

**Synthese und Testung neuer  
Dendrimer-Zytostatika-Konjugate**

**Inauguraldissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Ana Maria Scutaru**

aus Iasi, Rumänien

Mai, 2011

Erstgutachter: Prof. Dr. Ronald Gust

Zweitgutachter: Prof. Dr. Gerhard Wolber

Tag der Disputation: 19. Juli 2011

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von September 2004 bis Januar 2009 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Gust am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin.

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Ronald Gust für die Möglichkeit, dieses Thema bearbeiten zu dürfen, die Diskussionsbereitschaft und den gewährten kreativen Freiraum,

Frau Maxi Wenzel für ihre fachliche Hilfe und besonders für die freundschaftliche Unterstützung in guten und schlechten Zeiten,

Herrn Magnus Krüger für seine Diskussionsbereitschaft und für seine fachliche Hilfe bei der Charakterisierung und der Zellaufnahme der fluoreszenzmarkierten Dendrimere,

Frau Heike Scheffler für viele analytische HPLC-Läufe,

den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Analytikabteilung des Instituts für Pharmazie für die Aufnahme der Kernresonanz-, Massen- und Ausführung der Elementaranalysen,

Frau U. Ostwald (Institut für Chemie, FU Berlin) für ihr großes Engagement bei der Anfertigung zahlreicher Massenspektren,

Herrn Jan Richter (Institut für klinische Physiologie, Charité Campus Benjamin Franklin Berlin) für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der fluoreszenzmarkierten Dendrimere,

allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die freundliche Aufnahme und die kollegiale Atmosphäre, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat,

meinem Vater für immer neue Alternativideen, wenn die Synthese nicht mehr geklappt hat,

meiner Familie und meinen Freunden, die immer für mich da waren und die mich unterstützt haben.

## Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
Abb.	Abbildung
ASC-System	Transportsystem mit hoher Affinität für die kurzkettigen neutralen Aminosäuren Alanin, Serin und Cystein
Bend	Bendamustin
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
bzw.	beziehungsweise
CLL	chronische lymphatische Leukämie
DADC	1,12-Diaminododecan
DAH	1,6-Diaminohexan
DAHEPT	1,7-Diaminoheptan
DAOCT	1,8-Diaminooctan
Dansyl	5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonyl
DAP	Diaminopropionsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DDP	cis-Dichlorodiaminoplatin
DDR	Deutsche Demokratische Republik
DIPEA	N-Ethyldiisopropylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EI	electron ionisation (Elektronenstoßionisation; MS)
EPR	enhanced permeability and retention
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	<i>lat.</i> : et alii (und andere)
FAB	fast atom bombardement (weiche Ionisierung; MS)
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

G1, G2, G3, .. (Dendrimer der) ersten, zweiten, dritten, ... Generation

HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (high-performance liquid chromatography)
HSA	Humanalbumin
Iv	intravenös
$\lambda$	Wellenlänge
Mel	Melphalan
MeOH	Methanol
MNBA	<i>m</i> -Nitrobenzylalkohol
MS	Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse pro Ionenladung (MS)
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NMR	Kernresonanzspektroskopie, nuclear magnetic resonance
PAMAM	Poly(amidoamin)
PDT	photodynamische Therapie
PEG	Poly(ethylenglykol)
<i>R<sub>f</sub></i>	Verhältnis der von Substanz und Lösungsmittel zurückgelegten Strecken vom Startpunkt bei der Dünnschichtchromatographie („ratio of fronts“)
RT	Raumtemperatur
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
USA	United States of America
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1. Behandlungsmöglichkeiten bei Krebs.....	1
1.2. Bendamustin und Melphalan – 2 signifikante und individuelle Stickstofflost- Alkylanzien .....	1
1.3. Dendrimere als makromolekulare Carrier-Systeme .....	4
1.4. Synthese von oberflächenfunktionalisierten Poly(amidoamin)-Dendrimere als potentielle Carriermoleküle für Zytostatika .....	6
1.5. Aufgabenstellung .....	8
2. Darstellung der Arbeit.....	10
2.1. Synthese .....	11
2.1.1. Synthese der Zytostatika-Spacer-Derivate .....	11
2.1.2. Synthese der Ethylendiamin-Spacer-Derivate .....	12
2.1.3. Synthese der Dendrimer-Zytostatika-Konjugate.....	13
2.1.4. Synthese der Dendrimer-Spacer-Ethylendiamin-Derivate.....	17
2.1.5. Synthese der Zytostatika-Spacer-Diamin-Derivate.....	20
2.1.6. Synthese weiterer Dendrimere mit Fluoreszenzmarkern .....	22
2.2. Ergebnisse und Diskussion.....	25
2.2.1 Biologische Untersuchungen.....	25
2.2.1.1. Antiproliferative Wirkung der Spacer- und Dendrimer-Konjugate .....	25
2.2.1.2. Antiproliferative Wirkung der Diamin-Derivate.....	29
2.2.1.3. Antiproliferative Wirkung der fluoreszenzmarkierten Dendrimere .....	31
2.2.2. Untersuchungen zur Zellaufnahme von fluoreszenzmarkierten Dendrimeren.....	32
2.2.2.1. Charakterisierung der Fluorophore .....	32
2.2.2.2. Zellaufnahme und intrazelluläre Verteilung der fluoreszenzmarkierten Dendrimere.....	33
2.2.3 Diskussion .....	34
2.3. Ausblick .....	42
3. Zusammenfassung/Abstract .....	43
4. Literatur.....	46
5. Lebenslauf.....	53
Anhang .....	55

# **1. Einleitung**

## **1.1. Behandlungsmöglichkeiten bei Krebs**

Krebs ist eine der Haupttodesursachen weltweit. Gemäß Statistiken der WHO (<http://www.who.int/features/qa/15/en/index.html>), wird sich die Anzahl der globalen Todesfälle durch Krebs zwischen 2007 und 2030 um 45% erhöhen (von 7,9 auf 11,5 Millionen). Dieser Anstieg ist teilweise auch durch eine zunehmende und alternde Weltbevölkerung beeinflusst. Aufgrund der Vielfalt dieser Krankheit ist es unmöglich, ein einziges Heilmittel zu haben. Die Chemotherapie spielt seit Anfang der 40er Jahre eine wichtige Rolle in der Krebsbehandlung. Ein signifikanter Durchbruch wurde mit der Entdeckung der verschiedenen Zytostatikaklassen, z.B. Topoisomerasehemmstoffe, Antimetaboliten, Alkylanzien und anorganischen Analoga (Cyclophosphamid, Melphalan, Cis-, Carbo- und Oxaliplatin) erzielt. Durch den Einsatz von Zytostatika werden jedoch zahlreiche Nebenwirkungen (Nephrotoxizität, Übelkeit, Erbrechen) ausgelöst und folglich weist die Chemotherapie viele Einschränkungen auf. Dies war der Anlass für die Suche nach tolerierbareren Verbindungen mit besserer Selektivität für bösartige Tumoren.

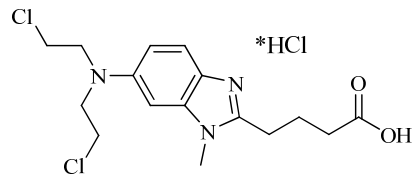
## **1.2. Bendamustin und Melphalan – 2 signifikante und individuelle Stickstofflost-Alkylanzien**

Bendamustin zählt zusammen mit Melphalan und Chlorambucil zu den Stickstoff-Lost-Derivaten aus der Gruppe der Alkylanzien. Es wird vermutet, dass Alkylanzien zwei DNA-Stränge vernetzen und dadurch verhindern, dass diese während der Zellteilung korrekt verdoppelt werden.

Bendamustin ist ein vielversprechendes Medikament im Kampf gegen verschiedene Tumorerkrankungen wie z.B. Morbus Hodgkin, Non-Hodgkin-Lymphom (NHL), chronische lymphatische Leukämie (CLL) und dem Mammakarzinom. Die Struktur von Bendamustin weist 3 Elemente auf: einen Stickstoff-Lost-Rest, einen Purinen-ähnlichen Benzimidazolring mit potentiellen Antimetabolit-Eigenschaften und eine Carbonsäure als Seitenkette, die dem Arzneimittel Löslichkeit verleiht. Sein Wirkungsmechanismus wird zurzeit untersucht, wobei es verschiedene Theorien dazu gibt. Es wird vermutet, dass Alkylanz- und Purin-



Antimetabolit-Eigenschaften, eine wichtige Rolle in der biologischen Aktivität von Bendamustin spielen [1-3].



Bendamustin Hydrochlorid

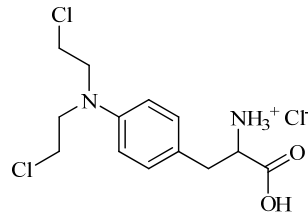
Bendamustin wurde erstmal 1963 von Ozegowski und Krebs [4] synthetisiert. Es war weit verbreitet in der DDR, doch nach der Wiedervereinigung hatte es die Zulassung für die Behandlung gegen Brustkrebs aufgrund unzureichender Sicherheit und Wirksamkeit nach modernen Standards verloren.

Bendamustin hat in den letzten Jahren durch eine Reihe von positiven Studien an verschiedenen lymphatischen Malignomen an Aufmerksamkeit gewonnen. Eine Phase-III-Studie von Rummel et al. [5] zeigte für Bendamustin (90 mg/m<sup>2</sup>) in Kombination mit Rituximab eine Ansprechrates (Responserate) von mehr als 90% und eine komplette Remissionsrate von bis zu 47% bei Patienten mit zuvor unbehandeltem indolentem Mantelzelllymphom. Kahl et al. [6, 7] haben demonstriert, dass Bendamustin (120 mg/m<sup>2</sup>) als Monotherapie eine Ansprechrates von 84% und eine komplette Remission von 32% bei Patienten mit rezidivierendem, Rituximab-refraktärem indolentem NHL induziert. Bendamustin zeigte eine viel höhere Wirksamkeit gegenüber Chlorambucil bei Patienten mit CLL und demzufolge wurde es ab März 2008 auch in den USA für die Therapie gegen CLL zugelassen [8].

Hinsichtlich des Einsatzes von Bendamustin gegen Brustkrebs, wurden neue Erkenntnisse erst in den letzten Jahren erzielt [9, 10]. Die Verabreichung der einmaligen Dosis von 150 mg/m<sup>2</sup> an 2 Tagen in einem 4-wöchigen Zyklus war mit hoher Wirksamkeit aber auch mit einer hohen Toxizität verbunden (Höffken et al. [11]), Reichmann et al. [10] demonstrierten vor kurzem bessere Ergebnisse für eine niedrigere Dosierung von 120 mg/m<sup>2</sup>. Allerdings kann ein Vergleich der Wirksamkeit zwischen den beiden Studien aufgrund der möglichen Unterschiede in den untersuchten Populationen und in der Größe der Studien nur unter Vorbehalt gemacht werden.

Melphalan Hydrochlorid ist ein typisches Alkylanz und wird gegen verschiedene Krebstypen (Ovarialkarzinom, malignes Melanom, Knochenmarkkrebs, Brustkrebs, chronische

myeloische Leukämie) eingesetzt. Seine chemische Struktur enthält 2 funktionelle Gruppen: die Aminosäure Phenylalanin (wichtig für den ‚drug targeting‘ in Tumorzellen durch Aminosäuretransporter) und einen Stickstofflost-Rest (führt zur Quervernetzung der DNA).



Melphalan Hydrochlorid

Der Antitumoreffekt von Melphalan wird auf die Alkylierung von zellulären Nukleophilen, darunter die DNA zurückgeführt. Der aktive Transport von Melphalan in den Zellen kann auf mindestens zwei unterschiedliche Wege erfolgen. Bei niedrigen Konzentrationen, ist die Aufnahme in erster Linie durch ein ASC-System, das auch Alanin, Serin und Cystein transportiert, vermittelt, während bei hohen Melphalan-Konzentrationen das Aminosäure-Transportsystem L (das normalerweise Leucin und andere neutrale Aminosäuren durch die Membran transportiert) überwiegt.

Melphalan wird intravenös als Monotherapie in einer Vielzahl von soliden Tumoren eingesetzt und hat gute Wirkung allein oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen oder mit Bestrahlung bei Therapien gegen Brustkrebs, Eierstockkrebs, Hodenkrebs und multiplem Myelom gezeigt. Neuere Studien weisen auf eine bedeutende Rolle für Melphalan als Teil der Hochdosistherapie bei fortgeschrittenen soliden bösartigen Tumoren hin [12].

Die Aminosäure-Partial Struktur von Melphalan ermöglicht die Modifikation sowohl der  $\text{NH}_2$ - als auch der  $\text{COOH}$ -Gruppen und den Einbau in Peptide. Elson et al. haben gezeigt, dass die Blockierung der freien  $\text{COOH}$ -Gruppe durch Veresterung nicht die biologische Aktivität von Melphalan verringert [13]. Im Gegensatz dazu verursacht die Blockierung der freien  $\text{NH}_2$ -Gruppe durch Formylierung oder Acetylierung eine erhebliche Reduktion der Aktivität, aber keine entsprechende Abnahme der chemischen Reaktivität.

Bei der therapeutischen Anwendung dieser Medikamente werden auch die gesunden Zellen angegriffen und es treten Nebenwirkungen auf (Haarausfall, Übelkeit, Erbrechen). Um die Folgen zu minimieren und die Selektivität und Wirksamkeit der Arzneimittel gegenüber bösartigen Zellen zu erhöhen, wurde in den letzten Jahrzehnten versucht, die Wirkstoffe mit geeigneten Carrier (Trägern) zu koppeln. Zwischen Carrier und Wirkstoff werden Spacer

(Linker) eingebaut, die entweder enzymatisch oder säurekatalytisch gespalten werden können. Demzufolge erfolgt die Freisetzung des Arzneimittels in der Tumorzelle, entsprechend eines ‚drug targeting‘-Konzeptes.

Bereits 1998, haben Kratz et al. Chlorambucil-Protein-Konjugate synthetisiert, um die selektive Freisetzung des Wirkstoffs zu erzielen [14, 15]. Kratz hat einen Maleinimid-Rest an Chlorambucil gebunden und somit die Möglichkeit geschaffen, selektiv den Wirkstoff an die Thiol Gruppen von Carrierproteinen zu binden. Diese Chlorambucil-Maleinimid Derivate wurden dann an Humanalbumin (HSA) gekoppelt. Matsumura et al. [16] und Sinn et al. [17] haben nachgewiesen, dass Albumin besonders in die Tumorzellen aufgenommen wird. Zudem ist Albumin in reiner Form erhältlich, ist nicht toxisch und ist biologisch abbaubar. Kratz et al. haben den Maleinimid-Rest entweder durch einen Ester oder eine Amidbindung an HSA gebunden. Die antiproliferative Wirkung aller Derivate wurde an MCF-7 Mammakarzinom und MOLT4 Leukämiezellen getestet und mit ungebundenem Chlorambucil verglichen. Abhängig von den Spacer wurde eine bessere oder schlechtere Wirkung im Vergleich zu freiem Chlorambucil beobachtet. Vorläufige Studien an Ratten haben gezeigt, dass das mit besserer Wirkung erzielte Derivat, in dem der Maleinimid-Rest über eine Hydrazon-Bindung an die Carboxyl-Gruppe des Chlorambucils gebunden wurde in höheren Dosen als Chlorambucil verabreicht werden konnte.

### **1.3. Dendrimere als makromolekulare Carrier-Systeme**

Dendrimere stellen eine Klasse hochverzweigter Polymere dar, die auch als Carrier für Wirkstoffe verwendet werden können. Anders als herkömmliche Transporter wie Liposomen, werden Dendrimere nicht durch Enzyme im Blut abgebaut und rufen auch keine Immunantwort hervor. Im Vergleich zu anderen klassischen Polymeren und Oligomeren haben Dendrimere einige Vorteile. Sie werden in der Regel nicht durch Polymerisation erhalten und liegen deshalb monodispers vor. An ihrer Oberfläche können verschiedene funktionelle Gruppen lokalisiert sein, so dass Wirkstoffe kovalent oder durch elektrostatische Wechselwirkungen gebunden werden können. Damit können Zytostatika oder Biomoleküle, die unter physiologischen Bedingungen als geladene Spezies vorliegen, in die Zellen transportiert werden. Neben Oberflächeninteraktionen können Wirkstoffe auch in das Innere von Dendrimern aufgenommen werden und Konjugate bilden. Der wichtigste Vorteil von

diesen Polymeren liegt in ihrer Größe. Während kleine Moleküle in alle Zellen gelangen, können Polymere nur durch Pinozytose aufgenommen werden. Dies tritt durch die ungewöhnliche Gefäßstruktur in Tumoren besonders häufig auf; die Tumorzellen sind quasi porös für große Moleküle. Dieses Phänomen ist als der EPR-Effekt (enhanced permeability and retention effect) bekannt. Auf diese Weise können Polymer-Wirkstoff-Konjugate in Tumorzellen angereichert werden, was die systemische Toxizität entscheidend verringert [18, 19].

Dendrimere haben in den letzten Jahrzehnten eine große Bedeutung für medizinische Applikationen gewonnen. Wichtige Fortschritte wurden durch den Einsatz von Dendrimern in der photodynamischen Therapie (PDT), Bor-Neutroneneinfangtherapie oder photothermischen Therapie erzielt. Roovers et al. haben ein amphiphiles Sternpolymer mit einem Polyamidoamin (PAMAM) Kern (core) und Poly( $\epsilon$ -caprolactam) und Poly(ethylenglykol) (PEG) als Verzweigungen entwickelt. Letztere sind dazu geeignet, Fluoreszenzmarker und Wirkstoffe einzuschließen [20]. Das Sternpolymer erwies sich als nicht zytotoxisch und somit ideal als Carrier System. Um die Löslichkeit des Antitumoragens 10-HCPT (10-Hydroxycamptothecin) zu erhöhen, haben Grinstaff et al. den Wirkstoff in einen G4 (Generation 4) Dendrimer, bestehend aus Bernsteinsäure und Glycerol, eingebaut. Die zytotoxischen Studien haben gezeigt, dass die Antitumoraktivität nicht beeinflusst war, während die Löslichkeit in Wasser signifikant gesteigert wurde [21]. Neben dem Einschluss ist es auch möglich, Dendrimer-Wirkstoff-Konjugate durch die Bindung des antineoplastischen Agens an die Endgruppen des Dendrimeres zu bilden.

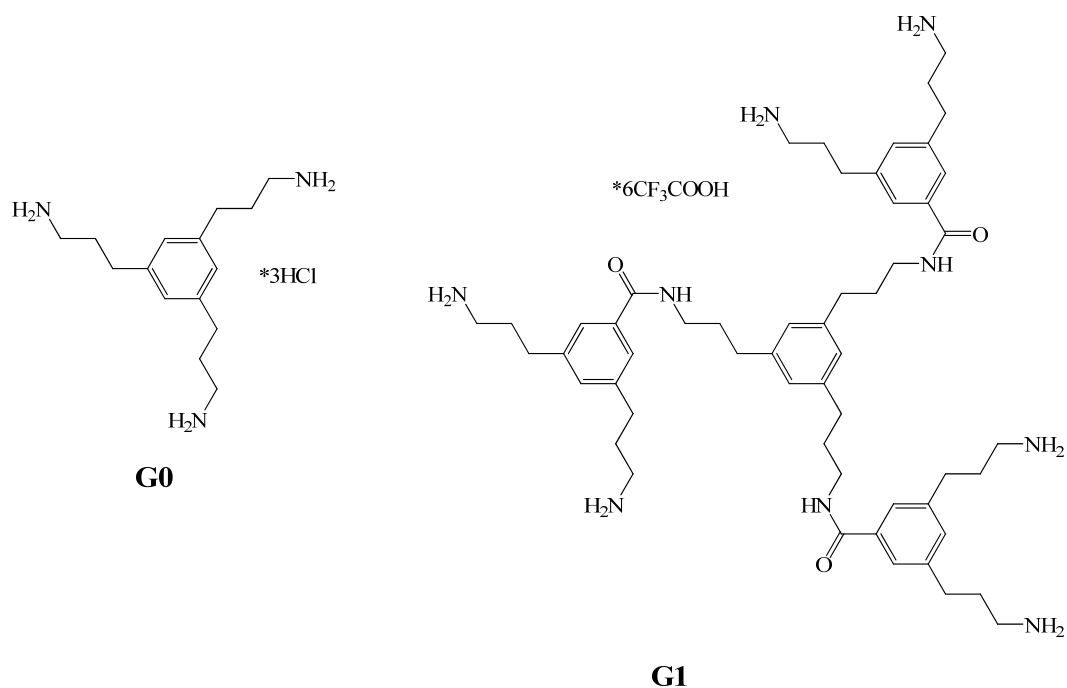
In den letzten Jahren wurden Wirkstoffe an PAMAM-Dendrimere verschiedener Generationen verknüpft, um die Löslichkeit zu verbessern oder um eine selektive Freisetzung des Wirkstoffs zu erzielen. Zum Beispiel, wurde Paclitaxel an ein G4-PAMAM gebunden, was die Löslichkeit von 0,3  $\mu\text{g/mL}$  auf 3,2  $\mu\text{g/mL}$  erhöhte. Die Zytotoxizitätstests an A2780 Human Ovarialkarzinomzellen haben zu einer 10-fachen Reduzierung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes im Vergleich zu dem nicht gebundenen Paclitaxel geführt [22]. Fréchet und Szoka haben ein ‚bow tie‘ Dendrimer-Konjugat synthetisiert, bestehend aus einem 2,2-bis(hydroxylmethyl)propionsäure-Dendrimer (G3) und Doxorubicin, das durch einen Hydrazid Spacer (G4) gebunden wurde. Diese Verbindung zeigte einen höheren Anreicherungsgrad im Kolonkarzinom und eine komplette Tumorregression nach der Behandlung, während nur Doxorubicin selbst keine Heilung bewirkte [23].

Für den Einsatz der makromolekularen Therapie ist es wichtig, den Aufnahmeweg des Carriers zu untersuchen und zu kontrollieren. Dabei werden verschiedene Marker, die analytisch nachweisbar sind, in den Carrier eingeführt. Dazu gehören radioaktive Markierungen mit z.B.  $^{125}\text{I}$  [18, 24-26],  $^{51}\text{Cr}$  [16],  $^{111}\text{In}$  [27-29] oder Fluoreszenzmarkierungen wie Rhodamin [30], Fluorescein [31-34] und Oregon Green [35, 36]. Durch den Einsatz von hochauflösender konfokaler Fluoreszenzmikroskopie ist es möglich, die subzelluläre Verteilung der Moleküle zu bestimmen. Ein Nachteil dieses Prozedere kann die teilweise höhere Zytotoxizität des markierten Moleküls gegenüber der unmarkierten Verbindung sein [24, 36].

Aufgrund der hohen Molekularmasse und Polarität der Dendrimere ist es unwahrscheinlich, dass die Zellaufnahme durch passive Diffusion erfolgt. Daraus resultiert als möglicher Aufnahmemechanismus die Endozytose. Auf diese Weise werden Makromoleküle durch den EPR-Effekt in den Tumor aufgenommen [37]. Der Aufnahmeweg für kationische Verbindungen ist die adsorptive Endozytose (unspezifische Bindung an negativ geladene Zellmembranen). Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass Substanzen ohne Affinität zur Zellmembran bei der Endozytose zusammen mit dem Extrazellulärmedium aufgenommen werden [35, 36, 38, 39].

#### **1.4. Synthese von oberflächenfunktionalisierten Poly(amidoamin)-Dendrimere als potentielle Carriermoleküle für Zytostatika**

In einer früheren Struktur-Wirkungs-Beziehung Studie von Schlüter et al. in Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe wurden Synthesestrategien für neue dendritische Carrier erarbeitet [40]. Durch Einsatz von Fluoreszenzmarkern wurde nachgewiesen, dass die Dendrimere in Tumorzellen angereichert werden. Die Dendrimere des Basis-Satzes bestehen aus einem Kernmolekül, an das Dendren gebunden sind. Die Dendren enthalten jeweils zwei Aminogruppen und eine Carboxylgruppe, die an einer aromatischen Verzweigungseinheit gebunden sind. Somit sind das Kernmolekül und die Dendren durch eine chemisch und thermisch stabile Amidbindung verknüpft. Daraus resultiert ein Schichtaufbau für Dendrimere, wobei jede weitere gebundene Verzweigungseinheit der jeweiligen Generation (**G0**-Kernmolekül, **G1** usw.) des Dendrimers entspricht (Abb. 1).



**Abb. 1:** Struktur der Basis-Dendrimere **G0** und **G1**.

Die Synthese der Dendrimere des Basis-Satzes wurde bereits publiziert [41]. Es wurden Dendrimere verschiedener Generationen und mit unterschiedlichen Oberflächenmotiven synthetisiert: kationische und zwitterionische Dendrimere mit den natürlichen Aminosäuren L-Methionin, L-Phenylalanin und L-Asparaginsäure, Dendrimere mit Ethylendiamin-Chelatliganden zur Pt<sup>2+</sup>-Komplexierung, vollständig fluoreszenzmarkierte Verbindungen und Dendrimere mit einer funktionellen Gruppe (z.B. Ethylendiamin) neben dem Fluoreszenzmarker.

Die antiproliferative Aktivität der neu synthetisierten Dendrimere wurde durch Zytotoxizitätstests an humanen MCF-7 (hormonabhängig) und MDA-MB-231 (hormonunabhängig) Brustkrebszellen ermittelt [41, 42]. Die Ergebnisse der Untersuchungen haben keine Struktur-Wirkungs-Beziehung ergeben. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Oberflächenfunktionalisierung die Dendrimere-Toxizität bestimmt, währenddessen der innere Aufbau der Dendrimere keine Bedeutung zu haben scheint. Die meisten der nichtionischen, ungeladenen Dendrimere (z.B. die Boc-geschützten und die vollständig dansylierten Dendrimere) waren nicht zytotoxisch, ebenso die beiden vollständig D/L-2,3-Diaminopropionsäure-terminierten Dendrimere, trotz ihrer positiven Ladungen. Diese

Ergebnisse sind auch ein Beweis dafür, dass nur positive Oberflächenladungen nicht ohne weiteres zytotoxische Eigenschaften verleihen, wie bislang in der Literatur beschrieben wurde [43-45].

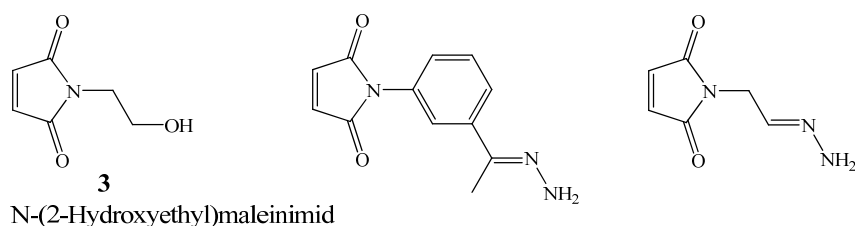
Für die fluoreszenzmarkierten Dendrimere wurde die Zellaufnahme untersucht. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde auch die intrazelluläre Verteilung dieser Dendrimere in eukaryotischen Zellen erforscht. Die Versuche zeigten, dass alle fluoreszenzmarkierten Dendrimere stabil im Zytoplasma der Zellen über eine Zeitdauer von 20 Stunden vorliegen.

## 1.5. Aufgabenstellung

Bendamustin und Melphalan sind beide sehr effektive Zytostatika, ohne jedoch die gewünschte Tumorselektivität zu besitzen. Aus diesem Grunde war die Überlegung, in dieser Arbeit die Selektivität der Wirkstoffe für Tumorzellen zu erhöhen. Entsprechend der Idee von Kratz et al. sollten Bendamustin und Melphalan direkt oder durch einen spaltbaren Maleinimid Spacer an die Dendrimere gebunden werden.

In der vorliegenden Arbeit sollten die in der Abbildung 1 präsentierten Dendrimere als Carrier für Bendamustin und Melphalan eingesetzt werden. Die **G0** und **G1** Dendrimere zeigten *in vitro* keine Zytotoxizität an MCF-7 und MDA-MB-231 Brustkrebszelllinien und waren somit als Carrier geeignet. Die Wirkstoffe sollten entweder direkt oder mittels eines Spacers an **G0** und **G1** gebunden werden.

Als Spacer waren zunächst 3 verschiedene Verbindungen in Betracht gezogen worden (Abb. 2). Diese wurden bereits von Kratz et al. synthetisiert und charakterisiert [46]. Aufgrund der Instabilität der Hydrazon-Bindung in dem Spacer unter den Reaktionsbedingungen, wurde zunächst nur N-(2-Hydroxyethyl)maleinimid (**3**) zur Synthese eingesetzt.



**Abb. 2:** Struktur des eingesetzten Spacers (**3**).

Für die Untersuchung der Zellaufnahme und der intrazellulären Verteilung in den Zellen sollten verschiedenen Fluoreszenzmarker eingebaut werden und ihre Eigenschaften analysiert werden. Die Optimierung der Fluoreszenzmarkierung sollte zu einem besseren Verständnis des Wirkmechanismus von fluoreszenzmarkierten Zytostatika-Dendrimer-Derivaten führen.

Zur weiteren Optimierung der *in-vitro*-Zytotoxizität von Bendamustin und Melphalan sollten andere Carriersysteme untersucht werden. Aufgrund der positiven Ergebnisse der aminoterminierten Dendrimere und der erhöhten Akkumulation der Diaminoalkyl-gebundenen Platin-Verbindungen sollten zwei N-(2-Hydroxyethyl)maleinimid-Zytostatika-Konjugate mit Diaminen mit variabler Kettenlänge (1,6-Diaminohexan (DAH), 1,7-Diaminoheptan (DAHEPT), 1,8-Diaminooctan (DAOCT) und 1,12-Diaminododecan (DADC)) zu bivalenten Zytostatika-Derivaten gekoppelt werden.

Für die neu synthetisierten Verbindungen sollte die Antitumoraktivität in Zytotoxizitätstests an den MCF-7 und MDA-MB-231 Brustkrebszelllinien untersucht werden.



## 2. Darstellung der Arbeit

Die Arbeit wurde in den folgenden Publikationen niedergelegt:

1. Scutaru, Ana Maria, Wenzel, Maxi, Scheffler, Heike, Wolber, Gerhard und Gust, Ronald, *Optimization of the N-Lost Drugs Melphalan and Bendamustine: Synthesis and Cytotoxicity of a New Set of Dendrimer-Drug Conjugates as Tumor Therapeutic Agents*. *Bioconjugate Chem.*, 2010. **21**(10): p. 1728–1743.  
<http://dx.doi.org/10.1021/bc900453f>
2. Scutaru, Ana Maria, Wenzel, Maxi und Gust, Ronald, *Bivalent bendamustine and melphalan derivatives as anticancer agents*. *Eur. J. Med. Chem.*, 2011. **46**: p. 1604–1615.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.02.008>
3. Scutaru, Ana Maria, Krüger, Magnus, Wenzel, Maxi, Richter, Jan und Gust, Ronald, *Investigations on the Use of Fluorescence Dyes for Labeling Dendrimers: Cytotoxicity, Accumulation Kinetics, and Intracellular Distribution*. *Bioconjugate Chem.*, 2010. **21**(12): p. 2222–2226.  
<http://dx.doi.org/10.1021/bc1001906>

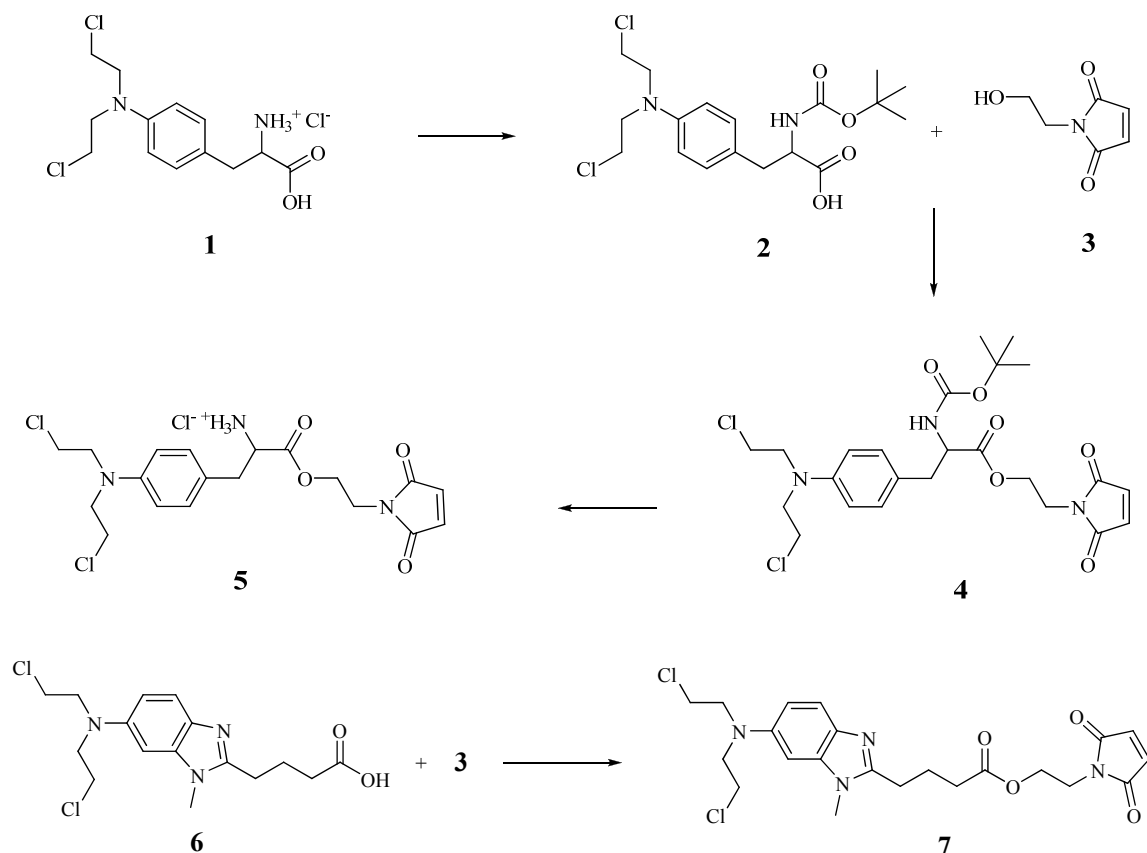
Um die vollständigen Publikationen zu lesen folgen Sie bitte den DOI Links.

## 2.1. Synthese

### 2.1.1. Synthese der Zytostatika-Spacer-Derivate

Die Synthesestrategie umfasste zunächst die Bildung der Wirkstoff-Spacer-Derivate und anschließend die Kopplung an die Dendrimere.

L-Melphalan Hydrochlorid (**1**) wurde Boc geschützt (**2**) und mittels einer Steglich Reaktion mit dem N-(2-Hydroxyethyl)maleinimid Spacer (**3**) verestert. Verbindung **4** wurde nach Säulenchromatographie als reines Produkt erhalten. Durch Zugabe von 25%-iger Salzsäure ließ sich dann aus dem Ester **4** die Boc-Schutzgruppe entfernen und es wurde die Substanz **5** erhalten (Schema 1). Bendamustin Hydrochlorid wurde zunächst in die freie Base **6** überführt [47] und anschließend über einen ähnlichen Verlauf wie bei dem Melphalan-Spacer-Derivat zu **7** umgewandelt (Schema 1).

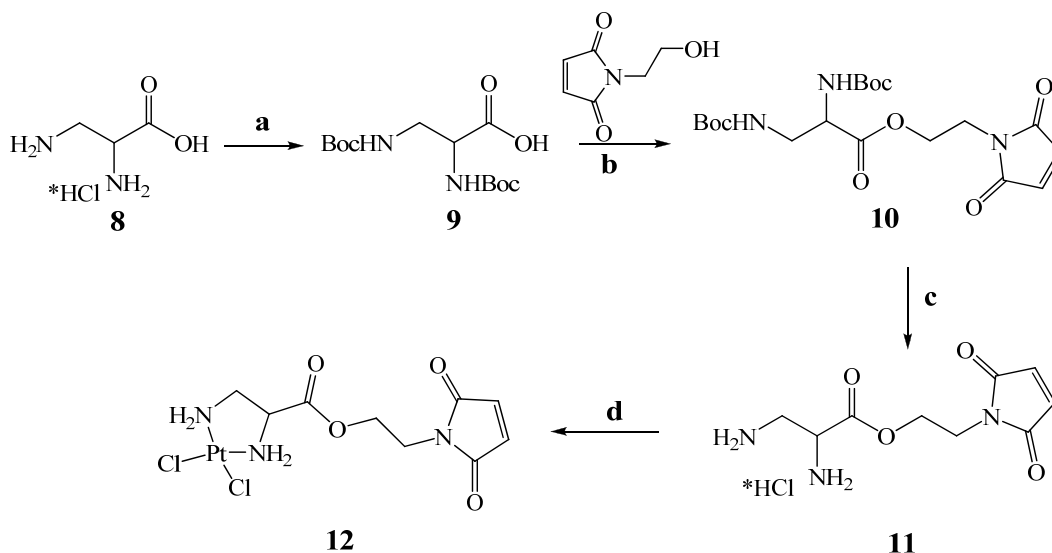


**Schema 1:** Synthese der Wirkstoff-Spacer Derivate.

## 2.1.2. Synthese der Ethylendiamin-Spacer-Derivate

Für die potentielle Anbindung von antikarzinogen wirksamen  $\text{Pt}^{2+}$  Einheiten an dendritische Carriermoleküle wurde in der früheren Arbeit von Fuchs [40, 41] ein leicht zugänglicher Ligand benutzt, über den die Metallionen in einer Cisplatin-artigen Weise an der Dendrimeroberfläche komplexiert wurden. Hierzu wurde die kommerziell erhältliche, nichtproteinogene Aminosäure D/L-2,3-Diaminopropionsäure ausgewählt. Ausgehend von dieser Verbindung wurden Ethylendiamin-terminierte Dendrimere synthetisiert, die keine Antitumoraktivität aufwiesen. In der vorliegenden Arbeit war es interessant zu untersuchen, ob die Einführung des N-(2-Hydroxyethyl)maleinimid Spacers einen Einfluss auf die Antitumoraktivität der Dendrimer-Ethylendiamin-Derivate hat.

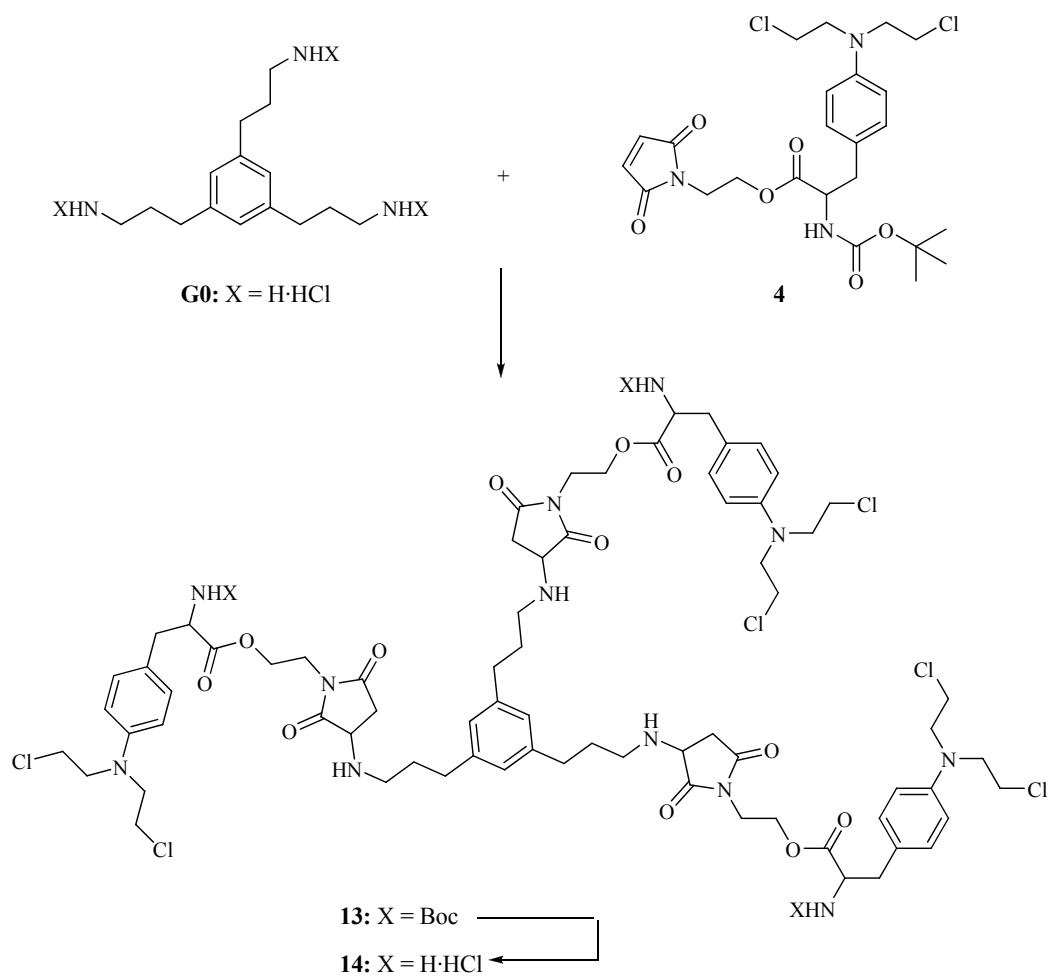
Für die Synthese des Ethylendiamin-Spacer-Derivates wurde zuerst die D/L-2,3-Diaminopropionsäure (DAP, **8**) Boc-geschützt und mit dem N-(2-Hydroxyethyl)maleinimid Spacer gekoppelt (Schema 2). Nach Entfernung der BOC-Gruppen des Ethylendiamin-Esters **10** konnte dann Verbindung **11** leicht mit  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$  zum Platinkomplex **12** umgesetzt werden.



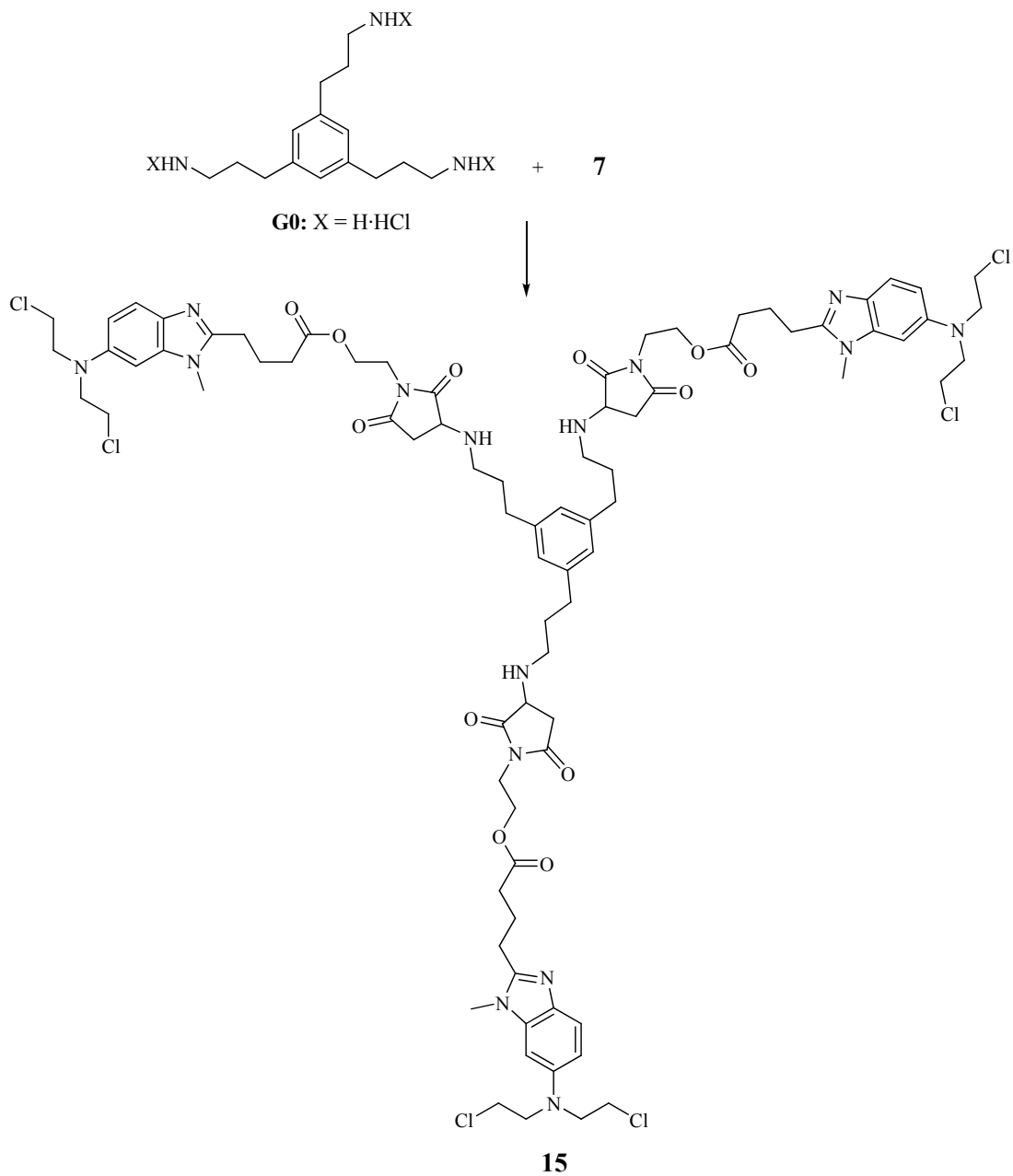
**Schema 2:** Synthese der Ethylendiamin-Spacer-Derivate. Reagenzien und Synthesebedingungen: a) DAP,  $\text{Boc}_2\text{O}$ , TEA, Wasser, RT, 20 h; b) **9**, **3**, DCC, DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , RT, 20 h; c) **10**, wässrige HCl, THF, RT, 24 h; d) **11**,  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$ , Wasser (unveröffentlichte Ergebnisse, für Strukturaufklärung siehe Anhang 1).

### 2.1.3. Synthese der Dendrimer-Zytostatika-Konjugate

Die Bindung an die Dendrimerere erfolgte im letzten Schritt der Synthese durch den Angriff der endständigen nukleophilen Gruppen des Dendrimers am Maleinimid-Rest des Wirkstoff-Spacer-Derivates. Hierfür wurden die Edukte in Chloroform gelöst und dann unterschiedlich lang refluxiert. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe in den Melphalan-Derivaten wurde mit 25%-iger HCl oder 95%-iger Trifluoressigsäure (TFA) durchgeführt. Schemas 3 und 4 stellen die Synthese der **G0**-Dendrimer-Konjugate dar.

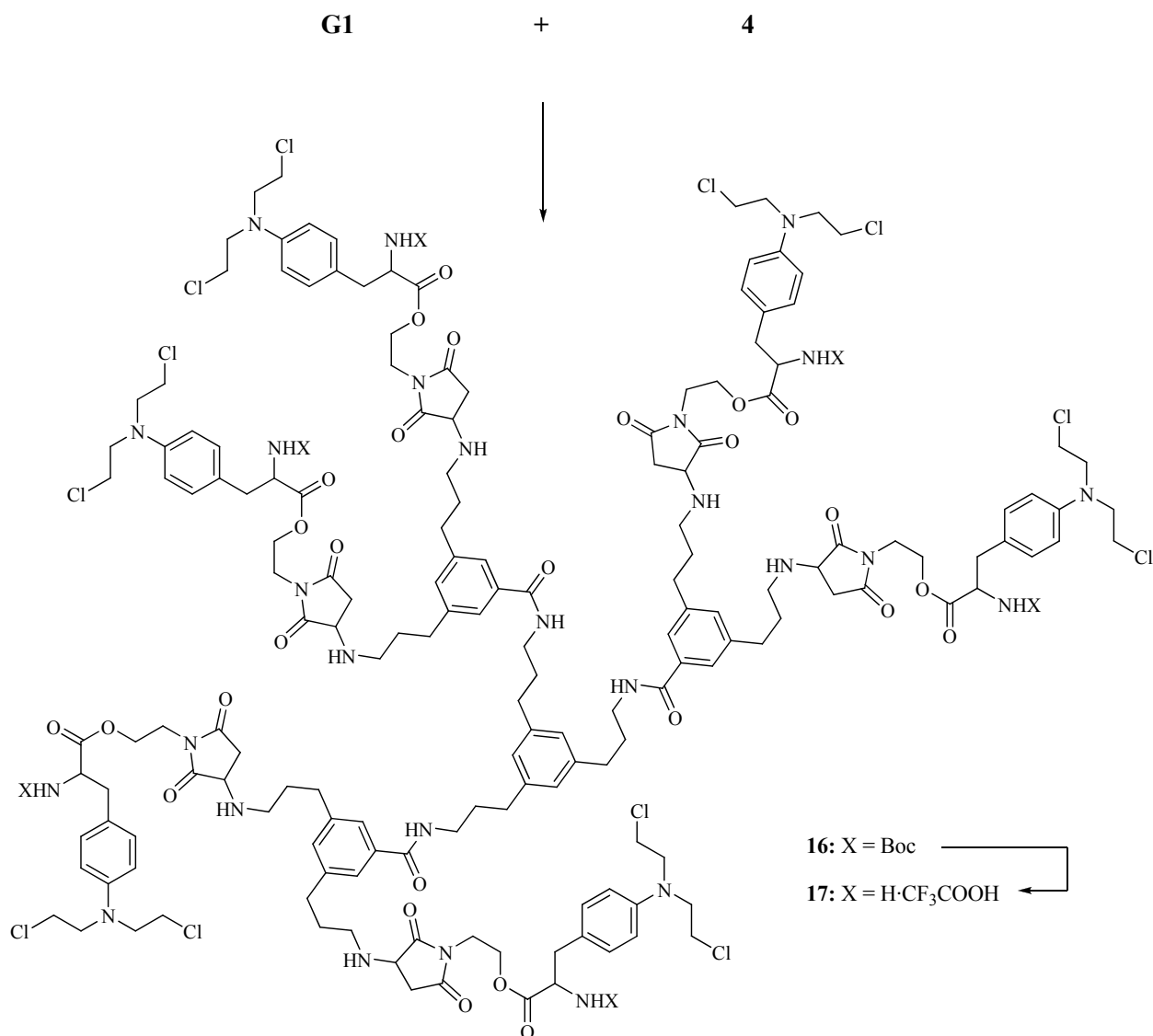


**Schema 3:** Synthese der Mel-Spacer-terminierten **G0**-Dendrimerere (Mel = Melphalan).



**Schema 4:** Synthese des Bend-Spacer-terminierten **G0**-Dendrimers **15** (Bend = Bendamustin).

Die Bindung des Melphalan-Maleinimid Derivates an das **G1** Dendrimer wurde durch einen ähnlichen Syntheseweg durchgeführt (Schema 5).

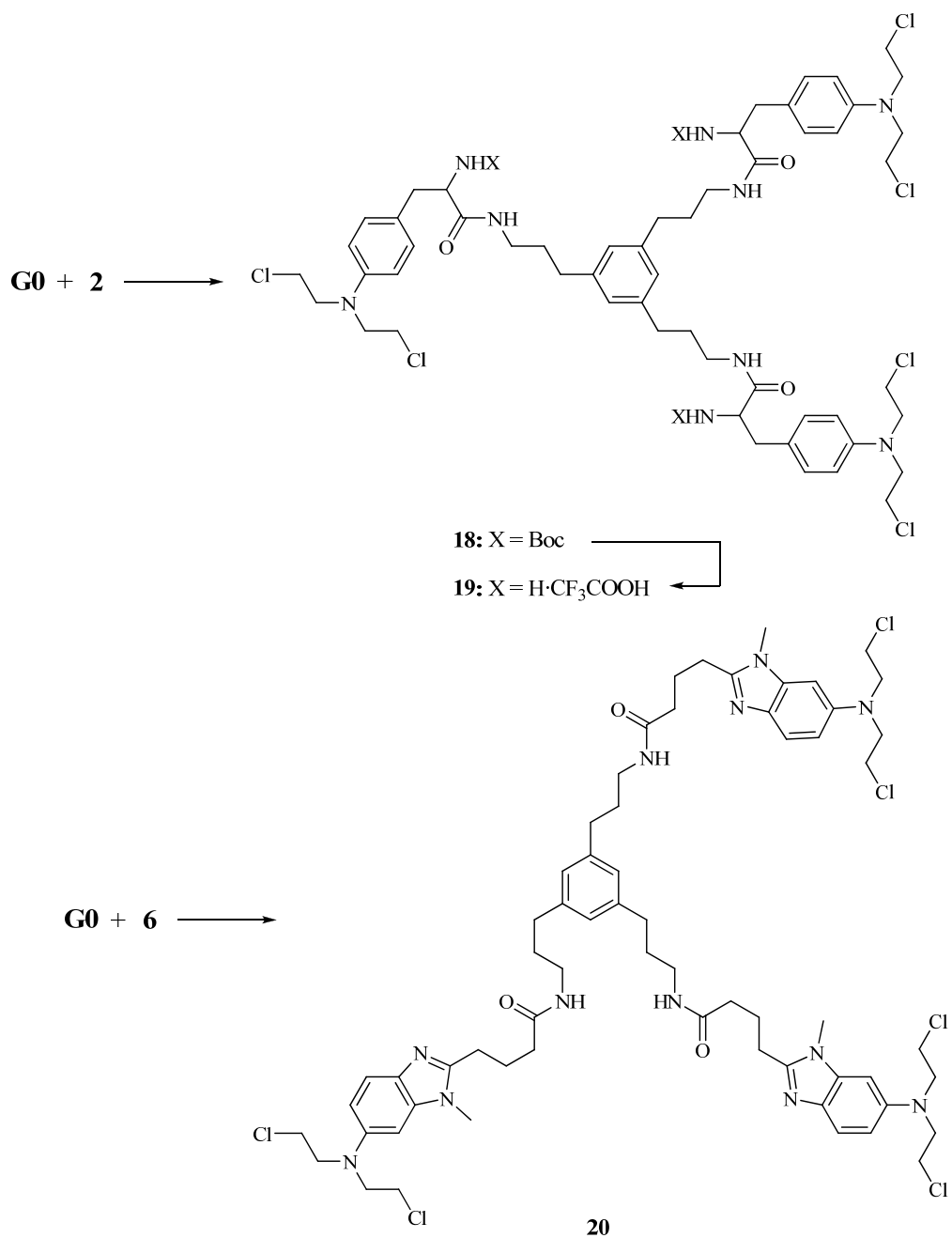


**Schema 5:** Synthese der Mel-Spacer-terminierten **G1**-Dendrimere.

Die Versuche Bendamustin entweder direkt oder durch den Spacer an das **G1**-Dendrimer zu koppeln, haben unter den angegebenen Reaktionsbedingungen nicht zu den erwarteten Verbindungen geführt.

Um den Einfluss des Spacers auf die Wirkung der Derivate zu untersuchen, wurden die Zytostatika auch direkt über eine Amidbindung an die Dendrimere gekoppelt (Schemas 6 and 7). Die aus der Peptidchemie bekannte Amidbindungsknüpfung läuft über eine aktivierte Carbonsäuregruppe. Die Aktivierung der Carboxylfunktion erfolgt mittels so genannter „Kupplungsreagenzien“, die als reaktive Intermediate entweder gemischte Anhydride oder

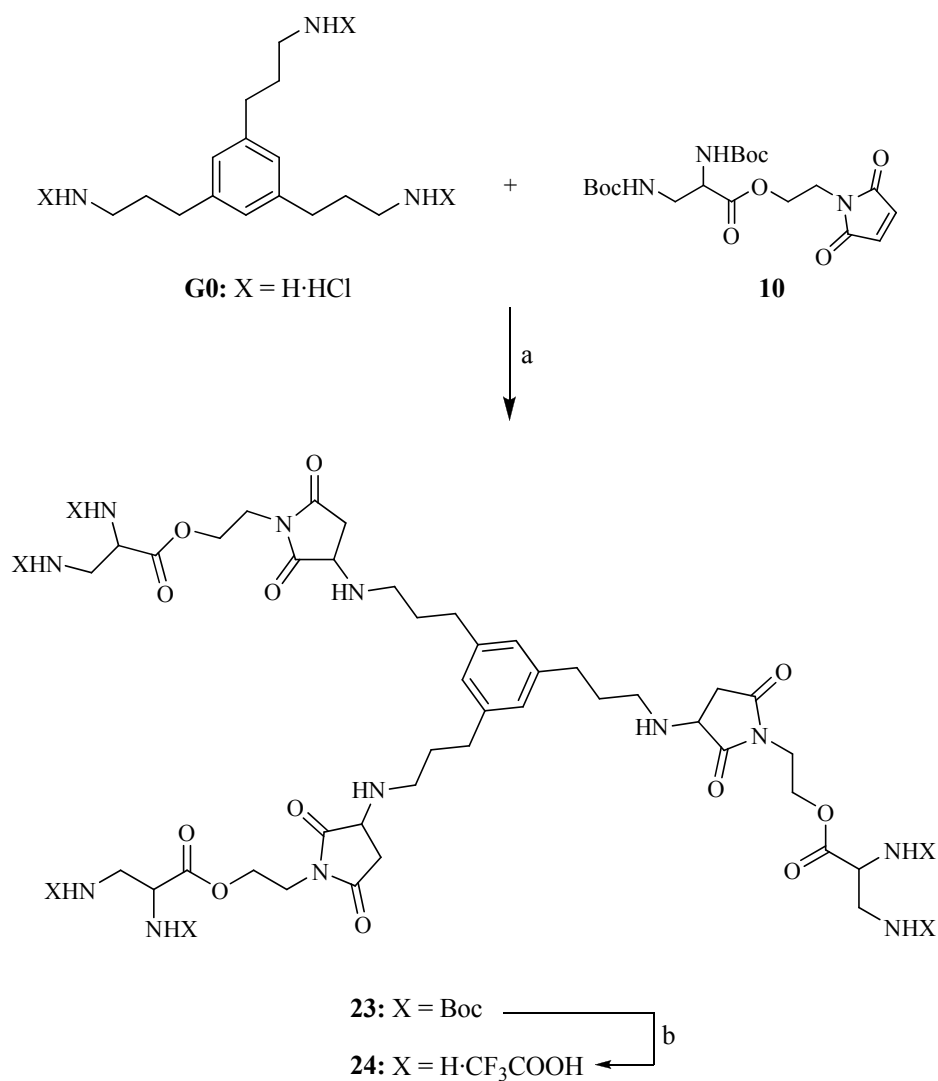
Aktivester bilden (für den Mechanismus der Amidbindungsknüpfung und die verwendeten Reagenzien siehe Literaturhinweise [41, 48-50]).



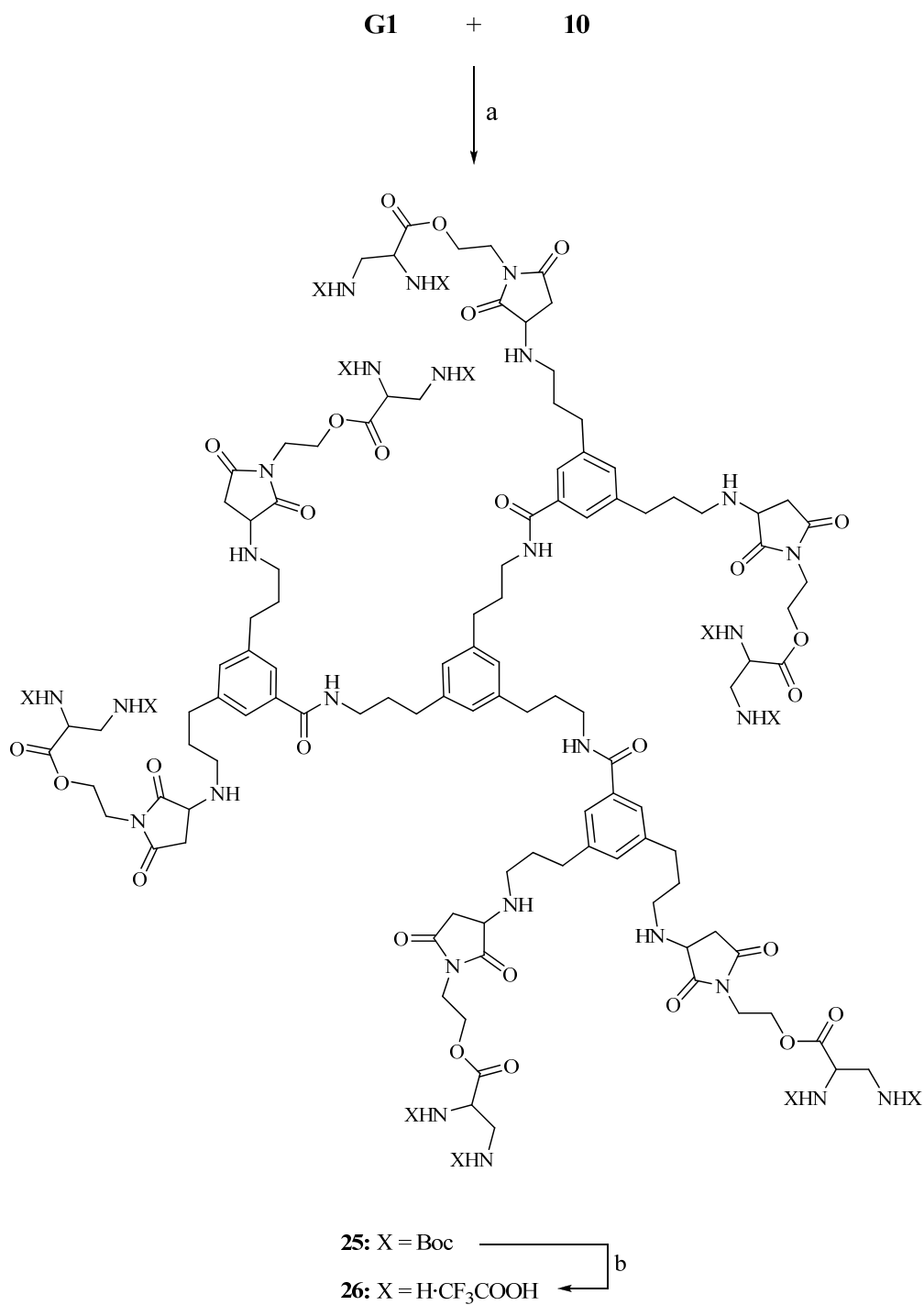
**Schema 6:** Synthese der Wirkstoff-terminierten **G0**-Dendrimere.







**Schema 8:** Synthese der Ethylen-diamin-Spacer-Derivate der **G0**-Dendrimere. Reagenzien und Synthesebedingungen: a) **G0**, **10**, DIPEA, Chloroform, Rückfluss, 43 h; b) **23**, TFA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , RT, 1 h (unveröffentlichte Ergebnisse, für Strukturaufklärung siehe Anhang 1).

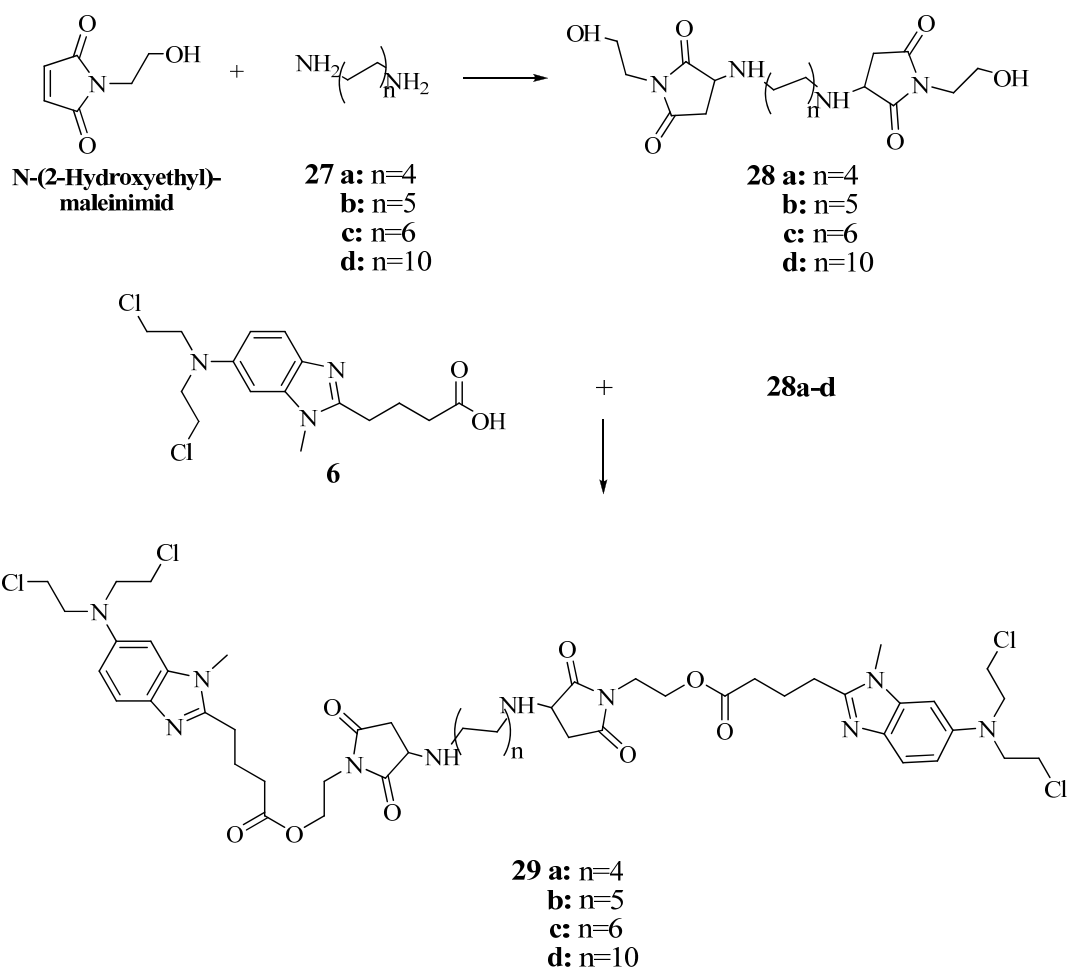


**Schema 9:** Synthese der Ethylendiamin-Spacer-Derivate der **G1**-Dendrimere. Reagenzien und Synthesebedingungen: a) **G1**, **10**, DIPEA, Chloroform, Rückfluss, 48 h; b) **25**, TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 3 h (unveröffentlichte Ergebnisse, für Strukturaufklärung siehe Anhang 1).

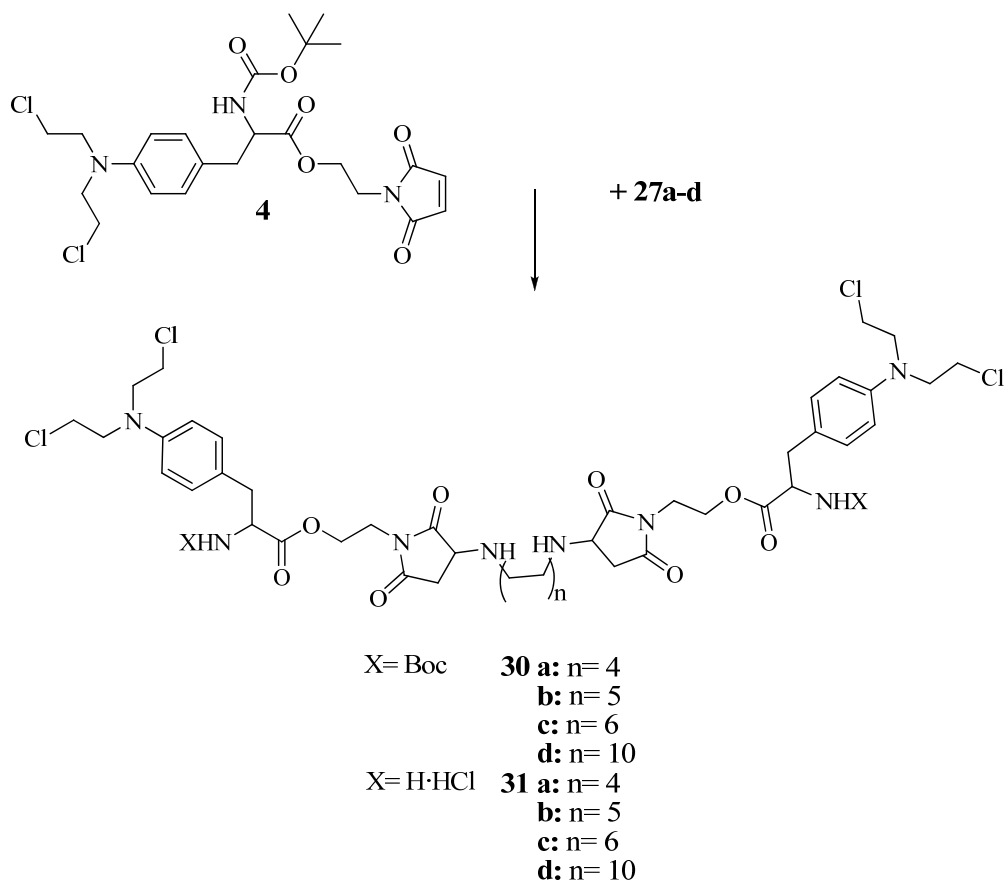
Die Versuche die Ethylendiamin-Derivate **24** und **26** zu den entsprechenden Platinkomplexen umzusetzen, haben in den angegebenen Reaktionsbedingungen nicht zu den erwarteten Verbindungen geführt.

### 2.1.5. Synthese der Zytostatika-Spacer-Diamin-Derivate

Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Selektivität der Wirkstoffe für die Tumorzellen zu erhöhen, indem ein geeigneter Carrier eingesetzt werden sollte, der zum ‚drug targeting‘ führen sollte. Zur Optimierung der Antitumoraktivität von Melphalan und Bendamustin wurden neben den Dendrimeren, Diamine (1,6-Diaminohexan, 1,7-Diaminoheptan, 1,8-Diaminooctan und 1,12-Diaminododecan) als Spacer eingesetzt und bivalente Zytostatika-Spacer-Diamin-Derivate synthetisiert. Für die Synthese dieser Verbindungen wurden abhängig von dem Zytostatikum (Melphalan oder Bendamustin) zwei Herangehensweisen angewendet. Für die Bildung der Bendamustin-Diamin-Derivate **29a-d** (Schema 10) wurden primär die Diamine mit dem N-(2-Hydroxyethyl)maleinimid zur Reaktion gebracht und die daraus resultierenden Verbindungen **28a-d** wurden ohne Auftrennung in den optisch reinen Isomeren weiter in einer Steglich Veresterung mit dem Bendamustin als freie Base umgesetzt. Die zweite Vorgehensweise umfasste in dem ersten Schritt die Reaktion des Boc-geschützten L-Melphalans mit dem Spacer, anschließend, nach nukleophiler Addition der Diamine an die Doppelbindung des Maleinimid-Restes und Entschützung, wurden die Melphalan-Diamin-Derivate **30a-d/31a-d** erhalten (Schema 11).



**Schema 10:** Synthese der Bend-Spacer-Diamin-Derivate.



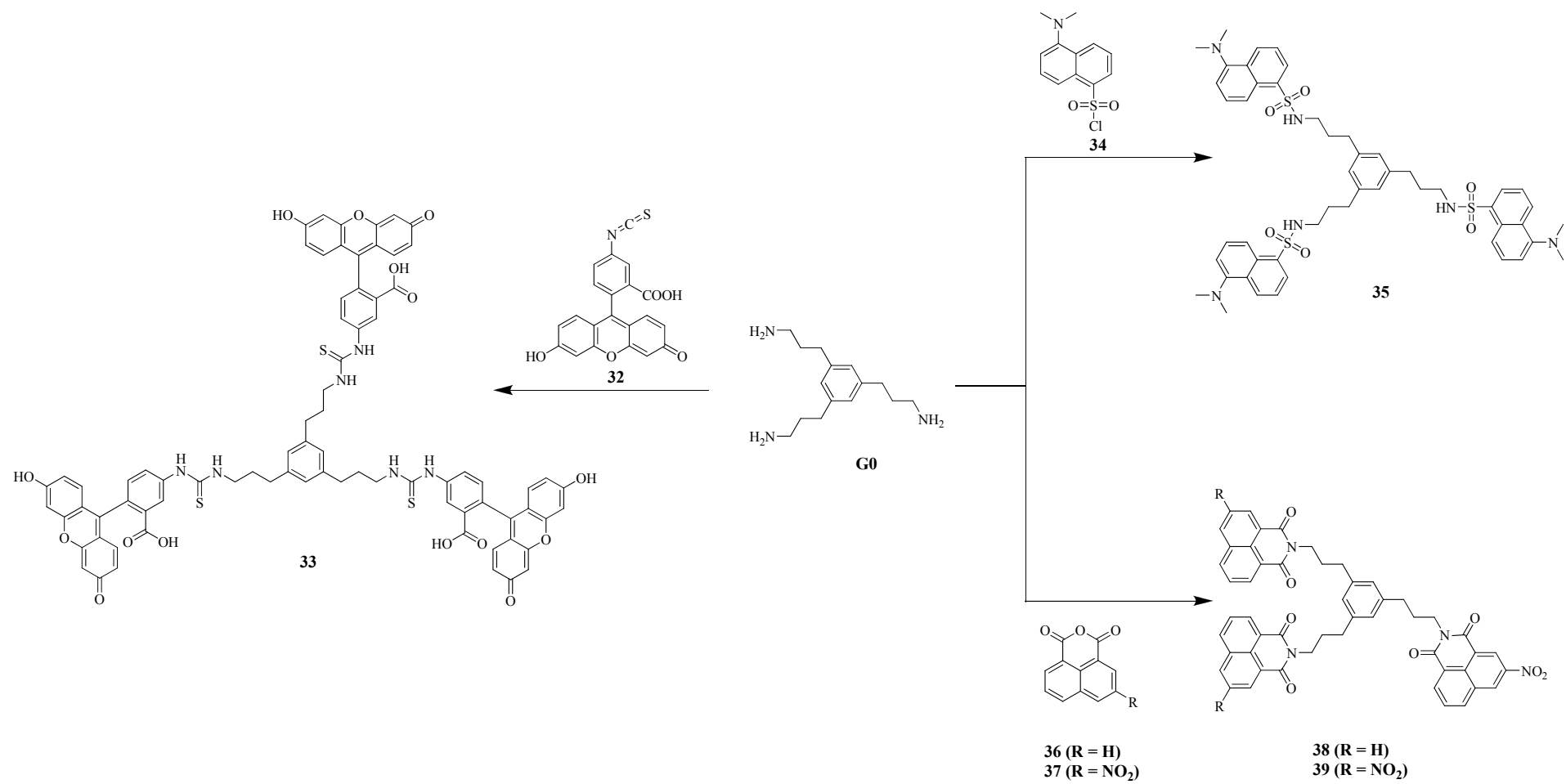
**Schema 11:** Synthese der Mel-Spacer-Diamin-Derivate.

### 2.1.6. Synthese weiterer Dendrimere mit Fluoreszenzmarkern

Für die vorliegende Arbeit war von Interesse, Fluoreszenzmarker an die Basis-Dendrimere zu binden und die Zellaufnahme zu untersuchen. Ferner war die Überlegung, „gemischte“-Dendrimere (mit Fluoreszenzmarker und Zytostatika) zu synthetisieren. Als Fluorophore wurden Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Naphthalimid und Nitronaphthalimid ausgewählt. FITC wird vielfach als Proteinmarker in der Biologie und Medizin eingesetzt. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Naphthalimid-Derivate eine antiproliferative Wirkung an verschiedenen Krebszelllinien aufweisen und mit der DNA interagieren können [51]. Für die Zellaufnahme-Untersuchungen ist es allerdings erforderlich, dass die fluoreszenzmarkierten Verbindungen selbst keine Antitumoraktivität aufweisen. Trotz dieser ‚Anforderungen‘ schien von Interesse, entsprechende Naphthalimid-Derivate ausgehend von den **G0** und **G1** Dendrimern zu synthetisieren und pharmakologisch zu untersuchen. Ferner war die

Überlegung, die Zellaufnahme dieser Konjugate zu studieren und wenn möglich „gemischte“-Dendrimere zu bilden.

Es wurden zunächst die fluoreszenzmarkierten Dendrimere mit dem Kernmolekül (**G0**) gekoppelt. Die höheren, vollständig markierten Generationen, konnten aufgrund geringer Löslichkeit nur sehr schwer charakterisiert werden. Die Synthese des Dansyl Derivates **35** (Schema 12) wurde bereits in einer früheren Arbeit beschrieben [41]. Das FITC-Derivat **33** konnte durch Rühren von **G0** und FITC, gelöst in DMSO, gewonnen werden. Für die Synthese der Naphthalimide-Konjugate **38** und **39** wurden die Reagenzien in Ethanol absolut refluxiert (Schema 12).



**Schema 12:** Synthese der Fluoreszenzmarkierten Dendrimere.

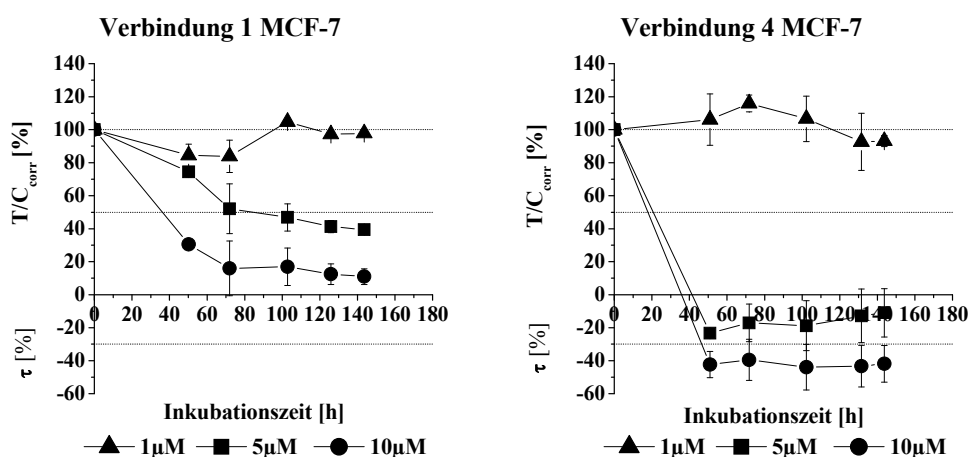
## 2.2. Ergebnisse und Diskussion

### 2.2.1 Biologische Untersuchungen

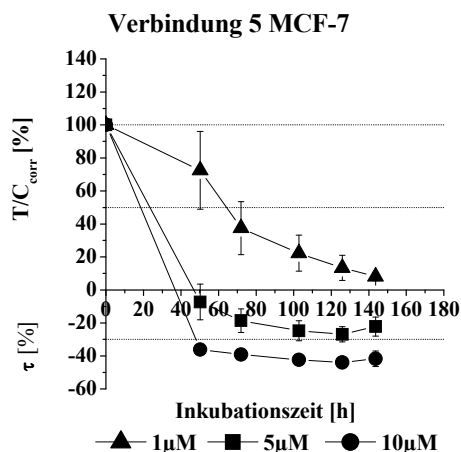
Die antiproliferative Wirkung der neu synthetisierten Verbindungen wurde in zeitabhängigen Zytotoxizitätstests an humanen MCF-7 und MDA-MB-231 Brustkrebszellen untersucht. Cisplatin (DDP) wurde als positive Kontrolle verwendet. Die Dendrimere des Basis-Satzes wurden im Vorfeld in den Konzentrationen von 1, 5 und 10  $\mu\text{M}$  an beiden Zelllinien getestet [41, 42]. Die Zelltests haben keine Wirkung im Fall von **G0** gezeigt und bei **G1** wurde eine sehr schwache Hemmung des Zellwachstums in der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ( $T/C_{\text{corr}} = 60\%$ ) beobachtet. Generell wurde keine Selektivität für eine der beiden Zelllinien festgestellt.

#### 2.2.1.1. Antiproliferative Wirkung der Spacer- und Dendrimer-Konjugate

Die Bindung von Melphalan an den Spacer hatte die Erhöhung der Zytotoxizität zur Folge. Das geschützte Mel-Spacer Derivat **4** zeigte in den Konzentrationen von 5 und 10  $\mu\text{M}$  schon nach 48 h zytozide Effekte (Abb. 3). Die Entfernung der Boc-Schutzgruppe führte beim Maleinimid-Ester **5** zu einer 10-fach höheren Wirkung am Ende des Zytotoxizitätstests ( $T/C_{\text{corr}} \approx 0\%$ ; Konzentration 1  $\mu\text{M}$ ) im Vergleich zum Melphalan Hydrochlorid (**1**) (Abb. 3).

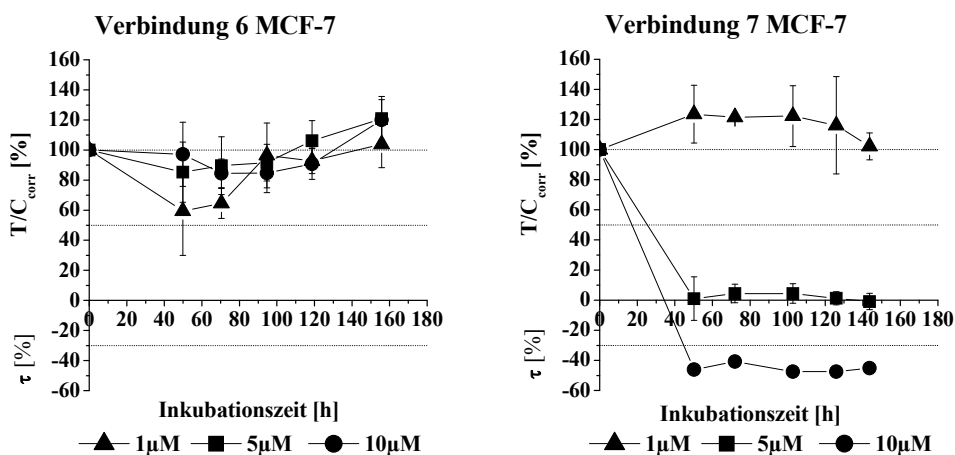






**Abb. 3:** *In vitro* Zytotoxizität des Melphalan Hydrochlorids (**1**) und der Melphalan-Spacer Derivate **4** und **5** an der MCF-7 Zelllinie.

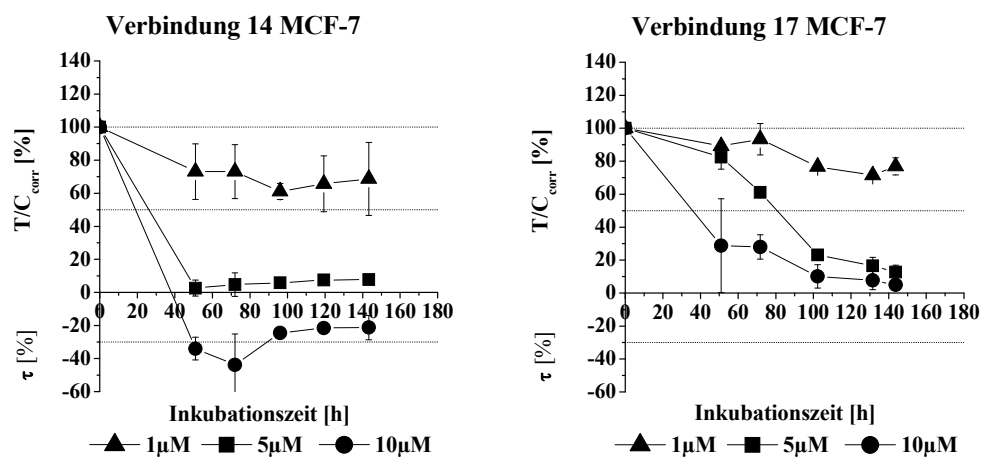
Während Bendamustin (**6**) keinen Einfluss auf das Zellwachstum ausübte, zeigte das Bendamustin-Spacer Derivat **7** zytotoxische Effekte in der Konzentration von 5 µM ( $T/C_{\text{corr}} = 0\%$ ) und zytozide Effekte in der Konzentration von 10 µM ( $T/C_{\text{corr}} < 0\%$ ) (Abb. 4).



**Abb. 4:** *In vitro* Zytotoxizität des Bendamustins (**6**) und des Bendamustin-Spacer Derivates (**7**) an der MCF-7 Zelllinie.

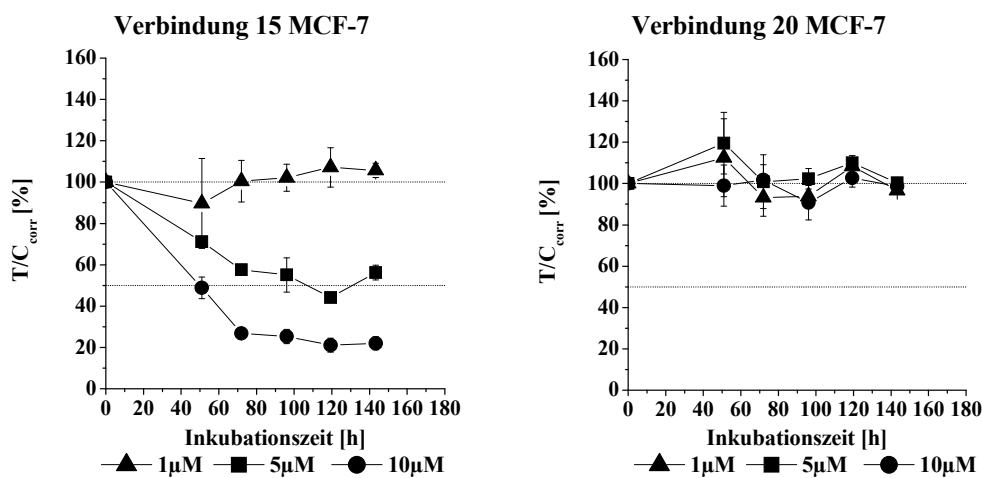
Die Bindung der Zytostatika-Spacer-Konjugate an die Dendrimere führte zu einer Reduktion der antiproliferativen Wirkung in Abhängigkeit von der Dendrimergeneration. Das

Melphalan-Spacer-Derivat (**5**) zeigte eine bessere Antitumoraktivität als Verbindung **14** und diese selbst eine höhere Wirkung als **17** (Abb. 3 und 5).



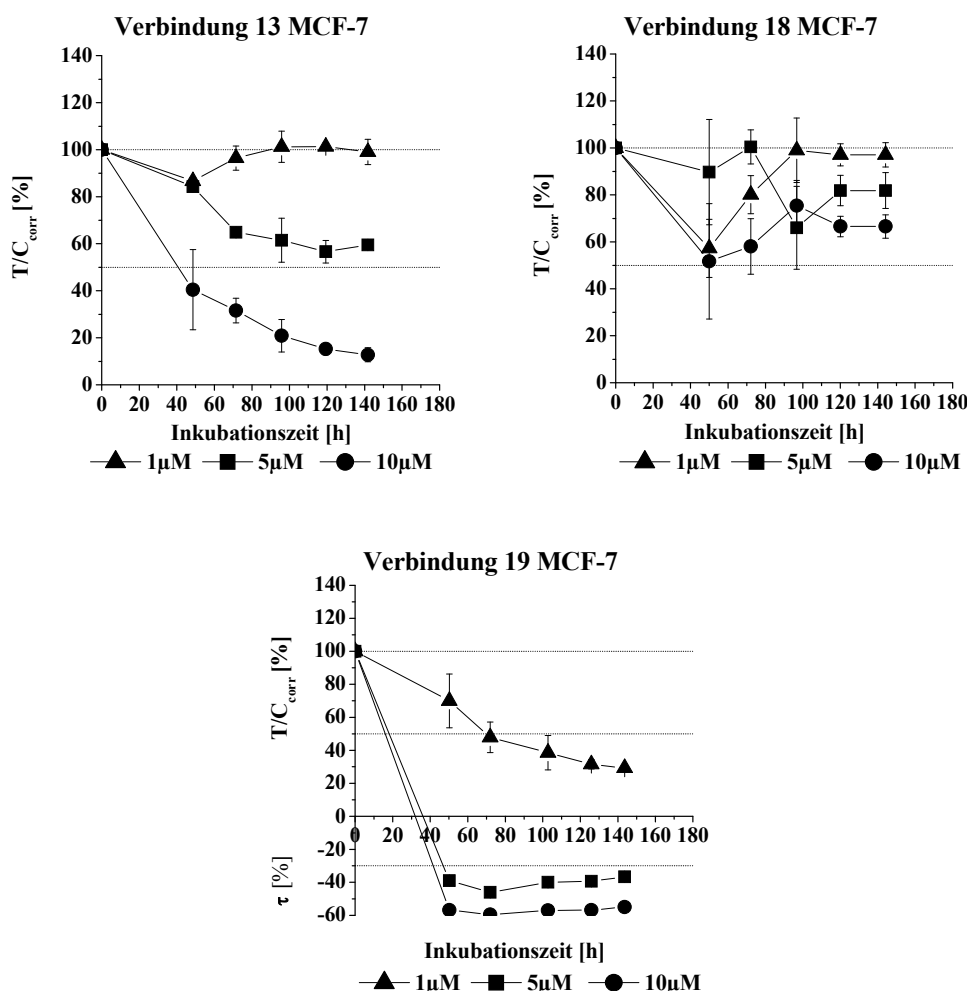
**Abb. 5:** *In vitro* Zytotoxizität der G0-Spacer-Mel (**14**) und G1-Spacer-Mel (**17**) Derivate an der MCF-7 Zelllinie.

Die Bindung von Bendamustin an das G0 über den Spacer oder eine Amidbindung reduzierte die Antitumoraktivität im Fall von **15** bzw. führte zur inaktiven Verbindung **20** (Abb. 6). Dies bedeutet, dass die höchste *in vitro* Zytotoxizität von Bendamustin durch die Kopplung an einen Maleinimid-Spacer erhalten wird.



**Abb. 6:** *In vitro* Zytotoxizität des G0-Spacer- (**15**) und G0-Bendamustins-Derivates (**20**) an der MCF-7 Zelllinie.

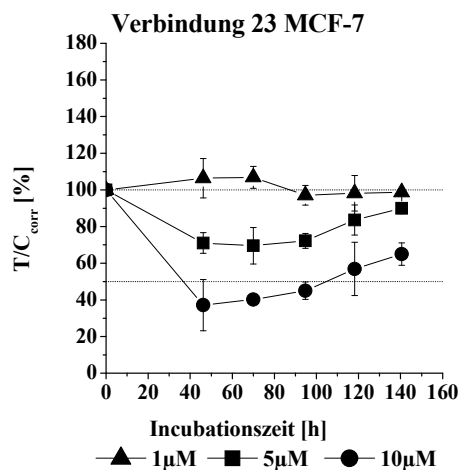
Die Amidbindung von Melphalan an **G0** führte bei der BOC-geschützten Verbindung zu einer Verminderung der antiproliferativen Aktivität. Das Mel-Boc-Spacer-**G0**-Derivat **13** erreichte die  $T/C_{\text{corr}} = 50\%$  bei  $5 \mu\text{M}$ , sein Analog ohne Spacer **18** (Mel-Boc-**G0**) bei  $10 \mu\text{M}$  (Abb. 7). Die durch die Entfernung der Boc-Gruppe synthetisierten Verbindung **19** erreichte in den Konzentrationen von  $5$  und  $10 \mu\text{M}$  zytozide Effekte und erzielte somit eine bessere Wirkung als das Mel-Spacer-**G0**-Derivat (**14**) (Abb. 5 und 7). Die Antitumoraktivität der **G1**-Dendrimere war vergleichbar, unabhängig von der Präsenz des Maleinimid-Spacers.



**Abb. 7:** *In vitro* Zytotoxizität der Mel-Boc-Spacer-**G0** (**13**), des Analogs ohne Spacer (**18**) und der Mel-**G0** (**19**) an der MCF-7 Zelllinie.

Die Derivate mit dem Diaminopropionsäure-Rest offenbarten ein interessantes Ergebnis. Die entschützte Verbindung **11** erwies sich, trotz ihrer positiven Ladungen, als inaktiv und auch der Pt-Komplex **12** zeigte keine Zytotoxizität. Die Dendrimer-Spacer-Ethylendiamin-Derivate

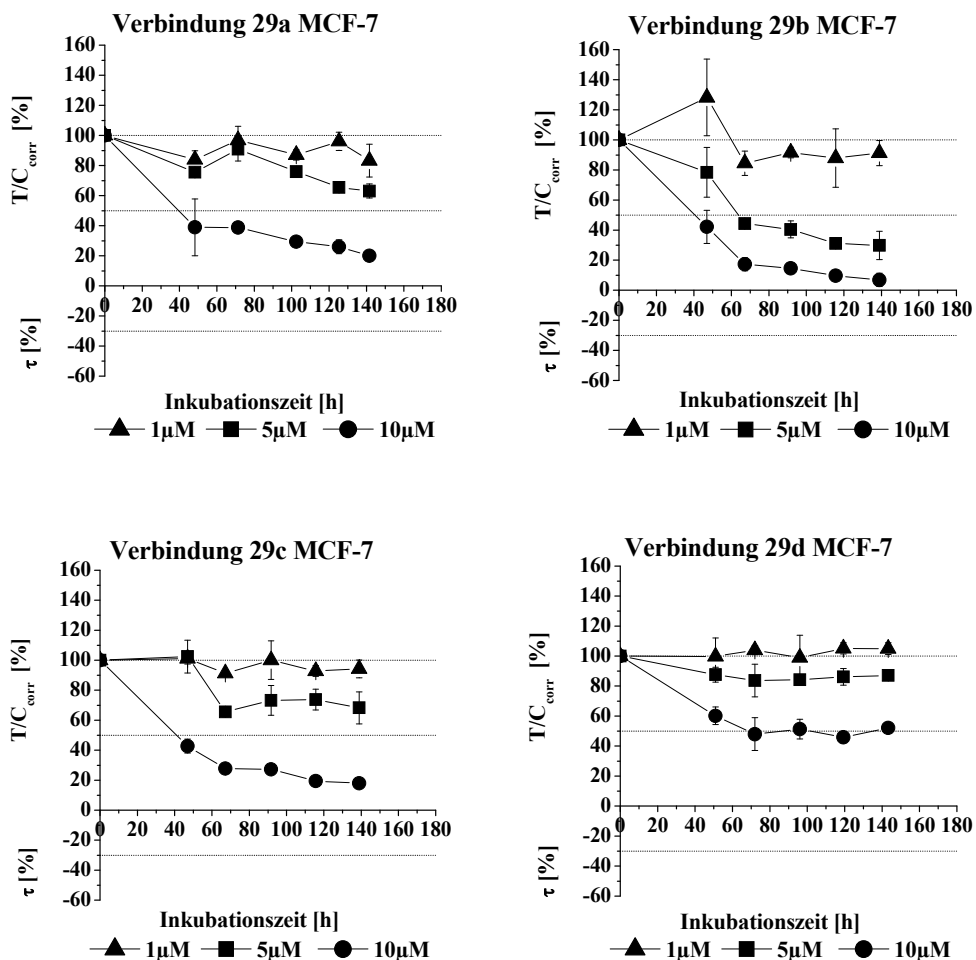
haben außer der Verbindung **23** keine Wirkung ausgeübt (siehe Anhang 1). Die geschützte Verbindung **23** wies schwache antiproliferative Effekte in der höchsten Konzentration an beiden Zelllinien auf, allerdings haben die Zellen nach einiger Zeit eine Resistenz gegen die Substanz entwickelt und sich langsam regeneriert (Abb. 8).



**Abb. 8:** *In vitro* Zytotoxizität des Dendrimer-Spacer-Ethylendiamin Derivates (**23**) an der MCF-7 Zelllinie.

### 2.2.1.2. Antiproliferative Wirkung der Diamin-Derivate

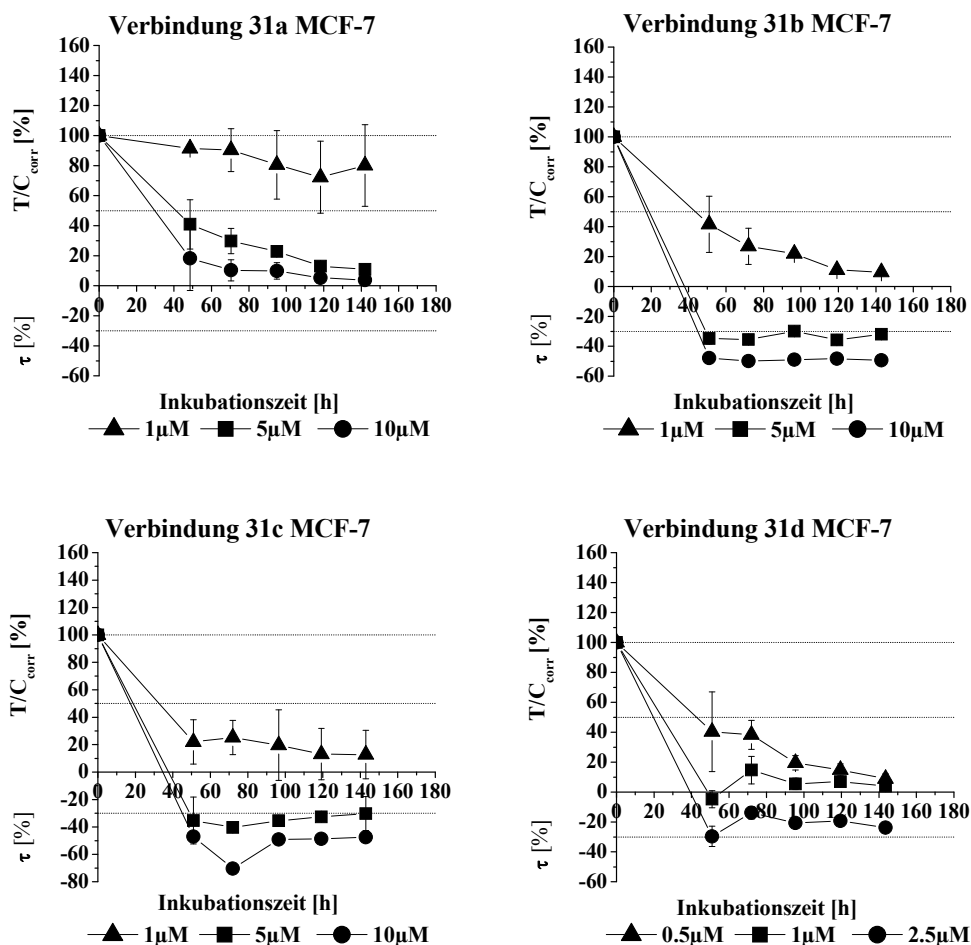
Alle bivalenten Verbindungen wurden als Isomere getestet. Die Anbindung von zwei Bendamustin-Spacer Molekülen an die Diamine führte zu einer verminderten antiproliferativen Wirkung. Alle bivalenten Bendamustin-Verbindungen waren aktiver als der Wirkstoff an sich aber nicht so aktiv wie das Bendamustin-Spacer Derivat **7** (Abb. 4 und 9). Die Dimere **29a-c** zeigten ähnliche zytotoxische Effekte in der Konzentration von 10 μM ( $T/C_{\text{corr}} \approx 10\%$ ), was eine Unabhängigkeit der Aktivität von der Kettenlänge der Diamine veranschaulicht. Lediglich die Verlängerung der Kette in der Verbindung **29d** reduzierte die Effekte auf das Zellwachstum (Abb. 9).



**Abb. 9:** *In vitro* Zytotoxizität der bivalenten Bendamustin Derivate **29a-d** an der MCF-7 Zelllinie.

Während das geschützte Mel-Spacer-Derivat **4** nach 48 h zytozide Effekte in den Konzentrationen von 5 und 10  $\mu\text{M}$  zeigte (Abb. 3), haben sich die Antitumoreffekte der bivalenten und BOC-geschützten Melphalan-Spacer-Diamin-Derivate unabhängig von dem Diamin-Spacer drastisch verringert ( $T/C_{\text{corr}} \approx 50\%$ ).

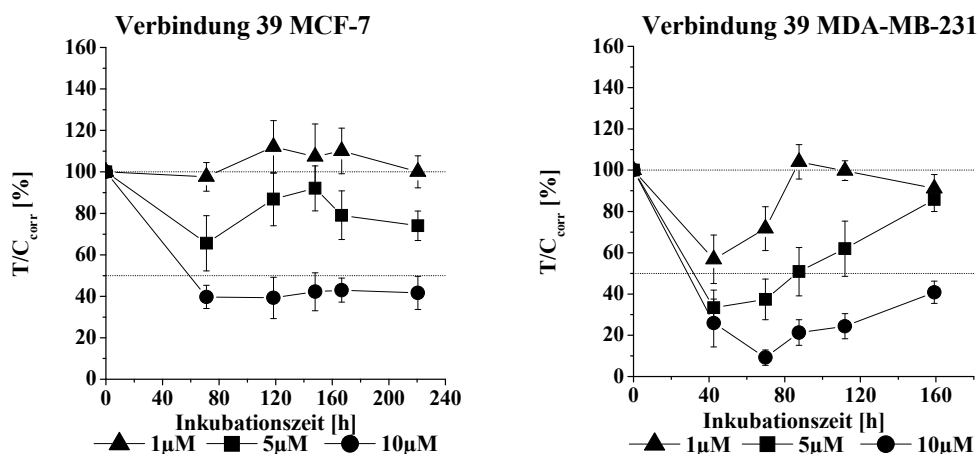
Die Spaltung der BOC-Gruppen erhöhte sehr stark die Zytotoxizität (Abb. 10). Verbindung **31a** war zytotoxisch in den Konzentrationen von 5 und 10  $\mu\text{M}$ , **31b-d** wiesen zytozide Effekte in diesen Konzentrationen auf und waren zytotoxisch bei 1  $\mu\text{M}$ .



**Abb. 10:** *In vitro* Zytotoxizität der bivalenten Melphalan Derivate **31a-d** an der MCF-7 Zelllinie.

### 2.2.1.3. Antiproliferative Wirkung der fluoreszenzmarkierten Dendrimere

Die Ergebnisse der biologischen Untersuchungen an dem **G0**-Dansyl-Derivat **35** wurden schon beschrieben und publiziert [41, 42]. Die Verbindung zeigte keine Effekte auf das Zellwachstum. Auch die **G0**-FITC- und **G0**-Naphthalimid-Derivate haben keine Zytotoxizität aufgewiesen. Die Nitrogruppen von **39** sorgten allerdings für eine antiproliferative Wirkung an MCF-7 Zellen und für eine zytotoxische Aktivität an MDA-MB-231 Zellen (Abb. 11). Allerdings wurde eine Regeneration der MDA-MB-231 Zellen nach 72 h beobachtet.



**Abb. 11:** *In vitro* Zytotoxizität des Nitronaphtalimid-Dendrimers **39**.

## 2.2.2. Untersuchungen zur Zellaufnahme von fluoreszenzmarkierten Dendrimeren

### 2.2.2.1. Charakterisierung der Fluorophore

Alle fluoreszenzmarkierten Dendrimere wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie charakterisiert. Die Substanzen zeigten nur ein einziges Anregungsmaximum. Das Emissionsmaximum der Derivate **33**, **35**, **38** und **39** war von den jeweiligen Fluoreszenzmarkern abhängig (Tabelle 1). Nur Verbindungen **33** und **35** konnten die Anforderungen für Studien zur Akkumulationskinetik erfüllen ( $\lambda_{\text{maxem}} > 500 \text{ nm}$ ).

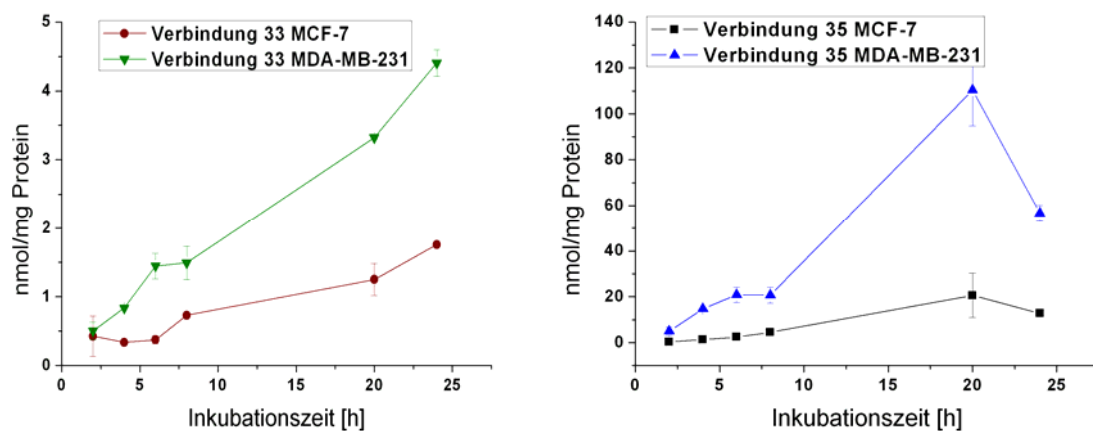
Verbindung	Fluorophor	$\lambda_{\text{maxex}}$ (nm)	$\lambda_{\text{maxem}}$ (nm)
<b>33</b>	Fluoresceinisothiocyanat	450	519
<b>35</b>	Dansyl	340	535
<b>38</b>	Naphtalimid	333	387
<b>39</b>	Nitronaphtalimid	361	440

**Tabelle 1:** Anregungs- ( $\lambda_{\text{maxex}}$ ) und Emissions- ( $\lambda_{\text{maxem}}$ ) Wellenlängen der eingesetzten Fluorophoren.

### 2.2.2.2. Zellaufnahme und intrazelluläre Verteilung der fluoreszenzmarkierten Dendrimere

Um die Zellaufnahme der Dendrimere zu quantifizieren, wurden die MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen mit 5  $\mu\text{M}$  der Derivate **33** und **35** inkubiert und dann die Akkumulationskinetik bestimmt. Mögliche Inaktivierungsreaktionen der Konjugate aufgrund von Proteinbindung wurden durch die Verwendung eines FCS (fetal calf serum bzw. fetales Kälberserum)-freien Kulturmediums für die beiden Brustkrebszelllinien minimiert.

Das dansylierte Dendrimer **35** zeigte einen höheren Anreicherungsgrad als das FITC-Derivat **33**. Beide Verbindungen wiesen zudem unterschiedliche Profile der Akkumulationskinetik auf (Abb. 12). Bei der Verbindung **35** wurde eine schnelle Anreicherung beobachtet; nach 20 h trat eine Sättigung auf. Das FITC-Konjugat **33** zeigte eine fast lineare, aber langsame Anreicherung in den Zellen. Nach 24 Stunden konnte noch keine Sättigung festgestellt werden.

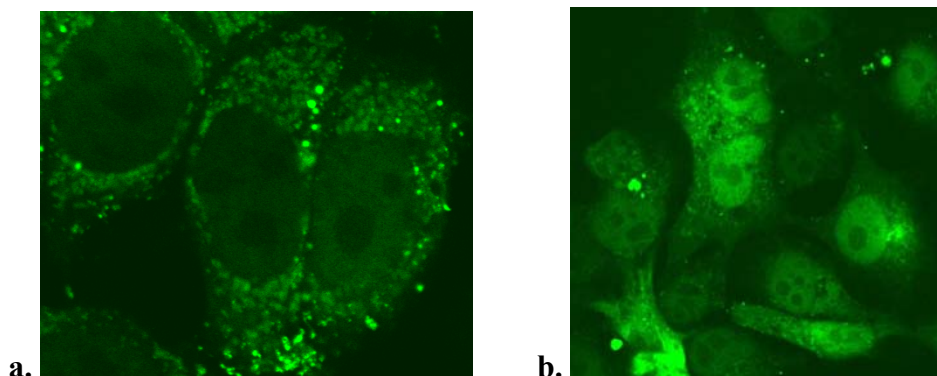


**Abb. 12:** Akkumulationskinetik der fluoreszenzmarkierten Dendrimere **33** und **35**.

Um die intrazelluläre Verteilung der Derivate zu studieren, wurden MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen in 96-Loch Platten mit den Verbindungen **33** und **35** in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (2/4/8/16/24h) wurde das



substanzhaltige Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend an dem Fluoreszenzmikroskop Zeiss LSM510 untersucht (Abb. 11)\*.



**Abb. 13:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Verbindung **33**: a. MCF-7 Zellen; b. MDA-MB-231 Zellen.

Die MCF-7 Zellen zeigten eine mögliche endosomale intrazelluläre Verteilung in dem Zytoplasma. Bei den MDA-MB-231 Zellen wurde eine Akkumulation der fluoreszenzmarkierten Dendrimere in dem Kern beobachtet (Abb. 13).

### 2.2.3 Diskussion

Die Ergebnisse der *in vitro* Zytotoxizitätstests an MCF-7 und MDA-MB-231 Brustkrebszelllinien waren konform mit den in der Literatur beschriebenen Daten über die Antitumoraktivität von Melphalan Hydrochlorid (**1**). Das Wachstum der Zellen wurde abhängig von der eingesetzten Konzentration verringert. Die zytotoxische Wirkung in der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ( $T/C_{\text{corr}} \approx 10\%$ ) war von einer freien Aminogruppe abhängig (Abb. 3), das Boc-geschützte Melphalan-Derivat **2** war inaktiv. Interessant ist, dass die Veresterung mit N-(2-hydroxyethyl)maleinimid (**3**) die zytostatischen Effekte stark erhöhte. Das Boc-geschützte Melphalan-Spacer Derivat **4** zeigte zytozide Wirkungen an beiden Zelllinien, die entschützte Verbindung **5** wies bereits in der Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Zytotoxizität auf.

---

\* Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden von Jan Richter am Institut für klinische Physiologie, Charité Campus Benjamin Franklin Berlin durchgeführt.

Eine denkbare Erklärung könnte die Bindung des Spacer-Derivates an das Humanalbumin (HSA) sein, das im Zellkulturmedium vorliegt. In einigen früheren Arbeiten haben Kratz et al. analoge Transferrin-Konjugate des Stickstoff-Lost Chlorambucil synthetisiert [14]. Darüber hinaus wurde die Bindung des Spacer-Derivates an das HSA *in situ* nach *iv* Verabreichung nachgewiesen. Aufgrund der erhöhten Zellaufnahme des an das Makromolekül gebundenen Wirkstoffes in den Tumorzellen hat dieses Konzept eine viel versprechende Zukunft als Drug-Carrier-System [52]. Eigene Untersuchungen haben die Bindung von **5** und **7** an das HSA nachgewiesen. Neben dem HSA oder dem Transferrin als Carriermoleküle [53-55], wurden einige synthetische Polymere entwickelt, die in der Lage sind, Wirkstoffe zu binden und zu einer selektiven Anreicherung in Tumoren und Tumorzellen zu führen [56, 57]. In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe wurden die **G0** und **G1** Dendrimere erfolgreich für den Transport von Platin(II)-Komplexen in MCF-7 und MDA-MB-231 Brustkrebszellen eingesetzt [41].

Bereits 1991 haben Strohmalm et al. Melphalan kovalent an makromolekulare Carrier gebunden [58]; Shukla et al. haben 2008 Polyethylenglykol-Melphalan-Konjugate synthetisiert. Diese haben eine erhöhte dosisabhängige *in vitro* Zytotoxizität bewiesen [59].

Anhand dessen wurde in der vorliegenden Arbeit das Zytostatikum Melphalan entweder über den Maleinimid Spacer (**13**, **14** und **16**, **17**) oder direkt über eine Amidbindung an die **G0** und **G1** Dendrimere gebunden (**18**, **19** und **21**, **22**). Die BOC-geschützten Konjugate **13**, **16**, **18** und **21** haben nur eine sehr schwache Antitumoraktivität an MCF-7 und MDA-MB-231 Zelllinien aufgewiesen. Allein Verbindung **13** zeigte geringe zytotoxische Effekte in der höchsten Konzentration von 10  $\mu$ M. Die **G1**-Derivate mit freien  $\text{NH}_2$ -Gruppen (**17** und **22**) unterschieden sich wenig in ihrer Aktivität. Sie zeigten zytotoxische Wirkungen bei 5 und 10  $\mu$ M. Diese Ergebnisse deuten eine relativ hohe Stabilität der Konjugate an. Es wird angenommen, dass nach dem Transport in die Tumorzellen sowohl Melphalan in freier Form als auch das an dem Dendrimer gebundene Melphalan durch die N-Lost Gruppe mit der DNA in Wechselwirkung treten. Die daraus resultierende Quervernetzung führt zum Zelltod.

Obwohl Bendamustin zur gleichen Zytostatikaklasse gehört, unterscheiden sich seine zytostatischen Effekte, ob in freier Form, gebunden an den Maleinimid-Spacer oder als Dendrimer-Konjugat, von der Antitumoraktivität des Melphalans. Während Melphalan das Zellwachstum der MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen abhängig von der Zeit und der

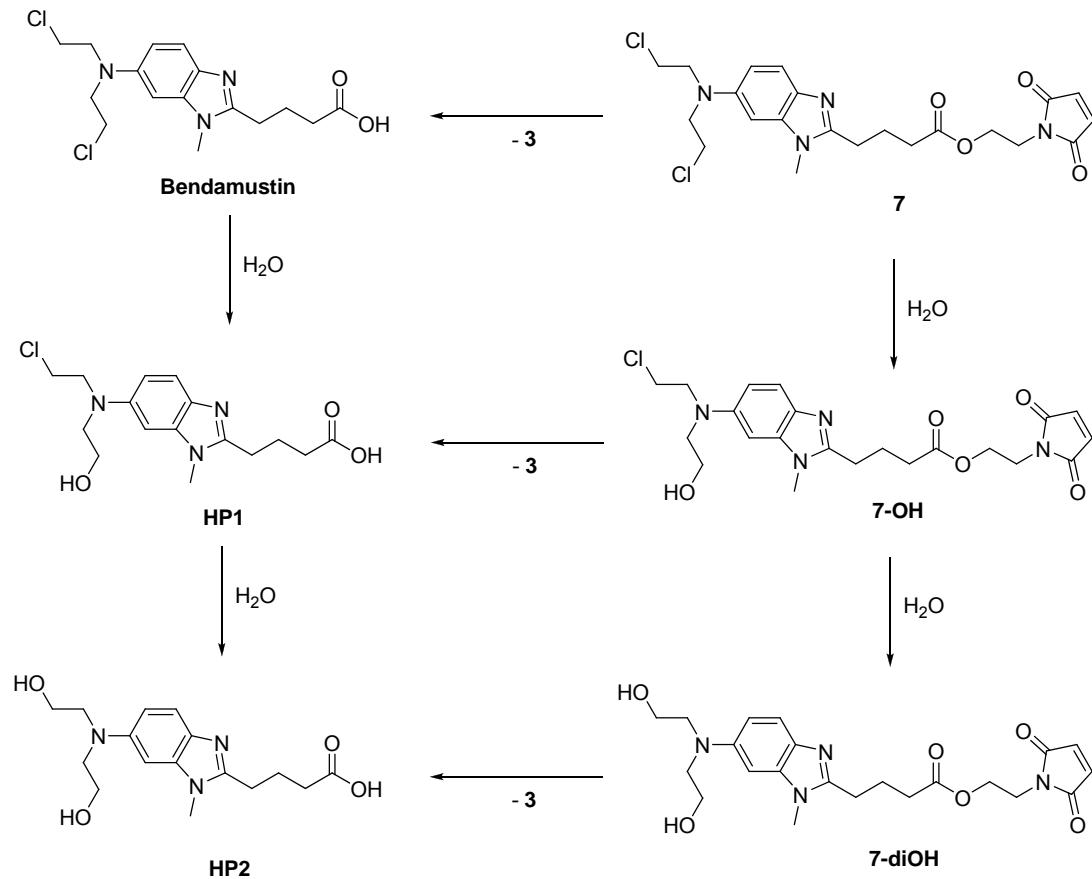
eingesetzten Konzentration reduzierte, war dagegen Bendamustin inaktiv (vgl. Abb. 3 und 4). Dies bedeutet, dass Melphalan, aufgrund seiner Aminosäure Funktion (im Vergleich zu der 4-(Benzimidazol-2-yl)buttersäure von Bendamustin), entweder schneller in den Tumorzellen akkumuliert wird oder der Wirkmechanismus ist ein anderer. Letzteres wird durch die Tatsache, dass Melphalan vergleichbare Wirkungen nach der Bindung an die Dendrimere induzierte, unterstützt. Die einzige Voraussetzung für eine hohe Zytotoxizität von Melphalan war eine freie Aminogruppe.

Der Wirkmechanismus von Bendamustin wird sehr widersprüchlich diskutiert. Es ist dennoch akzeptiert, dass die DNA-Alkylierung die Hauptursache ist, die zum Zelltod führt. Präklinische Daten haben gezeigt, dass Bendamustin schnelle Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA induziert. Dies führt in dem Tumor zur Apoptose. Ebenso kann es auch zur Hemmung der mitotischen Spindel führen und einen nicht-apoptotischen Zelltod verursachen [60-62].

Derartige Wirkmechanismen erfordern einen intakten N-Lost Rest. Melphalan und Bendamustin werden während 24 h in Wasser bei 37 °C zu den Bis(hydroxyethyl)amino Analogen hydrolysiert. Chang et al. haben für Melphalan eine verzögerte Hydrolyse in Gegenwart von bovinem Serumalbumin oder menschlichen Plasmaproteinen festgestellt [63]. Die Halbwertszeit von Melphalan bei 37°C in einem Roswell Park Memorial Institute Medium mit 10%-igem FCS war  $1,13 \pm 0,10$  h und war nur geringfügig höher als in reinem Wasser [64]. Die Hydrolyse von Melphalan wurde auch in der vorliegenden Arbeit untersucht, wobei nach 8 Stunden nur die Bis(hydroxyethyl)amino Analogen detektiert wurden. Die Bindung an den N-(2-Hydroxyethyl)maleinimid Spacer führte allerdings nicht zu einer Erhöhung der Stabilität; die Hydrolyse von Verbindung **5** zeigte ein ähnliches Profil wie das von Melphalan.

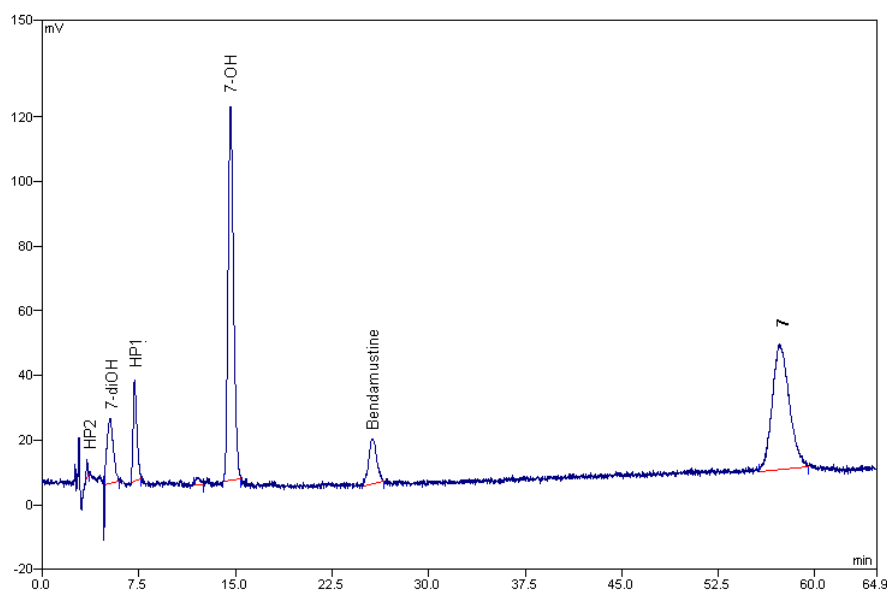
Derartige Untersuchungen sind leider im Fall von Bendamustin selten, aber unsere eigenen Recherchen zeigten eine Halbwertszeit von ca. 100 min in reinem Wasser und höhere Stabilität in physiologischer NaCl-Lösung [65]. Dies korrelierte sehr gut mit der Hydrolyse von Melphalan [63]. Leider führte die Bindung von Bendamustin an das HSA nicht zu einer erhöhten Stabilität des Wirkstoffes in wässrigem Medium.

Die Hydrolyse des Bendamustins zu den Hydroxy-(**HP1**) oder Dihydroxy-Analogen (**HP2**) führt zu der Inaktivierung des Wirkstoffes (Schema 13).



**Schema 13:** Hydrolyse von Verbindung 7 bei 37°C in Wasser.

Die Hydrolyse des Bendamustins wurde in der vorliegenden Arbeit eingehend untersucht, wobei während der ersten 2 h, 55,6% des Bendamustins zu **HP1** (36,8%) und **HP2** (18,8%) hydrolysierten. Nach 24 h wurde eine vollständige Hydrolyse zu **HP2** festgestellt. Das Bendamustin-Maleinimid-Derivat (**7**) wurde unter den gleichen Bedingungen analysiert (Beispiel eines Chromatogramms in Abb. 14 dargestellt).



**Abb. 14:** Chromatogramm der Verbindung **7** nach Inkubation in Wasser bei 37°C, nach 8 h.

Der Maleinimid-Rest hat Bendamustin eine hohe Hydrophobie vermittelt, die zu einer größeren Retentionszeit von  $RT = 57,3$  min (Bendamustin  $RT = 25,7$  min) führte. Es ist ersichtlich, dass die Veresterung von Bendamustin die Stabilität in wässriger Lösung erhöht hat. Allerdings wurde Bendamustin über 36 h freigesetzt und sein Niveau blieb auf 7%. **HP1** und **HP2** sind nicht nur die Hydrolyse-Produkte des Bendamustins, sondern auch Abbauprodukte von **7-OH**-und **7-DiOH** (Schema 13).

Während das Dihydroxy-Bendamustin Derivat **HP2** sich als biologisch inaktiv erwiesen hat, ist die Beteiligung des teilweise hydrolysierten **HP1** an der antiproliferativen Wirkung noch unbekannt. Dies wird dadurch bestätigt, dass in *in vitro* Untersuchungen Bendamustin keine Antitumoraktivität zeigte (siehe auch Abbildung 4) [3]. Die Verhinderung der Hydrolyse in wässriger Lösung soll zu antiproliferativen Effekten führen. Die Stabilität des Bendamustins könnte in alkoholischer Lösung verbessert werden (unveröffentlichte Ergebnisse), allerdings ist dies nicht für *in vitro* Untersuchungen geeignet.

Um den Blutkreislauf und das intrazelluläre/endosomale Umfeld zu simulieren wurde die Hydrolyse von Bendamustin und **7** in PBS und beim entsprechenden pH untersucht. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Stabilität von **7** in PBS höher als die von Bendamustin ist und unabhängig von dem pH-Wert. Verbindung **7** hatte eine Halbwertszeit von 10 h bei

einem pH von 7,4 aufgewiesen und somit waren größere Mengen an Wirkstoff verfügbar, die zu einer erhöhten Antitumoraktivität führten.

Die Bindung von Substanz **7** über den Maleinimid-Spacer an das **G0** reduzierte leicht die Antitumoraktivität von zytoziden zu zytotoxischen Effekten (Abb. 6). Im Gegensatz dazu führte die direkte Bindung von Bendamustin an das **G0** über eine Amidbindung zu einer Inaktivierung. Die höhere Stabilität der Amidbindung verhindert die Freisetzung von Bendamustin aus dem Molekül. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass nicht das Derivat **15** selbst den Zelltod verursacht, sondern das durch die hydrolytische Spaltung freigesetzte Bendamustin. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denen von Melphalan, das sowohl in freier Form als auch gebunden an das Dendrimer über den Spacer oder die Amidbindung aktiv war.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Erhöhung der Antitumoraktivität von Melphalan und Bendamustin durch die Bindung an einen Carrier erzielt werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass die neuen Bendamustin-Derivate im Tumorgewebe mittels des EPR-Effekts und in den Tumorzellen wahrscheinlich durch Endozytose aufgenommen werden. Ferner wird die Hydrolyse von Bendamustin unterdrückt. Die Untersuchungen wiesen einerseits auf eine Beteiligung der Buttersäure in den hydrolytischen Prozessen hin, andererseits haben Pencheva et al. für auf Polyphosphoestern immobilisiertes Bendamustin eine höhere Stabilität durch die Bildung von molekularen Komplexen erreicht [66]. Die Stabilität des Bendamustins müsste demnach mit der Einsetzung von Polymeren wie Polyethylenglykole erhöht werden. Eigene Untersuchungen wiesen aber auf keine erhöhte Stabilität mit PEG 400/Wasser Mischungen hin.

Hopwood und Stock haben gezeigt, dass Makromoleküle mit lipophilen Resten in der Lage sind, die Hydrolyse von Wirkstoffen zu verhindern [67]. Humanalbumin erwies sich als am effizientesten, um Wirkstoffe vor Hydrolyse zu schützen. Diese Studien könnten eine mögliche Erklärung für die Antitumoraktivität des Bendamustin-Maleinimid Derivates **7** liefern, allerdings ist die Art der Bindung an das HSA noch nicht bekannt.

Ein Ziel dieser vorliegenden Arbeit war auch die Synthese von Zytostatika-Spacer-Derivaten mit Diaminen als Carrier. Es sollte untersucht werden, in wie fern die Struktur des Carriers einen Einfluss auf die antiproliferative Wirkung der Derivate haben kann.

Im Gegensatz zu Melphalan, führte die Synthese von bivalenten Wirkstoffen mit Bendamustin nicht zu einer erhöhten Zytotoxizität an den MCF-7 und MDA-MB-231 Zelllinien. Die Verbindungen **29a-c** zeigten nur zytotoxische Effekte ( $T/C_{\text{corr}} \approx 10\%$ ) in der Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  an MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen. Leider war es in der vorliegenden Arbeit nicht möglich, die optisch reinen Diamin-Derivate zu trennen, dies ist Thema einer nachfolgenden Studie.

Die biologischen Untersuchungen der bivalenten Bendamustin-Diamin-Derivate haben eine höhere Antitumoraktivität erwiesen als die Dendrimer-Derivate, aber nicht so aktiv wie der Bendamustin-Spacer **7**. Dies könnte ein Indiz für die Beteiligung eines Nebeneffektes des Maleinimid-Rests im Falle von Verbindung **7** sein.

Die Resultate bestätigen die positiven Ergebnisse, die in anderen Versuchen zur Optimierung der pharmakologischen Wirkung von Zytostatika, z.B. Platin-Komplexen erhalten wurden. Die Arbeitsgruppe von Farrell hat erfolgreich multinucleare Platin-Komplexe synthetisiert und konnte damit Verbindungen ohne Kreuzresistenz zu Cisplatin erhalten [68]. In unserer Arbeitsgruppe konnte mit ähnlichen Komplexen eine höhere Zellaufnahme in MCF-7-Zellen und ein aktiver Transport in die Tumorzellen nachgewiesen werden [69].

Die bivalenten Bendamustin und Melphalan Derivate sind, wegen eines fehlenden Markers, nicht für Studien zur Zellaufnahme geeignet. Aus diesem Grunde sollen diese Derivate demnächst derart markiert werden, dass sie die Durchführung von pharmakologischen Untersuchungen unter Verwendung von Atomabsorptionsspektrometrie (High-Resolution Continuum Source AAS) oder Fluoreszenzspektroskopie ermöglichen.

Die Ergebnisse der Zytotoxizitätstests der Ethylendiamin-Derivate sind sehr interessant, wenn man die in der Literatur veröffentlichten Daten betrachtet. Mehrere Autoren korrelierten die zytotoxischen Eigenschaften von ‚polykationischen‘ Dendrimeren mit ihren positiven Ladungen, die dann zu einer Verletzung der Zellmembran führen können [43-45]. Es muss noch bestimmt werden, ob die Struktur der Diaminopropionsäure für die biologische Inaktivität der Ethylendiamin-Konjugate verantwortlich ist.

In früheren Arbeiten wurden auch Dendrimere der ersten Generation mit verschiedenen funktionellen Gruppen synthetisiert. Ziel war ein Teil der Endgruppen mit Fluoreszenzmarkern und den Rest mit Wirkstoffen zu belegen. Durch den Einsatz von Fluoreszenzmikroskopie sollte die intrazelluläre Lokalisation der Konjugate untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit war auch die Überlegung, ‚gemischte‘ Dendrimere mit dem N-(2-Hydroxymethyl)maleinimid Spacer zu synthetisieren und die Zellaufnahme zu untersuchen. Um solche Studien durchführen zu können, dürfen die fluoreszenzmarkierten Verbindungen selbst keine Zytotoxizität aufweisen. In unserem Fall konnten nur FITC und Dansyl als Fluoreszenzmarker eingesetzt werden, auch aufgrund des niedrigen Emissionsmaximums der Naphthalimid-Derivate. Vom besonderen Interesse waren die Ergebnisse der Zytotoxizitätstests der Nitronaphthalimid Verbindung **39**. Hierbei liegt die Vermutung nahe, dass in der Zelle eine Reduktion der Nitrogruppe zum Amin stattfindet und dass vielleicht diese Amine für die Zytotoxizität verantwortlich sind [70]. Leider war es bislang nicht möglich, ‚gemischte‘ Dendrimere (mit Fluoreszenzmarker und Spacer-Wirkstoff Rest) zu synthetisieren.



### 2.3. Ausblick

In einer nachfolgenden Arbeit wird die Hydrolyse-reaktion und die Freisetzung von Bendamustin aus den **G0** und den Dendrimeren der höheren Generation untersucht werden. Darüber hinaus wird recherchiert werden, welche Derivatisierung der Carboxylgruppe zu einer erhöhten Antitumoraktivität führt.

Zur Untersuchung des Wirkmechanismus der neuen Zytostatika-Spacer-Dendrimer-Derivaten ist die Synthese von ‚gemischten‘ Derivaten, die teils mit Wirkstoffen und teils mit Fluoreszenzmarkern erbaut sind, beabsichtigt.

Hinsichtlich der Zytostatika-Diamin-Derivate ist die Trennung der optischen Isomere und anschließende biologische Testung der optisch reinen Substanzen geplant. Um die zelluläre Aufnahme zu quantifizieren und den Wirkmechanismus dieser Verbindungen (z.B. die DNA-Bindung) zu untersuchen, sollten die Derivate mit geeigneten Marker vorgesehen werden.

### 3. Zusammenfassung/Abstract

#### Zusammenfassung

Bendamustin und Melphalan sind Stickstoff-Lost-Derivate aus der Gruppe der Alkylanzien und werden für die Behandlung von verschiedenen Tumorerkrankungen z.B. chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) oder Brustkrebs eingesetzt. Ihre Anwendung wird jedoch durch zahlreiche Nebenwirkungen begrenzt. Daher wurden 1,3,5-Tris(3-aminopropyl)benzene (**G0**) und sein **G1** analog 1,3,5-Tris[3,5-bis(3-aminopropyl)-N-propylbenzamid]benzene ausgewählt, um Zytostatika-Dendrimer-Konjugate zu synthetisieren und um ‚Tumortargeting‘ durch den EPR Effekt und Anreicherung in den Tumorzellen durch Endocytose zu erreichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Reihe von Dendrimer- und Dendrimer-Spacer-Derivate mit den Zytostatika Melphalan und Bendamustin erfolgreich synthetisiert. Die antiproliferative Wirkung dieser Verbindungen und deren Maleinimid-Vorstufen wurde an den MCF-7 und MDA-MB-231 Brustkrebszelllinien ermittelt, wobei keine Selektivität für eine der Zelllinien beobachtet werden konnte.

Die Zytotoxizität von Melphalan war von einer freien Aminogruppe abhängig. Die Art der Bindung an den Spacer oder am Dendrimer hatte keinen Einfluss auf die Antitumoraktivität. Die Veresterung von Bendamustin mit dem N-(2-Hydroxyethyl)maleinimid Spacer reduzierte die Hydrolyse, was eine starke Erhöhung der antiproliferativen Wirkung zur Folge hatte. Im Vergleich dazu führte die direkte Amidbindung an das **G0** zu der Inaktivierung der Verbindung. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass der Zelltod durch das intakte freigesetzte Bendamustin nach dem Transport in die Tumorzellen verursacht wird.

Des Weiteren wurden Zytostatika-Spacer-Diamin-Derivate synthetisiert und ihre antiproliferative Wirkung an den MCF-7 und MDA-MB-231 Brustkrebszelllinien untersucht. Allerdings wurden die bivalenten Verbindungen als Isomeregemisch erhalten und getestet. Die *in vitro* Tests der bivalenten Bendamustin-Derivate zeigten eine wesentliche Erhöhung der Antitumoraktivität dieser Derivate im Vergleich zum freien Bendamustin. Mit Ausnahme des Diaminododecan-Derivates, haben alle bivalenten Verbindungen zytotoxische Effekte an beiden Zelllinien aufgewiesen. Die analogen Melphalan-Derivate waren viel aktiver und

erreichten zytozide Wirkungen in den höchsten Konzentrationen. Die Dimere mit C7, C8 und C12 haben eine etwa 10-mal höhere Zytotoxizität als Melphalan gezeigt.

## Abstract

Bendamustine and melphalan are nitrogen mustard derivatives from the group of alkylating agents and are used for the treatment of various cancers such as chronic lymphocytic leukemia (CLL) or breast cancer. However their use is limited by numerous side effects. Therefore, 1,3,5-tris(3-aminopropyl)benzene (**G0**) and the **G1** analogous 1,3,5-tris[3,5-bis(3-aminopropyl)-N-propylbenzamide]benzene were chosen to synthesize cytostatic-dendrimer conjugates and to achieve 'tumor targeting' through the EPR-effect and accumulation in the tumor cells by endocytosis.

In this work a new series of dendrimer and dendrimer-spacer derivatives with the cytostatics melphalan and bendamustine was successfully synthesized. The antiproliferative effects of these compounds and their maleimide precursors were determined on the MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines, with no selectivity observed for any of the cell lines.

The cytotoxicity of melphalan was dependent on the presence of a free amino group. The type of binding to the spacer or dendrimer had no effect on the antitumor activity. The esterification of bendamustine with the N-(2-hydroxyethyl)maleimide spacer reduced the hydrolysis and a strong increase of antiproliferative effects could be demonstrated. By comparison, the direct amide bond to the **G0** led to the inactivation of the conjugate. It is therefore very likely that cell death is caused by the intact bendamustine released after transport into the tumor cells.

In addition, cytostatic-spacer-diamine conjugates were synthesized and their antiproliferative effect on the MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines was investigated. However, the bivalent compounds have been obtained as a mixture of isomers and tested as such. The *in vitro* tests of the bivalent derivatives with bendamustine showed a significant increase in the antitumor activity of these conjugates compared to free bendamustine. With the exception of the diaminododecane derivative, all bivalent compounds showed cytotoxic effects on both cell lines. The analogue melphalan derivatives were much more active and reached cytotoxic

effects in the highest concentrations. The dimers with C7, C8 and C12 exhibited an approximately 10-times higher cytotoxicity than melphalan.

## 4. Literatur

1. Balfour, J.A.B. und Goa, K.L., *Bendamustine*. *Drugs*, 2001. **61**(5): p. 631-638.
2. Blumel, S., Goodrich, A., Martin, C. und Dang, N.H., *Bendamustine: A novel cytotoxic agent for hematologic malignancies*. *Clin. J. Oncol. Nurs.*, 2008. **12**(5): p. 799-806.
3. Konstantinov, S.M., Kostovski, A., Topashka-Ancheva, M., Genova, M. und Berger, M.R., *Cytotoxic efficacy of bendamustine in human leukemia and breast cancer cell lines*. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2002. **128**(5): p. 271-278.
4. Ozegowski, W. und Krebs, D., *Aminosäureantagonisten .3. Omega-[Bis-(beta-chloräthyl)-amino-benzimidazolyl-(2)]-propion-bzw.-buttersäuren als potentielle Cytostatika*. *J. Prakt. Chem.*, 1963. **20**(3-4): p. 178-186.
5. Rummel, M.J., Von Gruenhagen, U., Niederle, N., Rothmann, F., Ballo, H., Weidmann, E., Welslau, M., Heil, G., Duerk, H., Stauch, M., Losem, C., Matzdorff, A., Balsler, C., Schalk, K., Kofahl-Krause, D., Kaiser, U., Knauf, W., Banat, A., Hoelzer, D. und Brugger, W., *Bendamustine plus rituximab versus CHOP plus rituximab in the first-line treatment of patients with indolent and mantle cell lymphomas - First interim results of a randomized phase III study of the StiL (study group indolent lymphomas, Germany)*. *Blood*, 2007. **110**(11): p. 120a-120a.
6. Kahl, B., Bartlett, N.L., Leonard, J.P., Ganjoo, K., Williams, M.E., Czuczman, M.S., Robinson, K.S., Joyce, R., van der Jagt, R.H. und Cheson, B.D., *Bendamustine is safe and effective in patients with rituximab-refractory, indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma*. *Blood*, 2007. **110**(11): p. 406a-407a.
7. Kahl, B.S., Bartlett, N.L., Leonard, J.P., Chen, L., Ganjoo, K., Williams, M.E., Czuczman, M.S., Robinson, K.S., Joyce, R., van der Jagt, R.H. und Cheson, B.D., *Bendamustine is effective therapy in patients with rituximab-refractory, indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma results from a multicenter study*. *Cancer*, 2010. **116**(1): p. 106-114.
8. Keating, M.J., Bach, C., Yasothan, U. und Kirkpatrick, P., *Bendamustine*. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2008. **7**(6): p. 473-474.
9. Eichbaum, M.H.R., Schuetz, F., Khbeis, T., Lauschner, I., Foerster, F., Sohn, C. und Schneeweiss, A., *Weekly administration of bendamustine as salvage therapy in*

- metastatic breast cancer: final results of a phase II study*. *Anti-Cancer Drugs*, 2007. **18**(8): p. 963-968.
10. Reichmann, U., Bokemeyer, C., Wallwiener, D., Bamberg, M. und Huober, J., *Salvage chemotherapy for metastatic breast cancer: Results of a phase II study with bendamustine*. *Ann. Oncol.*, 2007. **18**(12): p. 1981-1984.
  11. Hoffken, K., Merkle, K., Schonfelder, M., Anger, G., Brandtner, M., Ridwelski, K. und Seeber, S., *Bendamustine as salvage treatment in patients with advanced progressive breast cancer: A phase II study*. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1998. **124**(11): p. 627-632.
  12. Wickstroem, M., Loevborg, H. und Gullbo, J., *Future prospects for old chemotherapeutic drugs in the target-specific era; pharmaceuticals, combinations, co-drugs and prodrugs with melphalan as an example*. *Lett. Drug Des. Discovery*, 2006. **3**(10): p. 695-703.
  13. Elson, L.A., Haddow, A., Stock, J.A. und Bergel, F., *Haematological and tumour-inhibitory effects of peptide derivatives of melphalan*. *Biochem. Pharmacol.*, 1962. **11**(Nov): p. 1079-1087.
  14. Beyer, U., Roth, T., Schumacher, P., Maier, G., Unold, A., Frahm, A.W., Fiebig, H.H., Unger, C. und Kratz, F., *Synthesis and in vitro efficacy of transferrin conjugates of the anticancer drug chlorambucil*. *J. Med. Chem.*, 1998. **41**(15): p. 2701-2708.
  15. Kratz, F., Beyer, U., Roth, T., Schutte, M.T., Unold, A., Fiebig, H.H. und Unger, C., *Albumin conjugates of the anticancer drug chlorambucil: Synthesis, characterization, and in vitro efficacy*. *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)*, 1998. **331**(2): p. 47-53.
  16. Matsumura, Y. und Maeda, H., *A new concept for macromolecular therapeutics in cancer-chemotherapy - mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs*. *Cancer Res.*, 1986. **46**(12): p. 6387-6392.
  17. Sinn, H., Schrenk, H.H., Friedrich, E.A., Schilling, U. und Maierborst, W., *Design of compounds having an enhanced tumor uptake, using serum-albumin as a carrier .I*. *Nucl. Med. Biol.*, 1990. **17**(8): p. 819-827.
  18. Noguchi, Y., Wu, J., Duncan, R., Strohm, J., Ulbrich, K., Akaike, T. und Maeda, H., *Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues*. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1998. **89**(3): p. 307-314.
  19. Takakura, Y., Mahato, R.I. und Hashida, M., *Extravasation of macromolecules*. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 1998. **34**(1): p. 93-108.

20. Wang, F., Bronich, T.K., Kabanov, A.V., Rauh, R.D. und Roovers, J., *Synthesis and evaluation of a star amphiphilic block copolymer from poly(epsilon-caprolactone) and poly(ethylene glycol) as a potential drug delivery carrier*. *Bioconjugate Chem.*, 2005. **16**(2): p. 397-405.
21. Morgan, M.T., Carnahan, M.A., Immoos, C.E., Ribeiro, A.A., Finkelstein, S., Lee, S.J. und Grinstaff, M.W., *Dendritic molecular capsules for hydrophobic compounds*. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003. **125**(50): p. 15485-15489.
22. Gurdag, S., Khandare, J., Stapels, S., Matherly, L.H. und Kannan, R.M., *Activity of dendrimer-methotrexate conjugates on methotrexate-sensitive and -resistant cell lines*. *Bioconjugate Chem.*, 2006. **17**(2): p. 275-283.
23. Lee, C.C., Gillies, E.R., Fox, M.E., Guillaudeu, S.J., Frechet, J.M.J., Dy, E.E. und Szoka, F.C., *A single dose of doxorubicin-functionalized bow-tie dendrimer cures mice bearing C-26 colon carcinomas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006. **103**(45): p. 16649-16654.
24. De Jesus, O.L.P., Ihre, H.R., Gagne, L., Frechet, J.M.J. und Szoka, F.C., *Polyester dendritic systems for drug delivery applications: In vitro and in vivo evaluation*. *Bioconjugate Chem.*, 2002. **13**(3): p. 453-461.
25. Gillies, E.R., Dy, E., Frechet, J.M.J. und Szoka, F.C., *Biological evaluation of polyester dendrimer: Poly(ethylene oxide) "bow-tie" hybrids with tunable molecular weight and architecture*. *Mol. Pharm.*, 2005. **2**(2): p. 129-138.
26. Malik, N., Wiwattanapatapee, R., Klopsch, R., Lorenz, K., Frey, H., Weener, J.W., Meijer, E.W., Paulus, W. und Duncan, R., *Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of I-125-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo*. *J. Controlled Release*, 2000. **65**(1-2): p. 133-148.
27. Bogdanov, A., Wright, S.C., Marecos, E.M., Bogdanova, A., Martin, C., Petherick, P. und Weissleder, R., *A long-circulating co-polymer in "passive targeting" to solid tumors*. *J. Drug Targeting*, 1997. **4**(5): p. 321-330.
28. Bogdanov, A.A., Martin, C., Bogdanova, A.V., Brady, T.J. und Weissleder, R., *An adduct of cis-diamminedichloroplatinum (II) and poly(ethylene glycol)poly(L-lysine)-succinate: Synthesis and cytotoxic properties*. *Bioconjugate Chem.*, 1996. **7**(1): p. 144-149.

29. Marecos, E., Weissleder, R. und Bogdanov, A., *Antibody-mediated versus nontargeted delivery in a human small cell lung carcinoma model*. *Bioconjugate Chem.*, 1998. **9**(2): p. 184-191.
30. Cheng, J., Khin, K.T. und Davis, M.E., *Antitumor activity of beta-cyclodextrin polymer - camptothecin conjugates*. *Mol. Pharm.*, 2004. **1**(3): p. 183-193.
31. Crespo, L., Sanclimens, G., Montaner, B., Perez-Tomas, R., Royo, M., Pons, M., Albericio, F. und Giralt, E., *Peptide dendrimers based on polyproline helices*. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002. **124**(30): p. 8876-8883.
32. Seymour, L.W., Ulbrich, K., Steyger, P.S., Brereton, M., Subr, V., Strohal, J. und Duncan, R., *Tumor tropism and anticancer efficacy of polymer-based doxorubicin prodrugs in the treatment of subcutaneous murine B16f10 melanoma*. *Br. J. Cancer*, 1994. **70**(4): p. 636-641.
33. Tajarobi, F., El-Sayed, M., Rege, B.D., Polli, J.E. und Ghandehari, H., *Transport of poly amidoamine dendrimers across Madin-Darby canine kidney cells*. *Int. J. Pharm.*, 2001. **215**(1-2): p. 263-267.
34. Wiener, E.C., Konda, S., Shadron, A., Brechbiel, M. und Gansow, O., *Targeting dendrimer-chelates to tumors and tumor cells expressing the high-affinity folate receptor*. *Investig. Radiol.*, 1997. **32**(12): p. 748-754.
35. Godbey, W.T., Wu, K.K. und Mikos, A.G., *Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999. **96**(9): p. 5177-5181.
36. Yoo, H. und Juliano, R.L., *Enhanced delivery of antisense oligonucleotides with fluorophore-conjugated PAMAM dendrimers*. *Nucleic Acids Res.*, 2000. **28**(21): p. 4225-4231.
37. Greish, K., *Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: A royal gate for targeted anticancer nanomedicines*. *J. Drug Targeting*, 2007. **15**(7-8): p. 457-464.
38. Capala, J., Barth, R.F., Bendayan, M., Lauzon, M., Adams, D.M., Soloway, A.H., Fenstermaker, R.A. und Carlsson, J., *Boronated epidermal growth factor as a potential targeting agent for boron neutron capture therapy of brain tumors*. *Bioconjugate Chem.*, 1996. **7**(1): p. 7-15.
39. KukowskaLatallo, J.F., Bielinska, A.U., Johnson, J., Spindler, R., Tomalia, D.A. und Baker, J.R., *Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using*



- Starburst polyamidoamine dendrimers*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1996. **93**(10): p. 4897-4902.
40. Fuchs, S., *Dissertation FU Berlin 2004*.
  41. Fuchs, S., Kapp, T., Otto, H., Schoneberg, T., Franke, P., Gust, R. und Schluter, A.D., *A surface-modified dendrimer set for potential application as drug delivery vehicles: Synthesis, in vitro toxicity, and intracellular localization*. Chem.--Eur. J., 2004. **10**(5): p. 1167-1192.
  42. Kapp, T., *Dissertation FU Berlin. 2006*.
  43. Carreno-Gomez, B. und Duncan, R., *Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres*. Int. J. Pharm., 1997. **148**(2): p. 231-240.
  44. Choksakulnimitr, S., Masuda, S., Tokuda, H., Takakura, Y. und Hashida, M., *In-vitro cytotoxicity of macromolecules in different cell-culture systems*. J. Controlled Release, 1995. **34**(3): p. 233-241.
  45. Fischer, D., Li, Y.X., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J. und Kissel, T., *In vitro cytotoxicity testing of polycations: Influence of polymer structure on cell viability and hemolysis*. Biomaterials, 2003. **24**(7): p. 1121-1131.
  46. Beyer, U., Kruger, M., Schumacher, P., Unger, C. und Kratz, F., *Synthesis of new bifunctional maleimide compounds for the preparation of chemoimmunoconjugates*. Monats. Chem., 1997. **128**(1): p. 91-102.
  47. Werner, W., Letsch, G. und Ihn, W., *Hydrolysis products of the cancerostatic drug cytostasan (bendamustin)*. Pharmazie, 1987. **42**(4): p. 272-273.
  48. Klausner, Y.S. und Bodansky, M., *Coupling reagents in peptide synthesis*. Synthesis-International Journal of Methods in Synthetic Organic Chemistry, 1972(9): p. 453-463.
  49. Sheehan, J.C. und Ledis, S.L., *Total synthesis of a monocyclic peptide lactone antibiotic, etamycin*. J. Am. Chem. Soc., 1973. **95**(3): p. 875-879.
  50. Sheehan, J.C., Preston, J. und Cruickshank, P.A., *A rapid synthesis of oligopeptides derivatives without isolation of intermediates*. J. Am. Chem. Soc., 1965. **87**(11): p. 2492-2493.
  51. Li, Z.G., Yang, Q. und Qian, X.H., *Novel thiazonaphthalimides as efficient antitumor and DNA photocleaving agents: Effects of intercalation, side chains, and substituent groups*. Bioorg. Med. Chem., 2005. **13**(16): p. 4864-4870.
  52. Testa, U., Pelosi, E. und Peschle, C., *The transferrin receptor*. Crit. Revi. Oncog., 1993. **4**(3): p. 241-276.

53. Wagner, E., Cotten, M., Mechtler, K., Kirlappos, H. und Birnstiel, M.L., *DNA-binding transferrin conjugates as functional gene-delivery agents - synthesis by linkage of polylysine or ethidium homodimer to the transferrin carbohydrate moiety*. *Bioconjugate Chem.*, 1991. **2**(4): p. 226-231.
54. Zhou, Q.J., Bi, Y.J., Xiang, J.F., Tang, Y.L., Yang, Q.F. und Xu, G.Z., *Investigation on a potential targeting drug delivery system consisting of folate, mitoxantrone and human serum albumin*. *Chin. J. Chem.*, 2008. **26**(8): p. 1385-1389.
55. Tajmir-Riahi, H.A., *An overview of drug binding to human serum albumin: protein folding and unfolding*. *Sci. Iran.*, 2007. **14**(2): p. 87-95.
56. Khandare, J. und Minko, T., *Polymer-drug conjugates: Progress in polymeric prodrugs*. *Prog. Polym. Sci.*, 2006. **31**(4): p. 359-397.
57. Khandare, J.J., Chandna, P., Wang, Y., Pozharov, V.P. und Minko, T., *Novel polymeric prodrug with multivalent components for cancer therapy*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2006. **317**(3): p. 929-937.
58. Duncan, R., Hume, I.C., Yardley, H.J., Flanagan, P.A., Ulbrich, K., Subr, V. und Strohalm, J., *Macromolecular prodrugs for use in targeted cancer-chemotherapy - melphalan covalently coupled to N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymers*. *J. Controlled Release*, 1991. **16**(1-2): p. 121-136.
59. Shukla, G., Tiwari, A.K., Kumar, N., Sinha, D., Mishra, P., Chandra, H. und Mishra, A.K., *Polyethylene glycol conjugates of methotrexate and melphalan: Synthesis, radiolabeling and biologic studies*. *Canc. Biother. Rad.*, 2008. **23**(5): p. 571-579.
60. Kalaycio, M., *Bendamustine: A new look at an old drug*. *Cancer*, 2009. **115**(3): p. 473-479.
61. Leoni, L.M., Bailey, B., Reifert, J., Bendall, H.H., Zeller, R.W., Corbeil, J., Elliott, G. und Niemeyer, C.C., *Bendamustine (Treanda) displays a distinct pattern of cytotoxicity and unique mechanistic features compared with other alkylating agents*. *Clin. Cancer Res.*, 2008. **14**(1): p. 309-317.
62. Plosker, G.L. und Carter, N.J., *Bendamustine: A review of its use in the management of indolent non-Hodgkin lymphoma*. *Drugs*, 2008. **68**(18): p. 2645-2660.
63. Chang, S.Y., Alberts, D.S., Farquhar, D., Melnick, L.R., Walson, P.D. und Salmon, S.E., *Hydrolysis and protein-binding of melphalan*. *J. Pharm. Sci.*, 1978. **67**(5): p. 682-684.
64. Bosanquet, A.G., *Stability of melphalan solutions during preparation and storage*. *J. Pharm. Sci.*, 1985. **74**(3): p. 348-351.

65. Gust, R. und Krauser, R., *Investigations on the stability of bendamustin, a cytostatic agent of the nitrogen mustard type .1. Synthesis, isolation, and characterization of reference substances.* Monats. Chem., 1997. **128**(3): p. 291-299.
66. Pencheva, I., Bogomilova, A., Koseva, N., Obreshkova, D. und Troev, K., *HPLC study on the stability of bendamustine hydrochloride immobilized onto polyphosphoesters.* J. Pharm. Biomed. Anal., 2008. **48**(4): p. 1143-1150.
67. Hopwood, W.J. und Stock, J.A., *Effect of macromolecules upon rates of hydrolysis of aromatic nitrogen mustard derivatives.* Chem.-Biol. Interact., 1971. **4**(1): p. 31-39.
68. Farrell, N., Qu, Y. und Hacker, M.P., *Cytotoxicity and antitumor-activity of bis(platinum) complexes - a novel class of platinum complexes active in cell-lines resistant to both cisplatin and 1,2-diaminocyclohexane complexes.* J. Med. Chem., 1990. **33**(8): p. 2179-2184.
69. Kapp, T., Muller, S. und Gust, R., *Dinuclear alkylamine platinum(II) complexes of [1,2-bis(4-fluorophenyl)ethylenediamine]-platinum(II): Influence of endocytosis and copper and organic cation transport systems on cellular uptake.* ChemMedChem, 2006. **1**(5): p. 560-564.
70. Arlt, V.M., Stiborova, M., Hewer, A., Schmeiser, H.H. und Phillips, D.H., *Human enzymes involved in the metabolic activation of the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone: Evidence for reductive activation by human NADPH : cytochrome P450 reductase.* Cancer Res., 2003. **63**(11): p. 2752-2761.

## **5. Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## **Anhang 1**

## Unveröffentlichte Versuchsvorschriften aus Kapiteln 2.1.2 und 2.1.4

Die entsprechenden Geräte und Messbedingungen wurden bereits publiziert.

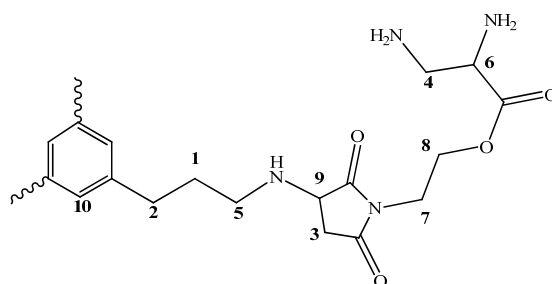
**O-[2,3-Di(tertbutyloxycarbonylamino)propanoyl]-2-hydroxyethylmaleinimid (10): 9** (2,2 g, 7,3 mmol), HEMI (1,13 g, 8,03 mmol) und DMAP (Spatelspitze) wurden in 100 ml wasserfreiem DCM gelöst und eine Lösung aus DCC (1,66 g, 8,03 mmol) in 100 ml wasserfreiem DCM wurde langsam hinzugegeben. Das Gemisch wurde 20 h bei RT gerührt. Der ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt und das Filtrat wurde im Vakuum eingedunstet. Der rote Rückstand wurde durch Säulenchromatographie (Kieselgel, DCM/Ethylacetat 5:1) gereinigt: 2 g (65%) als gelbes Öl.  $R_f=0.33$  (DCM/Ethylacetat 5:1);  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.42 (s, 9H,  $\text{CH}_2\text{-Boc}$ ), 1.43 (s, 9H,  $\text{CH}_2\text{-Boc}$ ), 3.47 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2$ ), 3.82 (t,  $^3\text{J}(\text{H,H})=5.06$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Nmaleinimid}$ ), 4.20 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{OCO}$ ), 4.29 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{OCO}$ ), 4.39 (m, 1H, CH), 5.04 (s, br, 1H, NH), 5.54 (s, br, 1H, NH), 6.73 (s, 2H,  $\text{CHmaleinimid}$ ); MS (EI, 80 eV,  $150^\circ\text{C}$ ):  $m/z$  (%): 428.0 (0.07) [ $\text{M}^++1$ ], 327.1 (0.11)  $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_6$ , 254.0 (15.26)  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_5$ , 57.0 (100.0)  $\text{C}_4\text{H}_9$ .

**O-[2,3-Diaminopropanoyl]-2-hydroxyethylmaleinimid dihydrochlorid (11): 10** (380 mg, 0,88 mmol) wurde in 10 ml THF gelöst. Zu dieser Lösung wurden 0,5 ml Salzsäure ( $w = 25\%$ ) hinzugegeben und das Gemisch wurde 24h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde in Methanol gelöst. Nach Zugabe von Diethylether wurde das ausgefallene Produkt abgesaugt: 180 mg (68%) als farbloser Feststoff.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 3.45 (m, 1H,  $\text{NH}_2\text{CH}_2$ ), 3.55 (m, 1H,  $\text{NH}_2\text{CH}_2$ ), 3.90 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{maleinimid}$ ), 4.41 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{OCO}$ ), 4.52 (m, 1H, CH), 6.89 (s, 2H,  $\text{CHmaleinimid}$ ); MS (EI, 80 eV,  $300^\circ\text{C}$ ):  $m/z$  (%): 224.1 (18.82) [ $\text{M}^+-3$ ], 181.1 (0.71)  $\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_4$ .

**O-[2,3-Diaminopropanoyl]-2-hydroxyethylmaleinimid Dichloroplatinum(II) Komplex (12): 11** (100 mg, 0,33 mmol) wurde in 7 ml Wasser gelöst,  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$  (552 mg, 1,33 mmol) wurde hinzugegeben und es wurde ein pH-Wert von 7 eingestellt. Es fiel ein Niederschlag aus. Die Suspension wurde 24 Stunden bei RT gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert auf 2 gestellt und das Gemisch noch eine Stunde gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt und über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet: 140mg (21,8%) als gelbes Pulver. Smp.:  $270^\circ\text{C}$  (Zersetzung);  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMF-d}_7$ ): 3.79 (t,  $^3\text{J}(\text{H,H})=5.47$  Hz 2H,  $\text{CH}_2\text{maleinimid}$ ), 4.25 (m, 1H,  $\text{NH}_2\text{CH}_2$ ), 4.35 (m, 1H,  $\text{NH}_2\text{CH}_2$ ), 5.35 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{OCO}$ ), 5.45 (m, 1H,

CH<sub>2</sub>OCO), 5.56 (s, br, 1H, CH), 7.05 (s, 2H, CHmaleinimid); <sup>13</sup>C NMR (DMF-d<sub>7</sub>): δ= 36.94 (CH<sub>2</sub>Nmaleinimid), 50.99 (CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 63.19 (CH<sub>2</sub>OCO), 63.58 (CHNH<sub>2</sub>), 135.33 (CHmaleinimid), 168.66 (COO), 171.64 (COmaleinimid); Elementaranalyse berechnet (%) für C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>Pt<sup>2+</sup>·0.1H<sub>2</sub>O (493.2): C 21.92, H 2.66, N 8.52; gefunden: C 21.84, H 2.69, N 8.49.

**1,3,5-Tris{N-[(2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)ethyl 2,3-bis(tertbutoxycarbonylamino)propanoat)-1-yl]propylamino}benzene (23):** **10** (400 mg, 0,95 mmol) wurde in 20 ml Chloroform und **G0** Hydrochlorid (103 mg, 0,285 mmol) wurde in 2 ml wasserfreiem MeOH durch Zugabe von 151 µl DIPEA gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde 43 h refluxiert. Anschließend wurde das Gemisch 1x mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 1x mit Natriumchlorid-Lösung neutral gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wurde durch Säulenchromatographie (Kieselgel, Chloroform/MeOH 20:1) gereinigt: 130 mg (29,8%) als gelbes Öl. R<sub>f</sub>= 0.24 (DCM/MeOH 10:1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.41 (s, 27H, CH-Boc), 1.43 (s, 27H, CH-Boc), 1.79 (quin, <sup>3</sup>J(H,H)=6.96 Hz, 6H, **1** CH<sub>2</sub>), 2.49-2.61 (m, 12H, **2** CH<sub>2</sub>), 2.75 (m, 3H, **3** CH<sub>2</sub>), 2.95 (m, 3H, **3** CH<sub>2</sub>), 3.46 (m, 6H, **4** CH<sub>2</sub>), 3.80 (m, 6H, **5** CH<sub>2</sub>), 4.15-4.23 (m, 3H, **6** CH<sub>2</sub>), 4.27 (m, 3H, **6** CH<sub>2</sub>), 4.33-4.44 (m, 3H, **7** CH), 5.14-5.26 (m, 3H, **7** CH), 6.82 (s, 3H, **8** CH); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ= 27.20 (**1** CH<sub>2</sub>), 29.14 (CH<sub>3</sub>), 35.20 (**3** CH<sub>2</sub>+CH<sub>2</sub>Ar), 43.41 (**4+5** CH<sub>2</sub>), 47.90 (CH<sub>2</sub>NHsuccinimid), 53.27 (**7** CH), 55.99 (**6** CH<sub>2</sub>), 81.21 (C), 130.82 (**8** CH), 138.31 (Caromatisch), 158.25 (NHCOO), 158.94 (NHCOO), 173.44 (COO+COsuccinimid), 178.24 (COsuccinimid); MS (ESI): berechnet für C<sub>72</sub>H<sub>114</sub>N<sub>12</sub>O<sub>24</sub> 1531.8140, gefunden 1531.8164.

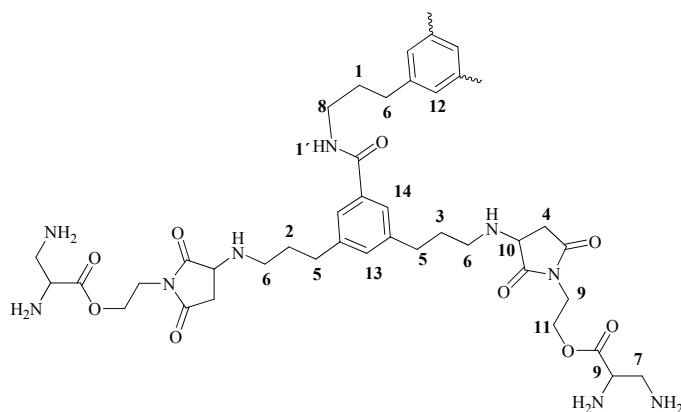


**1,3,5-Tris{N-[(2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)ethyl 2,3-bisaminopropanoate-1-yl]propylamino}benzene Hexafluoroacetat (24):** Zu einer Lösung von **23** (180 mg, 0,117 mmol) in 4 ml DCM wurde 1,1 ml TFA (w = 95%) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei RT gerührt und kontinuierlich über DC überwacht. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt: 180 mg, 94% als gelb-brauner Feststoff nach Lyophilisation aus Wasser. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 2.04 (m, 6H, **1** CH<sub>2</sub>), 2.71 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.29 Hz, 6H, **2** CH<sub>2</sub>), 3.03 (dd,



$^3\text{J}(\text{H,H})=5.39\text{ Hz}$ ,  $17.59\text{ Hz}$ ,  $6\text{H}$ , **3**  $\text{CH}_2$ ),  $3.21\text{ (m, }6\text{H, }3+4\text{ CH}_2)$ ,  $3.34\text{-}3.49\text{ (m, }9\text{H, }4+5\text{ CH}_2)$ ,  $3.56\text{ (m, }3\text{H, }6\text{ CH)}$ ,  $3.91\text{ (m, }6\text{H, }7\text{ CH}_2)$ ,  $4.4\text{ (m, }6\text{H, }8\text{ CH}_2)$ ,  $4.52\text{ (m, }3\text{H, }9\text{ CH)}$ ,  $6.99\text{ (s, }3\text{H, }10\text{ CH)}$ ;  $^{13}\text{C NMR (CD}_3\text{OD)}$ :  $\delta= 28.98\text{ (1 CH}_2)$ ,  $33.18\text{ (3 CH}_2)$ ,  $33.29\text{ (2 CH}_2)$ ,  $36.87\text{ (7 CH}_2)$ ,  $39.85\text{ (4 CH}_2)$ ,  $47.45\text{ (5 CH}_2)$ ,  $50.92\text{ (6 CH)}$ ,  $55.25\text{ (9 CH)}$ ,  $59.17\text{ (8 CH}_2)$ ,  $127.79\text{ (10 CH)}$ ,  $142.37\text{ (Caromatisch)}$ ,  $170.1\text{ (COO)}$ ,  $173.78\text{ (COsuccinimid)}$ ,  $174.24\text{ (COsuccinimid)}$ ; MS (ESI): berechnet für  $\text{C}_{42}\text{H}_{67}\text{N}_{12}\text{O}_{12}$   $931.500$ , gefunden  $931.5034$ ; MS (FAB+, MNBA/DCM):  $m/z : 931.5\text{ [M+H]}^+$ .

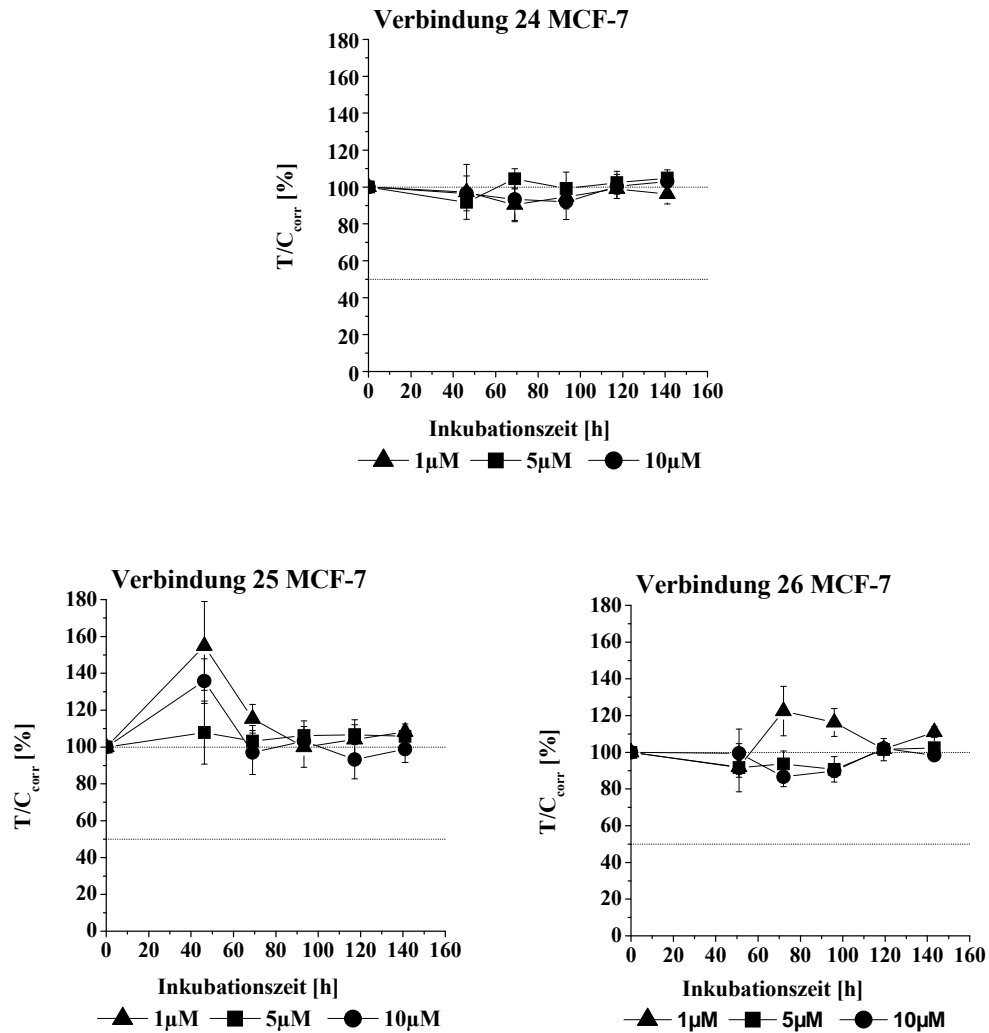
**1,3,5-Tris{3,5-bis-[N-[(2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)ethyl 2,3-bis(tertbutoxycarbonylamino)propanoat)-1-yl]propylamino]-N-propylbenzamid}benzene (25):** **24** ( $670\text{ mg}$ ,  $1,56\text{ mmol}$ ) wurde in  $50\text{ ml}$  Chloroform gelöst und eine Lösung aus  $\text{G1}\cdot\text{CF}_3\text{COOH}$  ( $377\text{ mg}$ ,  $0,23\text{ mmol}$ ) in wasserfreiem MeOH und  $136\text{ }\mu\text{l}$  DIPEA wurde hinzugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde  $48\text{ h}$  refluxiert und kontinuierlich über DC überwacht. Anschließend wurde das Gemisch 1x mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und 1x mit Natriumchlorid-Lösung neutral gewaschen. Die organische Phase wurde über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wurde durch Säulenchromatographie (Kieselgel, Chloroform/MeOH 10:1) gereinigt:  $370\text{ mg}$  ( $45\%$ ) als gelber Feststoff.  $R_f= 0.25$  (Chloroform/MeOH 10:1);  $^1\text{H NMR (400 MHz, CDCl}_3)$ :  $1.35\text{ (s, }108\text{H, }1\text{ CH}_2)$ ,  $1.75\text{ (m, }12\text{H, }2\text{ CH}_2)$ ,  $1.88\text{ (m, }6\text{H, }3\text{ CH}_2)$ ,  $2.58\text{ (m, }30\text{H, }4\text{ CH}_2)$ ,  $2.68\text{ (m, }6\text{H, }5\text{ CH}_2)$ ,  $2.89\text{ (m, }6\text{H, }5\text{ CH}_2)$ ,  $3.38\text{ (m, }6\text{H}+12\text{H, }6\text{ CH}_2)$ ,  $3.73\text{ (m, }6\text{H}+6\text{H, }7\text{ CH}_2)$ ,  $4.12\text{-}4.27\text{ (m, }12\text{H, }8\text{ CH}_2)$ ,  $5.4\text{ (m, }6\text{H, }9\text{ CH)}$ ,  $6.81\text{ (s, }3\text{H, }10\text{ CH)}$ ,  $7.06\text{ (s, }3\text{H, }11\text{ CH)}$ ,  $7.38\text{ (s, }6\text{H, }12\text{ CH)}$ ;  $^{13}\text{C NMR (CDCl}_3)$ :  $\delta= 28.33\text{ (CH}_3)$ ,  $30.97\text{ (CH}_2)$ ,  $33.05\text{ (CH}_2)$ ,  $36.04\text{ (CH}_2\text{succinimid)}$ ,  $37.73\text{ (CH}_2\text{Nsuccinimid)}$ ,  $39.6\text{ (CH}_2\text{NHCO)}$ ,  $41.86\text{ (CH}_2\text{diaminopropionsäure)}$ ,  $46.77\text{ (CH}_2\text{NHsuccinimid)}$ ,  $54.56\text{ (CHsuccinimid)}$ ,  $56.24\text{ (CH diaminopropionsäure)}$ ,  $62.22\text{ (CH}_2\text{OCO)}$ ,  $80.03\text{ (C(CH}_3)_3)$ ,  $124.82\text{ (Caromatisch)}$ ,  $126.36\text{ (Caromatisch)}$ ,  $131.49\text{ (Caromatisch)}$ ,  $135.03\text{ (Caromatisch)}$ ,  $141.75\text{ (Caromatisch)}$ ,  $142.14\text{ (Caromatisch)}$ ,  $155.51\text{ (COBoc)}$ ,  $167.85\text{ (NHCOAr)}$ ,  $170.69\text{ (COO)}$ ,  $175.46\text{ (COsuccinimid)}$ ,  $178.07\text{ (COsuccinimid)}$ ; MS (ESI): berechnet für  $\text{C}_{168}\text{H}_{257}\text{N}_{27}\text{O}_{51}^{2+}$   $1735.4198$ , gefunden  $1735.4244$ ; berechnet für  $\text{C}_{168}\text{H}_{257}\text{N}_{27}\text{O}_{51}^{3+}$   $1157.2823$ , gefunden  $1157.2814$ .



**1,3,5-Tris{3,5-bis-[N-[(2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)ethyl 2,3-bisaminopropanoate)-1-yl] propylamino]-N-propylbenzamide}benzene dodecatrifluoroacetate (26):** Zu einer Lösung von **25** (220 mg, 0,063 mmol) in 10 ml DCM wurden 8 ml TFA (w = 95%) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei RT gerührt und kontinuierlich über DC überwacht. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt: 190 mg (83%) als braunes Öl nach Lyophilisation aus Wasser.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.86 (quin,  $^3\text{J}(\text{H,H})=8.55$  Hz, 6H, **1**  $\text{CH}_2$ ), 2.02 (s, br, 6H+12H, **2**+ $\text{NH}_2$   $\text{CH}_2$ ), 2.18 (s, br, 6H+12H, **3**+ $\text{NH}_2$   $\text{CH}_2$ ), 2.66 (t,  $^3\text{J}(\text{H,H})=7.28$  Hz, 6H, **4**  $\text{CH}_2$ ), 2.74 (t,  $^3\text{J}(\text{H,H})=7.27$  Hz, 6H+6H, **5**  $\text{CH}_2$ ), 2.89 (m, 6H+18H, **4**+**6**  $\text{CH}_2$ ), 3.13 (dd,  $^3\text{J}(\text{H,H})=5.11$  Hz, 17.8 Hz, 12H, **7**  $\text{CH}_2$ ), 3.23 (m, 6H, **8**  $\text{CH}_2$ ), 3.49 (m, 12H+6H, **9**  $\text{CH}_2$ ), 3.67 (m, 6H, **10** CH), 4.51 (m, 12H, **11**  $\text{CH}_2$ ), 6.99 (s, 3H, **12** CH), 7.01 (s, 3H, **1'** NH), 7.42 (s, 3H, **13** CH), 7.64 (s, 6H, **14** CH);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=$  29.2 ( $\text{CH}_2$ ), 32.53 ( $\text{CH}_2$ ), 33.66 ( $\text{CH}_2$ succinimid), 34.74 ( $\text{CH}_2$ ), 40.21 ( $\text{CH}_2$ Nsuccinimid), 40.59 ( $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 41.29 ( $\text{CH}_2$ ), 43.07 ( $\text{CH}_2$ ), 47.83 (CHdiaminopropionsäure), 55.66 (CHsuccinimid), 59.61 ( $\text{CH}_2\text{OCO}$ ), 126.89 (Caromatisch), 127.70 (Caromatisch), 133.25 (Caromatisch), 136.97 (Caromatisch), 142.90 (Caromatisch), 143.64 (Caromatisch), 168.85 ( $\text{NHCOAr}$ ), 170.63 ( $\text{COO}$ ), 174.29 ( $\text{COsuccinimid}$ ), 174.89 ( $\text{COsuccinimid}$ ); MS (ESI): berechnet für  $\text{C}_{108}\text{H}_{160}\text{N}_{27}\text{O}_{27}$  2268.1932, gefunden 2268.1717.

## Unveröffentlichte Ergebnisse der Zytotoxizitätstests aus Kapitel 2.2.1.1

Die Versuchsvorschriften der biologischen Untersuchungen wurden bereits publiziert.



**Abb. 15:** *In vitro* Zytotoxizität der Dendrimer-Spacer-Ethylenediamin-Derivate 24, 25 und 26 an der MCF-7 Zelllinie.