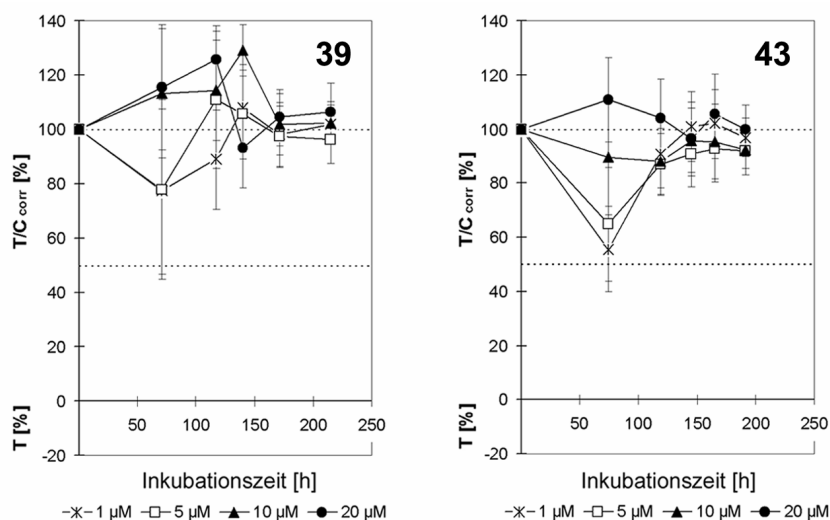


Abb. 43: *In vitro* Cytotoxizität der D/L-2,3-Diaminopropionsäure-terminierten G0- und G1-Dendrimere **39** und **43**. Die T/C_{corr} [%] und T [%]-Werte geben den prozentualen Anteil der überlebenden Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe an.

Bemerkenswert ist, daß sowohl das G0-Dendrimer **39** als auch und vor allem das D/L-2,3-Diaminopropionsäure-terminierte G1-Dendrimer **43** im Gegensatz zu allen anderen untersuchten kationischen Dendrimern (vgl. Kap. 4.3.1 und Kap. 4.3.2) bei keiner der getesteten Konzentrationen (1-20 μM) einen antiproliferativen Effekt in Zellkultur zeigten (Abb. 43). Auch bei einer Konzentration von 20 μM wuchsen die Zellen der Testgruppe genauso schnell wie die Zellen der Kontrollgruppe und es konnten keine toten Zellen gefunden werden. Dies ist insoweit bedeutsam, da diese Dendrimere neben den L-Methionin- und L-Asparaginsäure-terminierten Dendrimern des vorherigen Kapitels aufgrund ihrer Ligandeneigenschaften vermutlich die vielversprechendsten Vertreter für die Anbindung von anticarcinogen wirksamen Platinkomplexen sind.

Der Grund für dieses unerwartete Verhalten der beiden D/L-2,3-Diaminopropionsäure-terminierten Dendrimere ist unklar. In der Literatur sind bisher keine ähnlichen Fälle bekannt, in denen sich potentiell polykationische Dendrimere als vollständig untoxisch herausstellten. Alle bisherigen Untersuchungen bestätigen im Gegenteil die stark Konzentrations- und Generations-abhängige Cytotoxizität von verschiedenen kationischen Dendrimertypen.^{[109], [160], [162], [211]} Im vorliegenden Fall ist es jedoch durchaus denkbar, daß die zweizähligen Liganden an der Oberfläche der D/L-2,3 Diaminopropionsäure-modifizierten Dendrimere **39** und **43** durch ihre unterschiedlichen Protonierungseigenschaften, die Möglichkeit zur Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen und die potentielle Komplexierung von Metallionen zu einer veränderten Oberflächenbeschaffenheit dieser Dendrimervertreter führen. Dies könnte unter anderem die Ursache für die beobachtete gute Bioverträglichkeit der D/L-2,3-Diaminopropionsäure-terminierten Dendrimere sein. Um hierzu eine abschließende Aussage machen zu können, sind allerdings weitergehende Untersuchungen auch größerer D/L-2,3-Diaminopropionsäure-terminierter Dendrimere in unterschiedlichen eukaryotischen Zellsystemen und unter Einsatz verschiedener Zellkulturmedien erforderlich.

4.3.4 Cytotoxizität der Dendrimere mit Fluoreszenzmarkern

Aufgrund ihrer moderaten Wasserlöslichkeit wurden die vollständig dansylierten Dendrimere **48**, **49** und **50** des Kapitels 4.2.4.2 vor der Zugabe zu den MCF-7 Zellen durch eine kurze, niederenergetische Ultraschallbehandlung im vorliegenden Medium gelöst. So konnten in allen Fällen klare Lösungen erhalten werden, die dann für die Cytotoxizitäts-Untersuchungen eingesetzt wurden. Für die beiden größeren Dendrimere **49** und **50** konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie (s. Kap. 4.4) dennoch die Bildung kleiner, mit bloßem Auge nicht sichtbarer Aggregate nachgewiesen werden. Eine Präzipitation der Dendrimere wurde bei einer Temperatur von 37 °C jedoch nie beobachtet.

In den durchgeführten Untersuchungen zeigten die drei vollständig dansylierten Dendrimere **48**, **49** und **50** keine cytotoxischen Effekte in MCF-7 Zellkultur, sondern waren bei allen eingesetzten Konzentrationen (5 und 10 µM) hervorragend verträglich (Abb. 44). Die Dendrimere übten keinerlei Einfluß auf das Wachstum der MCF-7 Zellen aus und es wurden auch keine toten Zellen in den Reaktionsgefäßen beobachtet.

Diese Ergebnisse belegen, daß sich die Dansylgruppe hervorragend als Fluoreszenzmarker für Dendrimere in biologischen Anwendungen eignet. Auch andere Dendrimersysteme für potentielle biomedizinische Anwendungen wurden schon mit dem Dansylfluorophor markiert^[91],

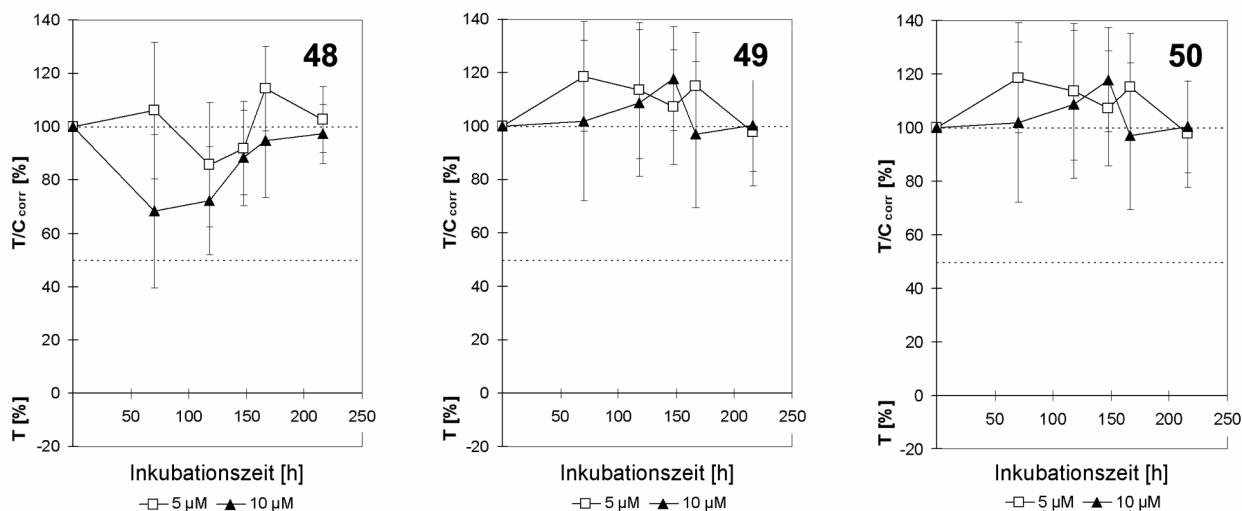


Abb. 44: *In vitro* Cytotoxizität der vollständig dansylierten Dendrimere **48**, **49** und **50**. Die T/C_{corr} [%] und T [%]-Werte geben den prozentualen Anteil der überlebenden Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe an.

jedoch stand bis heute eine biologische Evaluierung solcher Systeme noch aus. Neben der guten Bioverträglichkeit der hier untersuchten dansylierten Dendrimere zeichneten sie sich ebenfalls durch eine hohe Stabilität unter den Bedingungen des Zelltests aus. Auch nach einer Inkubationszeit von über neun Tagen zeigte sich keine Abnahme in der Fluoreszenzintensität der dansylierten Dendrimere. Alle Verbindungen konnten auch noch am Ende der Inkubationszeit mit gleicher Empfindlichkeit mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden (vgl. dazu Kap. 4.4 und Anhang/I).

4.3.5 Cytotoxizität der „gemischt“-dansylierten Dendrimere mit zwei funktionellen Gruppen

Ein interessantes Verhalten in MCF-7 Zellkultur zeigten die partiell dansylierten Dendrimere des Kapitels 4.2.5. Diese besaßen neben dem Dansyl-Fluoreszenzlabel noch eine zweite funktionelle Gruppe, die auch einige der anderen bereits untersuchten Dendrimere trugen. Damit stellten diese Systeme sozusagen „Hybride“ aus zwei Gruppen zuvor schon untersuchter Dendrimere dar. Insbesondere waren hierbei die beiden wasserlöslichen Dendrimere **56** und **58** von großem Interesse, da sie zum einen den Nachteil der schlechten Wasserlöslichkeit der vollständig dansylierten Dendrimere **48-50** überwandern und zum anderen noch zusätzliche Gruppen zur Platinanbindung trugen. Insbesondere das teildansylierte Dendrimer **58** mit zusätzlichen Ethy-

lendiamin-Liganden stellte hier ein besonders interessantes System dar, da dieses neben der Fluoreszenzmarkierung noch die Möglichkeit zur Pt^{2+} -Komplexierung besaß. Erstaunlicherweise war dieses Dendrimer, wie bereits erwähnt, in destilliertem Wasser vollständig löslich, in Phosphat-gepufferten Zellkulturmedien jedoch nicht. Durch kurze, niederenergetische Ultraschallbehandlung konnte jedoch auch hier eine klare Lösung zum Einsatz in den nachfolgenden Cytotoxizitäts-Untersuchungen erhalten werden.

Zunächst wurden, wie zuvor beschrieben, die Boc- bzw. Cbz-geschützten Vorgänger in Zellkultur auf ihre Cytotoxizität untersucht. Sowohl das Boc-geschützte Dendrimer **57** als auch der Cbz-geschützte teildansylierte Propylamin-Vorläufer **55** wirkten in keiner der getesteten Konzentrationen (5 und 10 μM) cytotoxisch auf MCF-7 Zellen (Ergebnisse nicht gezeigt). Dagegen war bei den beiden entschützten, wasserlöslichen Dendrimeren **56** und **58** eine deutlich konzentrationsabhängige Cytotoxizität zu beobachten, insbesondere bei dem partiell dansylierten Dendrimer **56** mit den freien Propylamin-, „Armen“. Die Ergebnisse der Cytotoxizitäts-Tests dieser beiden entschützten Dendrimeren sind in Abb. 45 dargestellt.

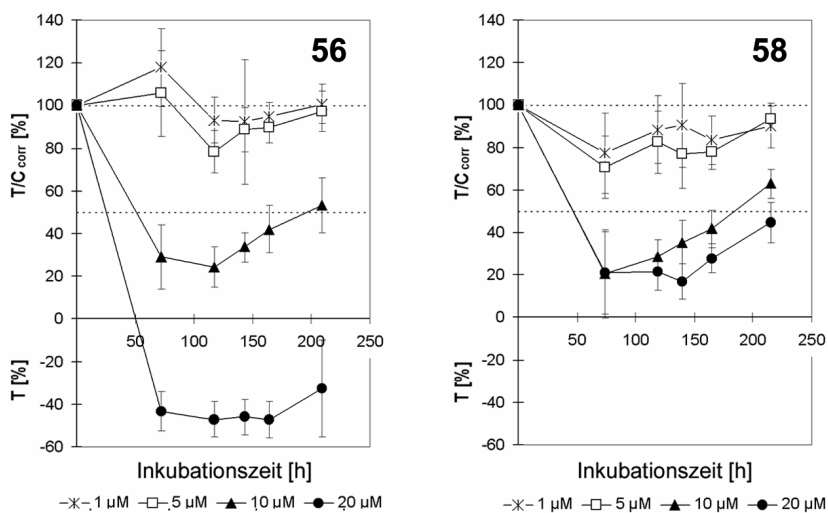


Abb. 45: *In vitro* Cytotoxizität des entschützten, partiell dansylierten und Propylamin-terminierten Dendrimers **56** und des teildansylierten, D/L-2,3-Diaminopropionsäure-terminierten Dendrimers **58**. Die T/C_{corr} [%] und T [%]-Werte geben den prozentualen Anteil der überlebenden Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe an.

Von beiden untersuchten Dendrimeren wirkte das partiell dansylierte, Propylamin-terminierte Dendrimer **56** bei der höchsten verwendeten Konzentration von 20 μM deutlich toxischer als das teildansylierte, D/L-2,3-Diaminopropionsäure-terminierte Dendrimer **58**. Beim Dendrimer **58** nahm die Zellzahl nach einem maximalen toxischen Effekt, der etwa 70 - 100 Stunden nach Substanzzugabe zu beobachten war, wieder zu, während beim Dendrimer

56 bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 20 μM fast keine überlebenden Zellen mehr zu finden waren. Die Zellpopulation erholte sich auch während der restlichen Dauer des Tests nicht mehr (vgl. Abb. 45). Unter dem Lichtmikroskop konnten in Übereinstimmung mit diesen Daten beim Dendrimer **56** eine große Anzahl vollständig zerstörter Zellen gefunden werden, während dies beim Dendrimer **58** in weitaus geringerem Maße der Fall war. Überraschend ist in diesem Zusammenhang, daß das partiell dansylierte, D/L-2,3-Diaminopropionsäure-terminierte Dendrimer **58** überhaupt cytotoxisch in MCF-7 Zellkultur wirkt, da weder das vollständig dansylierte G1-Dendrimer **49** noch das komplett mit D/L-2,3-Diaminopropionsäure modifizierte Dendrimer **43** zuvor antiproliferative Wirkungen zeigten (vgl. Abb. 43 und 44). Dieses „Hybrid“-Dendrimer verhält sich in Zellkultur offensichtlich anders als jedes seiner beiden einheitlich oberflächenmodifizierten Analoga.

Der Grund für das unerwartete Verhalten der beiden „gemischten“ Dendrimere **56** und **58** in MCF-7 Zellkultur ist unklar. Geht man von der Annahme aus, daß das Ausmaß der Cytotoxizität ein Effekt der positiven Ladungen an der Dendrimer-„Oberfläche“ ist, so zeigt sich insbesondere das teildansylierte, Propylamin-terminierte Dendrimer **56** im Vergleich zu den Aminosäure-modifizierten G0-Dendrimern **31a-c** (Abb. 42a) und dem Kernmolekül **5** (Abb. 40b) überraschend toxisch. Seine Cytotoxizität ist sogar deutlich größer als die des entschützten G1-Dendrimers **26** des Basis-Satzes (vgl. Abb. 40b) und allenfalls vergleichbar mit der des L-Phenylalanin-modifizierten G1-Dendrimers **35b** (vgl. Abb. 42b). Dies legt die Vermutung nahe, daß die beobachteten Toxizitäts-Effekte wiederum durch die räumliche Nähe von positiv geladenen und großen hydrophoben Gruppen bedingt wird, die in einer Art „Tensid-Effekt“ die Membranen der Zellen beschädigen und damit die Zellen zerstören. Ob dies im vorliegenden Fall tatsächlich die Ursache der beobachteten Cytotoxizität ist, oder ob nicht doch andere Faktoren bei den beobachteten Phänomenen eine Rolle spielen, kann auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse noch nicht abschließend beantwortet werden. Dazu wären weitere, breiter angelegte Studien erforderlich.

4.4 Aufnahme und intrazelluläre Verteilung der fluoreszenzmarkierten Dendrimere

Um die Aufnahme der fluoreszenzmarkierten Dendrimere in eukaryotische Zellen zu verfolgen und deren intrazelluläre Verteilung zu studieren, wurden die Dendrimere **48**, **49**, **56** und **58** in einer Konzentration von 5 μM mit humanen HeLa Zellen inkubiert.^{xx} Das vollständig dansylierte G2-Dendrimer **50** wurde aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit und starken Neigung zur Aggregation in wässrigen Zellkulturmedien bei diesen Untersuchungen nicht eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden bei 37 °C wurden die Zellen fixiert und teilweise, zur besseren Orientierung in der Zelle, Immunfluoreszenz-markiert. Dazu wurde ein Antikörper verwendet, der gegen die membranständigen Formen des Lamina-assoziierten Polypeptids 2 (LAP-2) gerichtet ist. Es handelt sich hierbei um ein integrales Membranprotein der Kernhülle, das mit Laminen und Chromosomen interagiert und dessen Bindung durch mitotische Phosphorylierung moduliert wird.^[216] LAP-2 befindet sich hauptsächlich in der inneren Kernmembran, aber auch im Endoplasmatischen Reticulum (ER). Mit Hilfe eines Carbocyanin(Cy2)-markierten sekundären Antikörpers konnten so die Zellkernmembran und Teile des ER für die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. Im Anschluß daran wurden die Zellen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht.^{xxi} Die Abb. 46 und 47 zeigen typische konfokale Aufnahmen der Zellen dieser Experimente.

Alle Experimente waren reproduzierbar und resultierten in den gleichen intrazellulären Verteilungsmustern der Dendrimere. Dabei waren die dargestellten intrazellulären Verteilungen repräsentativ für die Zellen jedes Einzelexperimentes. Mindestens 30 - 40 % aller Zellen zeigten eine spezifische intrazelluläre Dendrimerfluoreszenz, und in 90 % der Fluoreszenz-positiven Fälle waren praktisch die gleichen intrazellulären Verteilungsmuster zu beobachten wie bei den dargestellten Zellen (vgl. Abb. 46 und 47).

Analoge Experimente wurden mit Maus-Fibroblastenzellen (NIH 3T3) und der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 durchgeführt und resultierten in den gleichen intrazellulären Verteilungsmustern (die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind im Anhang/I gezeigt). Die

^{xx} Alle Versuche zur zellulären Aufnahme und intrazellulären Verteilung der Dendrimere wurden in Kooperation mit Dr. H. Otto in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Hucho am Institut für Chemie/Biochemie der Freien Universität Berlin durchgeführt.

^{xxi} Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder der HeLa Zellen wurden mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. T. Schöneberg am Fachbereich Humanmedizin/Institut für Pharmakologie der Freien Universität Berlin (*aktuell*: Institut für Biochemie der Universität Leipzig) aufgenommen und interpretiert.

exakte Lokalisation der Dendrimere mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie wurde in diesen Versuchen aus Analogiegründen jedoch nicht mehr bestimmt.

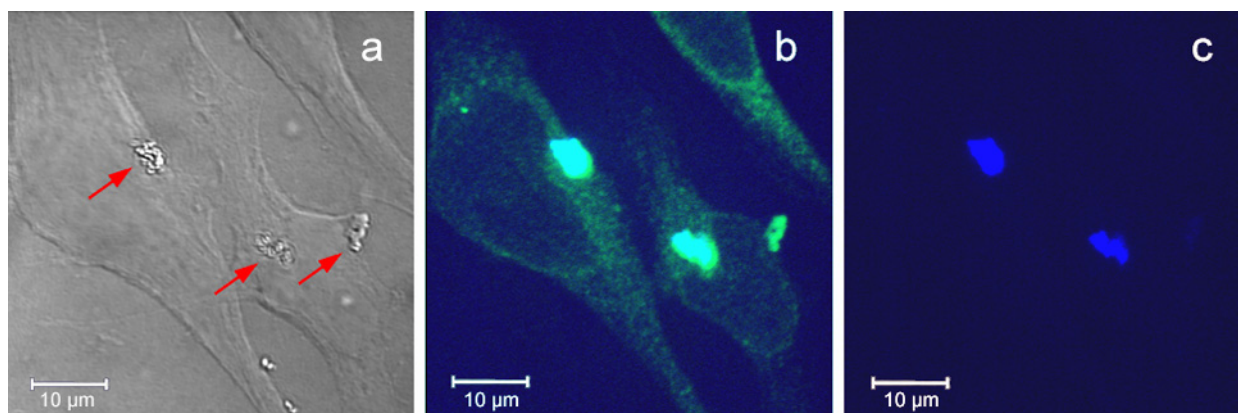


Abb. 46: Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der HeLa Zellen nach Inkubation mit dem vollständig dansylierten G0-Dendrimer 48 und anschließender LAP-2-Immunfluoreszenzfärbung. Die Zellen wurden mit Dendrimer 48 in einer Konzentration von 5 μM für 20 Stunden bei 37 °C inkubiert, gewaschen und fixiert; mit dem LAP-2 Antikörper und einem Cy2-markierten sekundären Antikörper wurden die Kernmembran und Teile des ER immunfluoreszenzmarkiert. Die Lokalisierung der Dendrimere in den Zellen wird durch rote Pfeile gekennzeichnet. (a) DIC (differential interference contrast)-Bild; (b) Überlagerung von LAP-2 Färbung (grün) und Dendrimerfluoreszenz (blau); (c) Dendrimerfluoreszenz (blauer Kanal).

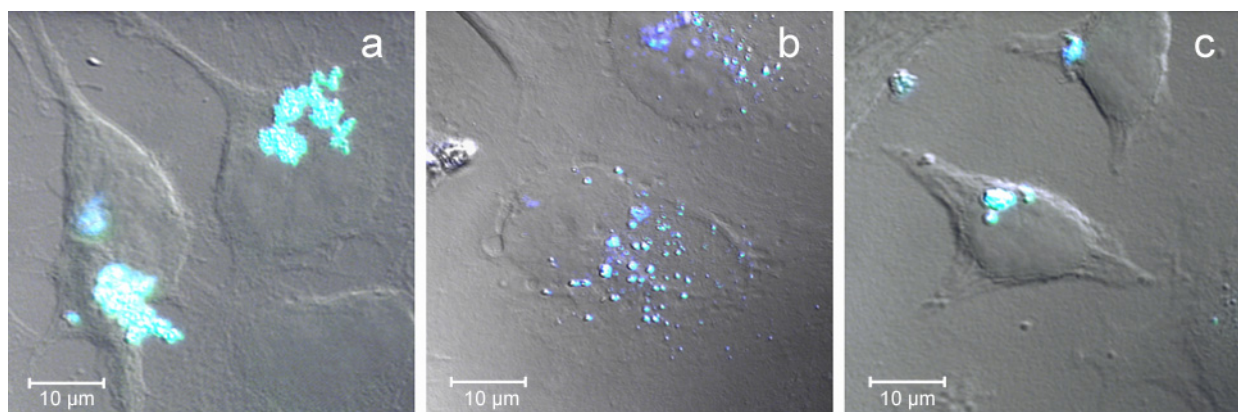


Abb. 47: Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der HeLa Zellen nach Inkubation mit dem vollständig dansylierten G1-Dendrimer 49 und den beiden partiell dansylierten, kationischen Dendrimeren 56 und 58. Die Zellen wurden mit den Dendrimeren 46, 53 und 55 in einer Konzentration von 5 μM für 20 Stunden bei 37 °C inkubiert, gewaschen und anschließend fixiert. Überlagert dargestellt sind DIC-Bilder und Dendrimerfluoreszenz (blau) von (a) Dendrimer 49, (b) Dendrimer 56 und (c) Dendrimer 58.

Abb. 46 zeigt die DIC („differential interference contrast“)- und Fluoreszenz-Bilder der Zellen nach Inkubation mit dem vollständig dansylierten G0-Dendrimer 48, wie sie mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie erhalten wurden. Schon in dem Durchlichtbild konnten große intrazelluläre Aggregate mit einer granulären Struktur identifiziert werden (markiert durch

die roten Pfeile in Abb. 46a). Nach Anregung bei 364 nm zeigten diese Aggregate eine intensive, blaugrüne Fluoreszenz und konnten somit leicht als in der Zelle befindliche Dendrimere identifiziert und lokalisiert werden (die Dendrimerfluoreszenz ist in den Abb. 46b,c und 47 in blau dargestellt). Aufgrund ihrer verschiedenen Emissionswellenlänge konnte die Cy2-Immunfluoreszenz der Kernhülle leicht von der Dendrimerfluoreszenz unterschieden werden (Abb. 46b,c). Die in Abb. 46 gezeigten granulären Strukturen waren bei einer Mehrzahl der untersuchten HeLa Zellen zu beobachten und typischerweise in unmittelbarer Nähe des Zellkerns lokalisiert. Im Durchschnitt wurden ein bis drei solcher Aggregate mit Durchmessern von etwa 2 - 5 μm pro Zelle beobachtet. Bei den Zellen, die mit dem vollständig dansylierten G1-Dendrimer **49** inkubiert worden waren, war eine ähnliche intrazelluläre Lokalisation der Dendrimere in der unmittelbaren Nähe des Zellkerns zu beobachten. Nur waren die gebildeten Aggregate hier größer (Durchmesser von 4 - 7 μm) und sie erschienen stärker granulär (Abb. 47a). Im Gegensatz zu den beiden vollständig dansylierten Dendrimeren **48** und **49** zeigte das wasserlösliche, Propylamin-terminierte Dendrimer **56** eine punktartige, stärker cytoplasmatische Verteilung ohne erkennbar granuläre Struktur (Abb. 47b). Die einzelnen Partikel wiesen dabei einen Durchmesser von etwa 0.5 - 1 μm auf. Die intrazelluläre Verteilung des teildansylierten, D/L-2,3-Diaminopropionsäure-terminierten Dendrimers **58** ähnelte schließlich wieder der der beiden vollständig dansylierten Dendrimere **48** und **49**. Auch hier fanden sich bei den meisten Zellen ein bis drei größere Aggregate mit Durchmessern von etwa 2 - 4 μm in unmittelbarer Nähe des Zellkerns (Abb. 47c).

Die im Vergleich zur typischen Dauer von intrazellulären Transport- und Verteilungsprozessen^{[154], [156], [165], [217]} relativ lange Inkubationszeit von 20 Stunden vor der Aufnahme der vorliegenden Bilder deutet darauf hin, daß die beobachtete Lokalisation der Dendrimere einer stabilen Situation entspricht. Auch die Verteilungsmuster insbesondere der Dendrimere **48**, **49** und **58** als große, granuläre Aggregate sprechen für diese Vermutung. Vorläufige Ergebnisse erster kinetischer Untersuchungen deuten an, daß die zelluläre Aufnahme der Dendrimere ein relativ schneller Vorgang ist, der vermutlich nach vier bis fünf Stunden beendet ist.^[218] Unklar ist zum jetzigen Zeitpunkt allerdings, ob es sich dabei um den Endpunkt des Transportprozesses, oder vielmehr um ein dynamisches Gleichgewicht handelt, bei dem nach 20 Stunden Inkubationszeit immer noch Dendrimere in die Zellen aufgenommen und dabei gleichzeitig Dendrimere auch wieder aus den Zellen ausgeschleust werden. Eine ähnliche punktierte intrazelluläre Verteilung wie bei den hier untersuchten fluoreszenzmarkierten Dendrimeren **48**, **49** und **58** wurde bereits für andere Dendrimere berichtet. So beobachteten *Juliano et al.* ebenfalls ein leicht „klumpiges“ intrazelluläres Verteilungsmuster ihrer „Oregon green 488“-konjugierten PAMAM-Dendri-

mer/Oligonucleotid-Komplexe in HeLa Zellen. Die Autoren fanden dabei die Dendrimere nicht nur im Zellkern, sondern auch an anderen Orten in der Zelle, vermutlich an der Plasmamembran und in Endomembran-Kompartimenten.^{[70], [163]} Wie in den Abb. 46 und 47 zu sehen ist, befindet sich keines der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Dendrimere direkt im Zellkern. Statt dessen sind die meisten Dendrimere in direkter Nähe des Zellkerns zu finden. Dies könnte für eine Lokalisation im Golgi-Apparat der Zelle oder in dessen unmittelbarer Nähe sprechen. Ein Beispiel für eine solche Verteilung liefern *Merlin et al.*, die das Ablegen von Daunorubicin in den Golgi-Vesikeln von Wirkstoff-resistenten MCF-7 Zellen beobachteten.^[219] *Belloc* und Mitarbeiter vermuteten bei ihren Untersuchungen an „multi drug resistant“ (MDR) Leukämiezellen (K562 und HL60), daß bei der intrazellulären Verteilung eines phosphorylierten transmembran-Glycoproteins (P-gp) dieses zunächst in größeren cytoplasmatischen Aggregaten in einem großen zentralen Zellorganell, vermutlich dem Golgi-Apparat, „gelagert“ wird, bis es von Golgi-Vesikeln anschließend wieder zur Zellmembran dirigiert wird.^[220] Daneben berichten auch *Tanke* und *Reedijk* von einer punktierten Färbung einer cytoplasmatischen Region in humanen Osteosarcom-Zellen (U2-OS) nach Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Platinkomplexen. Co-Lokalisations-Studien mit einem Golgi-spezifischen Farbstoff deuteten schließlich darauf hin, daß Golgi-Vesikel am Prozeß der intrazellulären Verteilung beteiligt waren.^[221] Dagegen spricht das intrazelluläre Verteilungsmuster des teildansylierten, D/L-2,3-Diaminopropionsäure-terminierten Dendrimers **56** eher für eine vesikuläre Verteilung mit vermutlich endosomalem oder lysosomalem Ursprung. Die Größe der beobachteten Partikel (vgl. Abb. 47b) stimmt gut mit der solcher Kompartimente überein, die durch fusionierte Endo- oder Lysosomen gebildet werden.^{[205], [222]} In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung berichteten auch *Giralt et al.* von einer mehr oder weniger vesikulären Verteilung ihrer Poly(prolin)-Dendrimere in normalen Rattenlinien (NRK) Zellen nach einer Inkubationszeit von einer Stunde. In diesem Fall wurde von den Autoren Endocytose als Aufnahmemechanismus für die Dendrimere postuliert.^[165] Ob dies in den vorliegenden Experimenten mit den hier untersuchten Dendrimeren ebenfalls der Fall ist, konnte bis jetzt noch nicht zweifelsfrei gezeigt werden und erfordert die Durchführung weiterer Colokalisations-Experimente.

Um die Frage nach der intrazellulären Verteilung der hier untersuchten Dendrimere nach ihrer Aufnahme in eukaryotische Zellen abschließend beantworten zu können, werden aktuell weitere kinetische und Colokalisations-Studien durchgeführt. Falls die Dendrimere tatsächlich mittels Endocytose in die Zellen aufgenommen werden, sollten sie sich zunächst in kleinen, Clathrin-umhüllten Vesikeln („coated pits“) befinden, die nachfolgend zu größeren Endosomen und schließlich Lysosomen fusionieren. Wie zuvor erwähnt, könnten einige dieser Dendrimere-

enthaltenden Vesikel auch zum Golgi-Apparat gerichtet werden. Um die vermuteten Vorgänge detaillierter untersuchen zu können, werden aktuell Colokalisations-Studien mit bekannten Markern für verschiedene intrazelluläre Kompartimente angestrebt.