

## 5 ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

### 5.1 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Satz von Poly(amidoamin)-Dendrimeren verschiedener Generationen und mit unterschiedlichen Oberflächenmotiven synthetisiert, von denen die meisten wasserlöslich sind. Zur Synthese der Dendrimere kamen effiziente und gut entwickelte Reaktionen wie die Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung und die aus der Peptidchemie bekannten Amidbindungsknüpfungs-Sequenzen zum Einsatz, die die Dendron- und Kernbausteine zumeist im Gramm-Maßstab zugänglich machten. Zu den in konvergenten und divergenten Syntheseverfahren hergestellten Dendrimeren gehören (a) die polykationischen, Propylamin-terminierten Dendrimere **26** und **28** des Basis-Satzes, (b) die kationischen und zwitterionischen Dendrimere **31a-c** und **35a-c** mit den natürlichen Aminosäuren L-Methionin, L-Phenylalanin und L-Asparaginsäure, (c) die Dendrimere **39** und **43** mit Ethylendiamin-Chelatliganden zur Pt<sup>2+</sup>-Komplexierung, (d) die vollständig fluoreszenzmarkierten Vertreter **48**, **49** und **50** und (e) die Dendrimere **56** und **58** mit einer zweiten funktionellen Gruppe neben dem Fluoreszenzlabel (z. B. mit Ethylendiamin-Liganden). Darüber hinaus wurde ein partiell dansyliertes Peptidodendrimer mit einer Cathepsin B-Schnittstelle synthetisiert, das neben der Bindung von Pt<sup>2+</sup>-Metallionen auch deren selektive Freisetzung in Tumorzellen mittels proteolytischer Spaltung des Peptid-„Spacers“ ermöglicht. Die Dansylfluorophore gewährleisteten hier eine exakte Lokalisation des Peptidodendrimers im Zellinneren.

Um die Eignung der Dendrimere als Trägermoleküle für Cytostatika zu überprüfen, wurde ihre Cytotoxizität durch Inkubation mit der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 ermittelt. Obwohl diese Untersuchungen noch keine allgemeingültigen Aussagen über Struktur/Wirkungs-Beziehungen erlauben, können jedoch einige interessante Schlüsse gezogen werden. So hat die Oberflächenfunktionalisierung einen entscheidenden Einfluß auf die Dendrimer-Toxizität, wohingegen die innere Struktur der Dendrimere weitgehend unwichtig zu sein scheint. Die meisten der nichtionischen, ungeladenen Dendrimere (z. B. die Boc-geschützten und die vollständig dansylierten Dendrimere **48**, **49** und **50**) sind nicht cytotoxisch, obwohl ihre gute Bioverfügbarkeit durch die Zellaufnahme-Studien gezeigt werden konnte. Ebenso sind die beiden vollständig D/L-2,3-Diaminopropionsäure-terminierten Dendrimere **39** und **43** trotz ihrer positiven Ladungen nicht cytotoxisch. Dies ist vielversprechend, da diese Dendrimere optimale Liganden zur Pt<sup>2+</sup>-Komplexierung tragen und somit als Trägermoleküle für Cytostatika besonders geeignet

erscheinen. Auch ergibt sich aus den erhaltenen Daten, daß positive Oberflächenladungen allein nicht automatisch cytotoxisches Verhalten bedingen, wofür alle bisher veröffentlichten Forschungsergebnisse anderer Gruppen sprechen.

Mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie konnte schließlich gezeigt werden, daß alle dansylierten Dendrimere von eukaryotischen Zellen aufgenommen werden und die Dendrimere über eine Zeitdauer von mindestens 20 Stunden stabil im Cytoplasma der Zellen vorliegen. Dabei befanden sich die vollständig dansylierten Dendrimere **48** und **49** sowie das partiell dansylierte, D/L-2,3-Diaminopropionsäure-terminierte Dendrimer **58** zumeist in Form von ein bis drei größeren Aggregaten mit Durchmessern von 2 - 7 µm in unmittelbarer Nähe des Zellkerns, während das teildansylierte, Propylamin-terminierte Dendrimer **56** in einer eher vesikulären Verteilung mit Vesikelgrößen von 0,5 - 1 µm im Cytoplasma der Zellen vorlag.

Allgemein wurde mit dem Nachweis der Aufnahme der Dendrimere in Tumorzellen, ihrer Stabilität im Cytoplasma und ihrer guten Bioverträglichkeit eine wichtige Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz dieser Systeme als Wirkstoffträger in biomedizinischen Anwendungen geschaffen.

## 5.2 Summary

In the present thesis a set of poly(amidoamine) dendrimers of different generations and with various surface motifs was synthesized, many of which are water soluble. Well developed reactions like the Suzuki-Miyaura crosscoupling and peptide chemistry amide coupling sequences were used for the synthesis of all dendrimers. These procedures yielded dendrons and core building blocks on a multigram scale. The set of dendrimers synthesized in convergent and divergent synthetic strategies consisted of (a) the polycationic, propylamine-terminated dendrimers **26** and **28** of the basic set, (b) the cationic and zwitterionic dendrimers **31a-c** and **35a-c** with the natural amino acids L-methionine, L-phenylalanine, and L-aspartic acid, (c) dendrimers **39** and **43** with ethylenediamine ligands for Pt<sup>2+</sup>-binding, (d) the completely fluorescence-labelled representatives **48**, **49**, and **50**, and (e) dendrimers **56** and **58** with a second functional group besides the fluorescence label (e. g. with ethylenediamine ligands). Additionally a partially dansylated peptide-terminated dendrimer with a potential cathepsin B cleavage site was synthesized. This dendrimer is able to bind anticancer active platinum as well as to selectively release it in the lysosomes of tumor cells by proteolytic degradation.

To evaluate the ability of the synthesized dendrimers to act as carrier molecules for anti-cancer therapeutics their *in vitro* cytotoxicity was investigated by incubation experiments with the human breast cancer cell line MCF-7. Although no general structure/toxicity correlation could be established from the data of this study, some interesting conclusions can nevertheless be drawn. Surface-functionalization obviously is crucial for the inherent dendrimer toxicity, whereas the interior structure of the dendrimers does not seem to play a profound role. Most of the non-charged dendrimers (e. g. the Boc-protected and the completely dansylated dendrimers **48**, **49**, and **50**) were non-toxic although their bioavailability could be proven by the cellular uptake experiments. The same was true for the completely D/L-2,3-diaminopropionic acid-modified dendrimers **39** and **43**, which were not cytotoxic besides their positive charges. This was promising as those dendrimers offer optimal ligands for platinum complexation and are therefore well suitable for a potential use as Pt<sup>2+</sup>-carriers in biomedical applications. Furthermore these data offer the interesting conclusion that positive charges alone do not automatically induce cytotoxicity, which was generally assumed to be true in the current literature.

Finally it could be demonstrated by confocal fluorescence microscopy that all dansylated dendrimers were internalized by eukaryotic cells and stay intracellularly present over a period of at least 20 hours. The completely dansylated dendrimers **48** and **49** as well as the partially dan-

syl- and D/L-2,3-diaminopropionic acid-modified dendrimer **58** were found as one to three aggregates with diameters of 2 - 7  $\mu\text{m}$  next to the nucleus. In contrast, the partially dansylated, propylamine-terminated dendrimer **56** showed a more vesicular distribution pattern in the cytoplasm containing vesicles with diameters of 0.5 - 1  $\mu\text{m}$ .

In general cellular uptake of the dendrimers, their intracellular stability in the cytoplasm, as well as their biocompatibility makes the present set of dendrimers promising candidates for successful future drug-delivery applications.