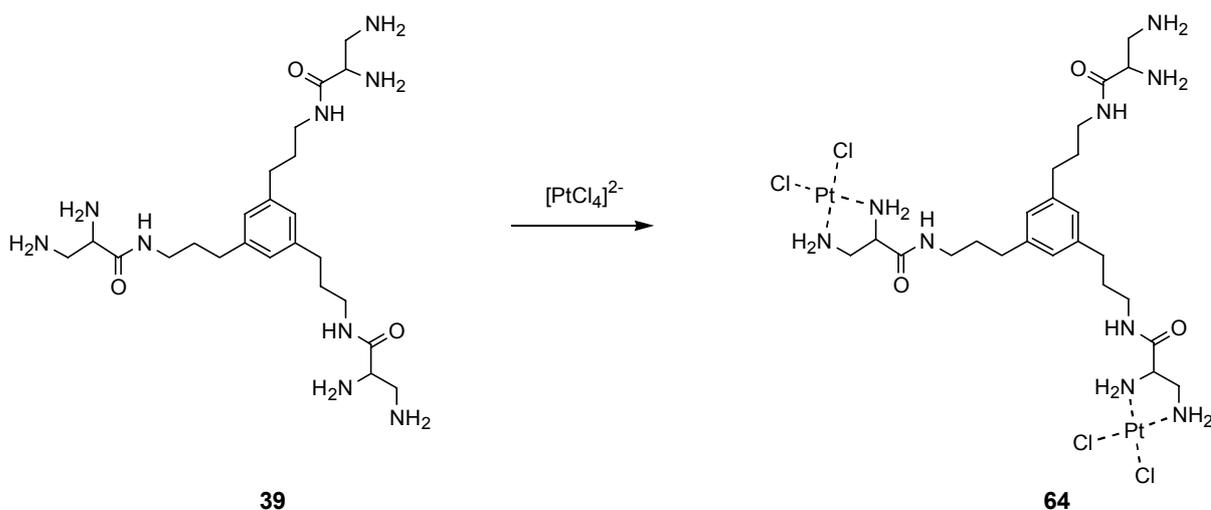


6 AUSBLICK: Platin-Anbindung und proteolytische Spaltung

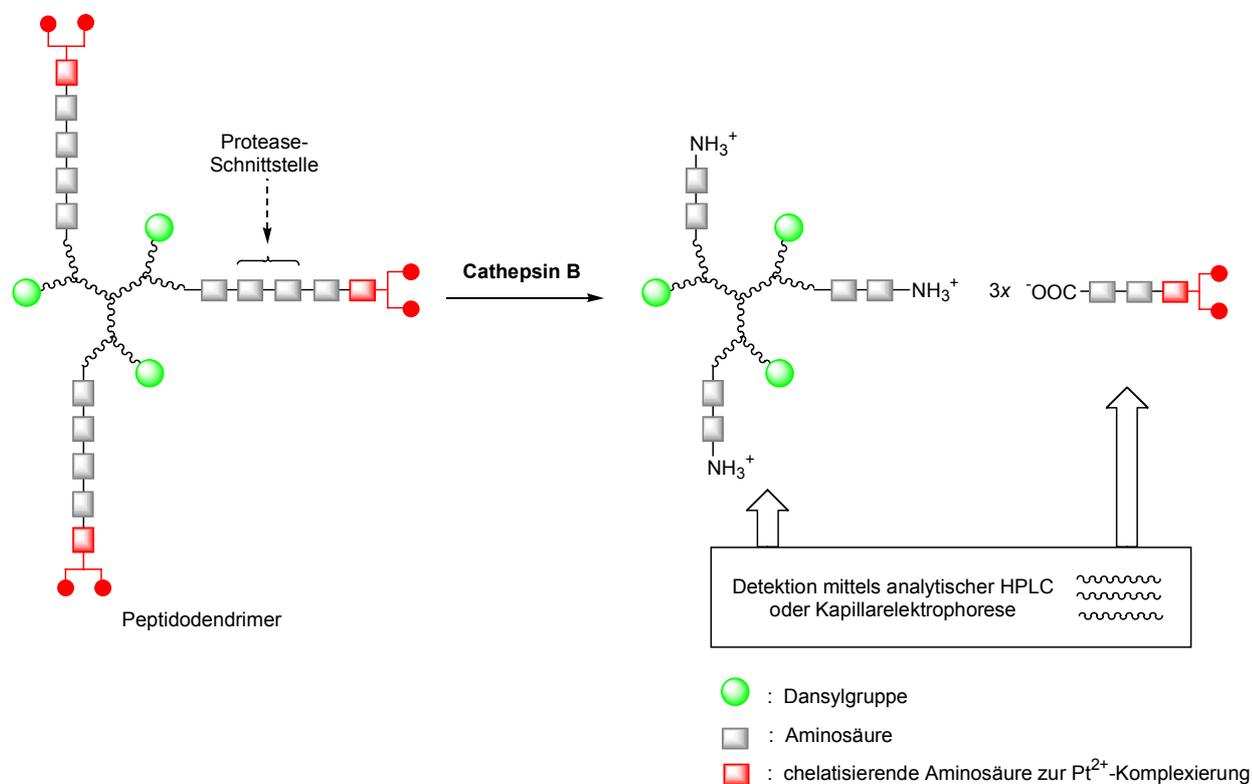
Durch die gute synthetische Zugänglichkeit der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Dendrimere, ihre in vielen Fällen hohe Bioverträglichkeit und ihre Fähigkeit zur Aufnahme in Tumorzellen wurde die Grundlage für die nun notwendigen Platin-Komplexierungen und Wirksamkeitsstudien geschaffen. Besonders geeignete Kandidaten für die Komplexierung von Pt^{2+} -Metallkationen sind neben den L-Methionin- und L-Asparaginsäure-terminierten Dendrimeren aufgrund ihrer nicht vorhandenen Cytotoxizität und guten Ligandeneigenschaften insbesondere die vollständig oder partiell D/L-2,3-Diaminopropionsäure-funktionalisierten Dendrimere **39**, **43** und **58**. In der kooperierenden Arbeitsgruppe *Gust*^{VIIIa} wurden erste Versuche zur Umsetzung des G0-Dendrimers **39** mit Tetrachloro- und Tetraiodoplatinat durchgeführt. Diese lieferten die entsprechenden platinieren G0-Dendrimere mit einem durchschnittlichen Belegungsgrad von zwei Platinatomen pro Dendrimer (Schema 26).^[223] Nachfolgend durchgeführte Aktivitätstests mit dem Platinkomplex-tragenden G0-Dendrimer **64** zeigten eine deutliche anticarcinogene Aktivität des Chloroplatinat-Adduktes in eingesetzten Konzentrationen von 1 - 5 μM .^[224] Analoge Platin-Komplexierungen wurden auch mit dem teildansylierten Dendrimer **55** durchgeführt und verliefen vielversprechend. Besonders interessant wären nun Platin-Anbindungen an das teildansylierte, D/L-2,3-Diaminopropionsäure-terminierte Dendrimer **58** und an das Peptidodendrimer **63** mit potentieller Cathepsin B-Schnittstelle. Letzteres sollte neben einer guten Platin-Anbindung und einer durch sein Fluoreszenzlabel möglichen intrazellulären Lokalisation eine



Schema 26: Komplexierung von Pt^{2+} -Ionen am D/L-2,3-Diaminopropionsäure-terminierten G0-Dendrimer **39**.

selektive Freisetzung der Platinkomplexe in den Tumorzellen ermöglichen.

Um die genannte selektive Freisetzung der gebundenen Platinkomplexe durch die Protease Cathepsin B am Peptidodendrimer **63** nachweisen zu können, müßten zunächst grundlegende proteolytische Spaltungsversuche an diesem Dendrimer durchgeführt werden (Schema 27). Hierbei sollte gezeigt werden können, daß Cathepsin B oder eine analoge Protease mit ähnlichem Spezifitätsmuster (z. B. die kommerziell günstiger erhältliche Cysteinprotease Papain) den Dendrimer-gebundenen Peptid-„Spacer“ tatsächlich spaltet, insbesondere auch dann, wenn der N-terminale Chelatligand bereits Pt^{2+} -Metallionen gebunden hat. Hierzu könnten sowohl analytische HPLC-Techniken als auch Kapillarelektrophorese als Methoden zum Nachweis der Spaltprodukte eingesetzt werden. Erste Verdau-Experimente der L-Methionin-, L-Phenylalanin- und L-Asparaginsäure-terminierten Dendrimere **31a-c** und **35a-c** wurden bereits mit den Proteasen Chymotrypsin, Trypsin, Pepsin und Papain durchgeführt und zeigten eine sequentielle Abspaltung von bis zu drei Komponenten bei den G₀-Dendrimern und eine Abspaltung von bis zu sechs Komponenten bei den entsprechenden G₁-Dendrimern.^[224] Mit optimierten Verfahren müßten solche Protease-Spaltexperimente auch mit dem Peptidodendrimer **63** vor und nach dessen Platin-Komplexierung und vor seinem Einsatz in Zellkultur durchgeführt werden.



Schema 27: Versuch der proteolytischen Spaltung des Peptid-„Spacers“ von Dendrimer **63** mit Cathepsin B und anschließender Detektion der Spaltprodukte.

Tumorzellselektivität könnte weiterhin durch Moleküle erreicht werden, die spezifisch von Krebszellen erkannt und mittels rezeptorvermittelter Endocytose in diese aufgenommen werden, wie dies z. B. bei Folsäure der Fall ist. Dendrimere, deren Oberfläche mit Folsäure funktionalisiert ist, sollten folglich spezifisch von Tumorzellen erkannt und aufgenommen werden, wie schon *Baker et al.* in ihren Untersuchungen zeigen konnten.^[154] Erste Versuche zur Anbindung von Folsäure an die im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten Dendren verliefen vielversprechend, jedoch gestaltete sich die Aufreinigung der Konjugate als schwierig^[225] und wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt. Dennoch sollte die Darstellung von analogen Folsäure-konjugierten Dendrimern durch die Kupplung von Folsäure über eine aktivierte Carboxylfunktion an die Aminogruppen der hier synthetisierten Dendrimere prinzipiell möglich sein. Eine Optimierung der Synthese- und insbesondere der Aufreinigungsprozeduren sollte solche Dendrimere in Zukunft zugänglich machen können.

Um den genauen Aufnahme- und Verteilungsweg der dansylierten, Platin-tragenden Dendrimere in eukaryotischen Zellen aufzuklären, sind weitere kinetische sowie Colokalisationsstudien erforderlich. Gegenfärbungen von Lysosomen, Endosomen und insbesondere des Golgi-Apparates sollten nähere Aufschlüsse über den genauen Verteilungsweg der Dendrimere in eukaryotischen Zellen und deren finalen Bestimmungsort geben können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine Methode zur Synthese und Anbindung von kleinen Peptiden an Dendrimere entwickelt und optimiert werden, so daß neben proteolytisch spaltbaren Peptid-„Spacern“ potentiell auch andere Peptide an die Dendrimer-Grundgerüste des Basis-Satzes oder die „gemischten“ Grundkörper mit zwei funktionellen Gruppen angebracht werden können. Interessant wäre z. B. die Anbindung von Kernlokalisations-Peptiden^[226], die die so funktionalisierten Peptidodendrimere im Prozeß der intrazellulären Verteilung unmittelbar in den Zellkern dirigieren sollten. Mit geeigneten Fluoreszenzmarkern könnte dieser Lokalisationsprozeß dann sichtbar gemacht und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie in den Zellen verfolgt werden.

Da durch die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Gruppe von unterschiedlich oberflächenfunktionalisierten Dendrimern noch keine abschließende Struktur/Wirkungs-Beziehungen für das Verhalten von Dendrimern in eukaryotischen Zellen aufgestellt werden konnte, wäre es schließlich noch von großem Interesse zu untersuchen, wie sich Dendrimere mit identischen Oberflächenfunktionalisierungen aber höherer Generationen in Zellkultur verhalten. Weiterhin müßten zusätzliche Dendrimere mit unterschiedlich funktionalisierten Oberflächen synthetisiert und ihre Cytotoxizität in Zellkultur überprüft werden. So sollten beispielsweise Dendrimere, die nicht-ionische Gruppen (z.B. PEG) zur Löslichkeitsvermittlung in wässrigen Systemen tragen,

deutlich weniger toxisch sein als die hier untersuchten Dendrimere des Basis-Satzes.^{[156], [160], [162]} Erste Untersuchungen an PEG-funktionalisierten Dendrimeren mit ähnlichen Grundkörpern bestätigen diese Erwartung^[227] und stellen somit vielversprechende neue Systeme zum Einsatz als Trägermoleküle für Cytostatika dar.