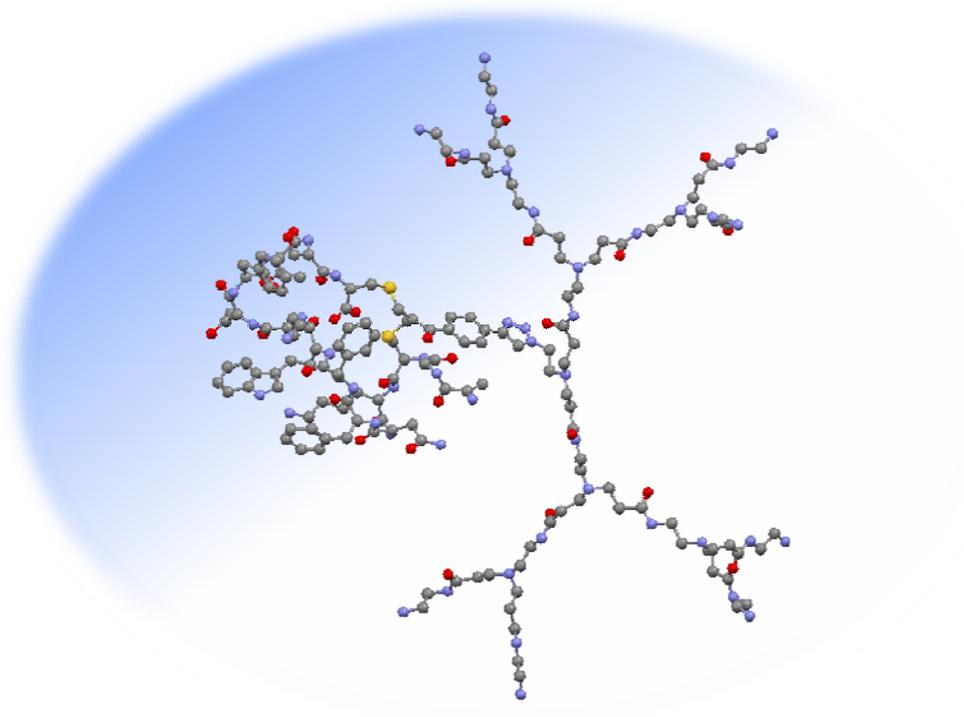


Bifunktionale Dendrone für die ortsgerichtete Peptidfunktionalisierung

Diplomarbeit



Zur Erlangung des Grades eines Diplomchemikers im Fachbereich Chemie der Johannes-
Gutenberg-Universität Mainz in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für
Polymerforschung in Mainz

Vorgelegt von Oliver Dumele
geboren in Ludwigshafen a. Rh.

Mainz, März 2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2010 bis Februar 2011 im Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz unter der Anleitung von Professor Dr. Tanja Weil und Professor Dr. Klaus Müllen angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Klaus Müllen und Frau Prof. Dr. Tanja Weil für die Vergabe dieses anspruchsvollen Themas. Ihr wissenschaftlicher Rat und die hilfreichen Diskussionen haben mich stets motiviert.

meinem Großvater Johann Klug

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG UND HINTERGRUND	7
1.1 Dendrimere und Dendrone	7
1.1.1 Dendritische Moleküle	8
1.1.2 Eigenschaften dendritischer Systeme	10
1.1.3 Synthese Dendritischer Molekülstrukturen	13
1.1.4 PAMAM-Dendrimere und Dendrone	16
1.1.5 Dendrimer-Wirkstoff-Konjugate mit medizinischer Applikation	19
1.2 Biohybrid-Materialien.....	23
1.2.1 Dendrimer vs. Protein.....	24
1.2.2 Eine hochspezifische Peptid-Modifikation: die Disulfid-Interkalation	25
1.2.3 Dendronisierte Proteine und Peptide	28
1.2.4 Ein universelles Peptid: Somatostatin und seine Funktionen	30
2. MOTIVATION UND ZIELSETZUNG.....	33
3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	39
3.1 Synthese der Dendrone.....	40
3.1.1 Azido-PAMAM-Dendrone.....	41
3.1.2 Ethinyl-PAMAM- und hybrides Azido-PAMAM-Lysin-Dendron	50
3.2 Linkersynthesen	56
3.2.1 Iod-monosulfon-Linker	57
3.2.2 Ethinyl-monosulfon-Linker.....	58
3.3 Dendritische Interkalatoren G1-G3	60
3.3.1 1,3-Dipolare Cycloaddition	60
3.3.2 Der Sonogashira-Ansatz.....	65
3.4 Darstellung der dendronisierten Peptide	70
3.4.1 „Grafting from“-Ansatz für Somatostatin	70
3.4.2 „Grafting onto“-Ansatz für Somatostatin	71
3.4.3 Dendronisierung kurzkettiger, linearer Peptide: RGDC-Dendrone.....	80
4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	87

5. EXPERIMENTELLER TEIL.....	93
5.1 Instrumentelle Analytik.....	93
5.2 Allgemeine experimentelle Bedingungen	94
5.3 Hergestellte Substanzen	95
5.3.1 Azido-Dendrone.....	95
5.3.2 Ethinyl-Dendrone.....	104
5.3.3 Monosulfon-Peptid-Linker.....	114
5.3.4 Dendritische Monosulfon-Interkalatoren	114
5.3.5 Peptid-Modifikationen	121
6. LITERATUR.....	123
DANKSAGUNG.....	131

Abkürzungen und Indizes

ATRP	(engl.) Atom Transfer Radical Polymerization
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
δ	(NMR-Spektrum) chemische Verschiebung in ppm
C	Cystein
D	Asparaginsäure
d (NMR-Spektrum)	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EA	Elementaranalyse
EDA	Ethan-1,2-diamin
EtOAc	Ethylacetat
ESI	Electrospray-Ionisation
FD	Feld-Desorption
FT	Fourier Transformation
<i>G_n</i>	Dendrimer-/Dendrongeneration, $n = 0, 0.5, 1.0, 1.5, ..$
G	Glycin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IR	Infrarot
J (NMR-Spektrum)	Kopplungskonstante / Hz
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
M	molar [mol/l]

m (NMR-Spektrum)	Multiplett
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
m/z	Masse pro Ladung z
MS	Massenspektrometrie
NMR	Kernresonanz-Spektroskopie (nuclear magnetic resonance)
N _x	Anzahl der Atome des Elements x
NP	<i>para</i> -Nitrophenyl
PAMAM (Dendrimer)	Poly(amidoamin)
PEG	Poly(ethylenglykol)
POPAM (Dendrimer)	Poly(propylenimin)
ppm	parts per million
R	Arginin
RGDC	Peptidsequenz aus den L-Aminosäuren R, G, D und C
RT	Raumtemperatur
s (NMR-Spektrum)	Singulett
t (NMR-Spektrum)	Triplett
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TFA	Trifluoressigsäure
TIPS	Triisopropylsilyl
THF	Tetrahydrofuran
Tol	Toluol
UV-VIS	Ultraviolett-sichtbares Licht

1. Einleitung und Hintergrund

1.1 Dendrimere und Dendrone

Seit Beginn der Polymer-Chemie und dem Verständnis der makromolekularen Molekülstruktur durch Hermann Staudinger^[1] entwickelt sich dieses Forschungsgebiet hin zu immer komplexeren und synthetisch anspruchsvolleren Molekülarchitekturen. Über die zunächst linearen, klassischen Polymerketten (**I** in Abb. 1) und die durch *Flory*^[2] beschriebenen statistischen Netzwerke (**II**) wurden in jüngerer Zeit immer definiertere Verzweigungen in makromolekulare Architekturen eingeführt (**IV**). Als strukturperfekte Vertreter sind besonders Dendrimere und Dendrone (**IV c, d**) seit den vergangenen zwei Jahrzehnten von hohem Interesse. Ihre ausgereifte Struktur mit sämtlichen Modifikationen und funktionellen Gruppen bringt neue Einsichten und ein besseres Verständnis der nanostrukturierten Moleküle^[3], aus welchem sich fortschrittliche Technologie und zunehmend viele Applikationen ergeben^[4, 5, 6].

Die vorliegende Arbeit bezieht sich hauptsächlich auf die Beschreibung der hochdefinierten Strukturen (**IV**) und umfasst synthetisch den Bereich der Dendrimere und Dendrone, welche mit der folgenden Einleitung in Struktur, Aufbau und biologisch-medizinischer Anwendung beschrieben werden.

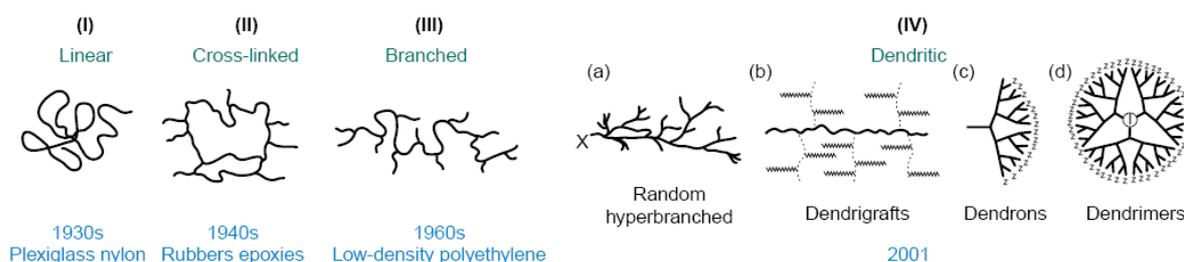


Abb. 1: Entwicklung der Verzweigungsarchitektur in Makromolekülen

Der Begriff „Dendrimer“ wurde von *Tomalia*^[7] eingeführt und leitet sich aus dem griechischen Wort „δένδρον“ (ausgesprochen *dendron* = Baum) ab, da die Gestalt dieser dreidimensionalen Makromoleküle der Struktur einer Baumkrone ähnelt. In vielen Bereichen der Natur, Wissenschaft und Kunst spielen solche hochsymmetrischen Formen

eine wichtige Rolle. Abbildung 2 zeigt einige natürlich vorkommende dendritische Strukturen aus den genannten Bereichen.

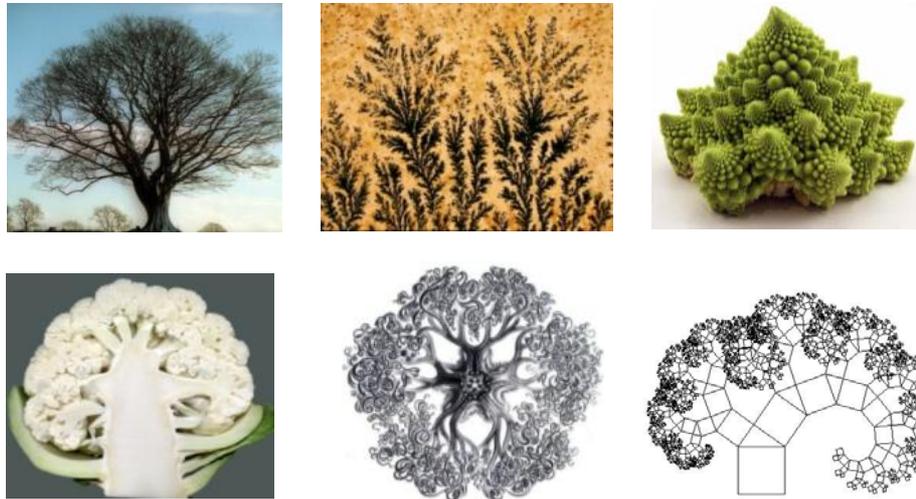


Abbildung 2: Dendritische Strukturen: Baumkrone, Kristallwachstum, Romanesco-Kohl, Querschnitt eines Blumenkohls, Malerei von Ernst Haeckel, math. Fraktal: der Baum des Pythagoras

Inspiziert von diesen faszinierenden Strukturen und dem Verständnis des Nutzens derer entworfen Wissenschaftler nachahmende Gerüste auf einer makromolekularen Größenskala und prägten das Gebiet der Dendrimer-Chemie.

1.1.1 Dendritische Moleküle

Über die ersten Vertreter hochverzweigter, symmetrischer Moleküle wurde von *Vögtle et al.* ^[8] im Jahre 1978 unter dem Namen „Kaskaden-Moleküle“ berichtet. Dabei wurde ausgehend von primären Aminen eine Michael-Addition mit Acrylnitril vorgenommen, was zur einer 1→2-Verzweigung im Molekülgerüst führt (s. Abb. 3). Die anschließende Reduktion der Nitril-Gruppen zu primären Aminen schließt den Reaktionszyklus einer Wachstumsstufe ab und bietet neue Wachstumspunkte für die nächste Generation des Dendrimers. Durch Iteration erhält man wieder neue Verzweigungen und den schrittweisen Aufbau der dendritischen Struktur.

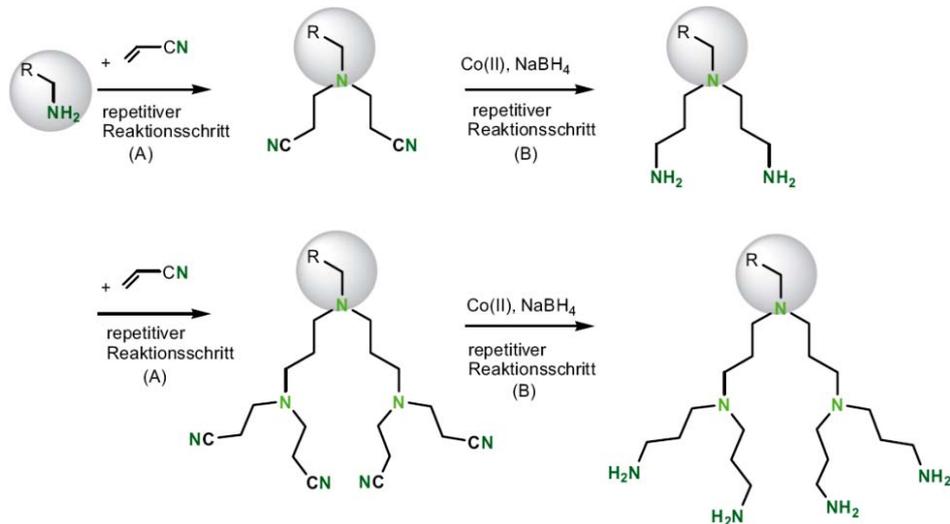


Abb. 3: Erste Synthese von Kaskaden-Molekülen (nach Vögtle *et al.*)^[8, 4]

Nach Publikationen von *Newkome et al.*^[9] über Polyamid-Dendrimer-Strukturen und Patenten von *Denkewalter et al.*^[10] zu Poly-L-Lysin-Dendrimeren folgte eine Neuerung der Synthesemethode durch *J. M. J. Fréchet* mit einem konvergenten Ansatz^[11] zur Synthese der ersten Polyarylether-Dendrimere (s. Abb. 4 und Kapitel 1.1.3).

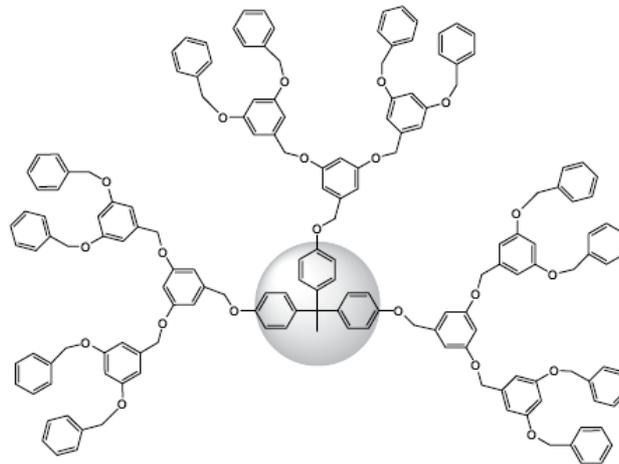


Abb. 4: Fréchet-Dendrimer

Im Jahr 1985 veröffentlichten *Newkome et al.* ein Arborol-System^[9] (*arbor lat.*, Baum), welches über eine divergente Syntheseroute erhalten wurde und aus Polyamiden besteht. Im gleichen Jahr entwickelte die Gruppe um *Tomalia*^[12] eine Synthese zu Poly(amidoamin)-Dendrimeren („PAMAM“-Dendrimere), welche auch unter dem Namen „Starbust“-Dendrimere seit einigen Jahren kommerziell erhältlich sind^[13] (s. Kapitel 1.1.4).

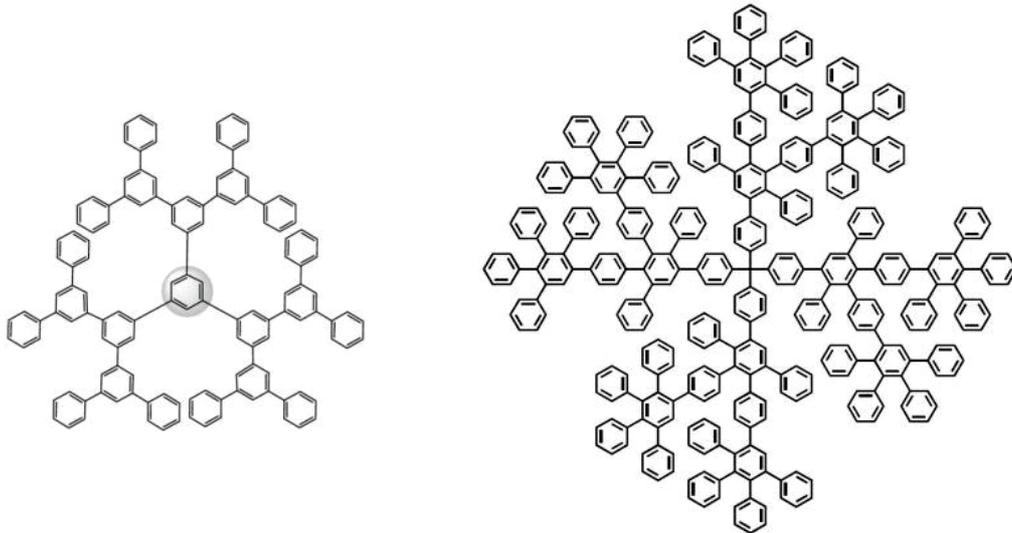


Abb. 5: (li) KW-Dendrimer (*Miller, Neenan*)^[14], (re) Polyphenylen-Dendrimer (PPD) nach *Müllen et al.*^[15]

Neben den polaren Strukturen von Denkewalter, Tomalia, Vögtle und Newkome, welche allesamt Heteroatome beinhalten, wurde im Jahr 1990 der erste Ansatz für reine Kohlenwasserstoff-Gerüste auf Polyaren-Basis durch *Miller* und *Neenan* vorgestellt^[14]. Nur wenige Jahre später wurde dieses Konzept weiter durch *Müllen et al.* mit den Polyphenylen-Dendrimeren (PPD's) erweitert^[15, 16]. Der schrittweise Aufbau durch Diels-Alder-Reaktion ermöglichte in weiteren Modifikationen dieser Grundstruktur den flexiblen Einbau neuartiger funktioneller Gruppen und Strukturelemente, die bis heute lange nicht ausgeschöpft sind und viele aktuelle Fragestellungen behandeln^[17, 18, 19].

1.1.2 Eigenschaften dendritischer Systeme

Dendrimere stellen makromolekulare (Nano-)Architekturen von gut definierter Größe und Anzahl an Endgruppen dar. Sie basieren zumeist auf einem mehrfach funktionalisierten Kern, welcher sich mit jeder Generation dreidimensional nach außen hin verzweigt - oft in regelmäßigen Schichten ähnlich einer Zwiebel. Man bezeichnet die für das Dendrimer charakteristische Schalen als *Generationen* (s. Abb. 6), welche meistens auch ein Maß für die Größe und den Synthesaufwand darstellen. Die einzelnen, direkt vom Kern ausgehenden Verzweigungseinheiten werden als *Dendrone* und die formal gedachte kugelförmige Oberfläche als *Peripherie* bezeichnet. Diese kann wiederum funktionalisiert sein, so dass weiteres Wachstum möglich ist oder bestimmte Eigenschaften eingeführt werden können.

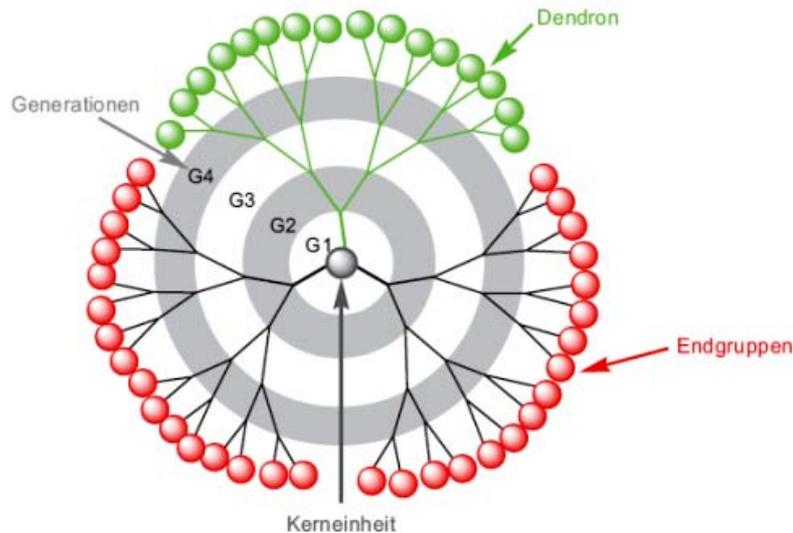


Abb. 6: Aufbau eines Dendrimer-Gerüsts mit drei Dendronen

Maßgeblich für die Eigenschaften der Dendrimere sind vor allem die Anzahl der Generationen (Größe des Moleküls) und die terminalen funktionellen Gruppen. Jedoch sollte bei dieser Betrachtung berücksichtigt werden, dass sich in der tatsächlichen Geometrie eines Dendrimers mit flexiblem Gerüstbau (z.B. überwiegend aliphatische Äste) nicht alle Endgruppen immer außen befinden, sondern sich (mit ansteigender Generationszahl) in einem zeitlich dynamischen Prozess nach innen falten^[20].

Dagegen sind bei den rigiden Gerüsten, wie den Polyphenylen-Dendrimern von Müllen *et al.*, die Endgruppen in der geometrischen Peripherie lokalisiert und bilden eine *dichte Schale-Struktur*^[21, 22]. Deshalb besitzen aliphatische Dendrimere, wie z. B. PAMAM (siehe Kap. 1.1.4) im Gegensatz zu den rigiden Vertretern keine definierte Form und Porengröße sowie kein homogenes Äußeres. Weiterhin setzt sich mittlerweile die Meinung durch, dass isolierte, flexible Dendrimere in einem guten Lösungsmittel nicht über die ursprünglich vorhergesagte „dichte Schale-Struktur“, sondern über eine „dichte Kern-Struktur“ verfügen^[23]. Dies bedeutet, dass bei solchen Dendrimern die Segmentdichte ihr Maximum im Zentrum des Moleküls hat und zur Peripherie hin abfällt^[4, S. 286]. Im Unterschied zu linearen Makromolekülen besitzen Dendrimere somit eine besonders raumfüllende Geometrie, wodurch sie sich in den Eigenschaften maßgeblich von den leichter zugänglichen linearen Polymeren abheben. Diese voluminöse Anordnung der einzelnen Äste führt bei einigen (eher rigiden und formstabilen) Dendrimer-Architekturen in hohen Generationen zu einer Kern-Schale-Anordnung (vgl. *dichte Schale-Struktur*)^[21], welche es erlaubt, reversibel Gastmoleküle (außer den Lösungsmittel-Molekülen)

einzulagern und unter bestimmten Umständen wieder freizusetzen („*dendritic box*“). Dabei geht man von einem Eindringen in die Hohlräume des Dendrimers aus, welche sonst von eher kleinen Lösungsmittelmolekülen belegt sind. Abgeschirmt durch eine dichte äußere Schale können hier auch unlösliche Gäste eingelagert werden, wodurch ein erstes Feld der Applikation für Dendrimere angesprochen wird^[24]. Dies konnte durch die Einlagerung und Wiederfreisetzung verschiedener (unlöslicher) Farbstoffmoleküle anschaulich demonstriert und spektroskopisch untersucht werden^[25]. Man kam dabei zu dem Entschluss, dass der Einschluss nur durch Diffusion in den freien Hohlkörper des Dendrimers erklärbar ist und nicht durch besonders starke supramolekulare Wechselwirkungen favorisiert sein muss. Jedoch gelang auch die Demonstration vieler Gerüste mit Bausteinen der supramolekularen Chemie, bei denen das Gastmolekül durch gezielte Wechselwirkungen im Inneren gehalten wird^[26].

Dieses Prinzip des Kern-Schale-Modells inspirierte die Dendrimer-Chemiker für eine weitere Architektur, bei der ein sensitiver, funktioneller Kern durch das äußere Dendrimer-Gerüst abgeschirmt wird^[17, 27]. Biomimetisch betrachtet liegt bei Proteinen, Enzymen und der DNA ebenfalls das funktionelle und aktive Zentrum häufig abgeschirmt im Inneren, vor allem wenn es sich um instabile Molekülspezies oder Metall-Komplexe bzw. -Cluster handelt. Die sterische Abschirmung verhindert einerseits das Eindringen einer reaktiven Spezies, aber auch die Aggregation zweier aktiver Zentren und bietet bei der Anwendung spezieller lichtabsorbierender Dendrimer-Gerüste ebenso eine Art Strahlenschutz (Schutz vor Photobleaching) für das Dendrimer-Innere.

Letzteres wurde durch *Fréchet*^[27], *Weil*^[17] und *Müllen et al.*^[28, 29] eindrucksvoll auf neu-konstruierte Lichtsammel-Antennen in den Dendrimer-Ästen erweitert, welche die Energie in Farbstoffmolekülen der Peripherie sammeln und sukzessive durch Energietransfer zum Kern befördern, welcher zuletzt die Photonen bündelt^[30].

Im besonderen Maße sind dendritische Strukturen für die Vielzahl ihrer funktionellen Gruppen interessant. Hierbei können der Kern, das Gerüst und die Peripherie einbezogen sein (s. Abb. 7), jedoch häuft sich das Interesse an den Endgruppen, die wie oben beschrieben maßgeblich für die Dendrimer-Eigenschaften sind und ihre Funktion ohne sterische Hinderung voll entfalten können (falls keine zu hohe Rückfaltung eintritt).

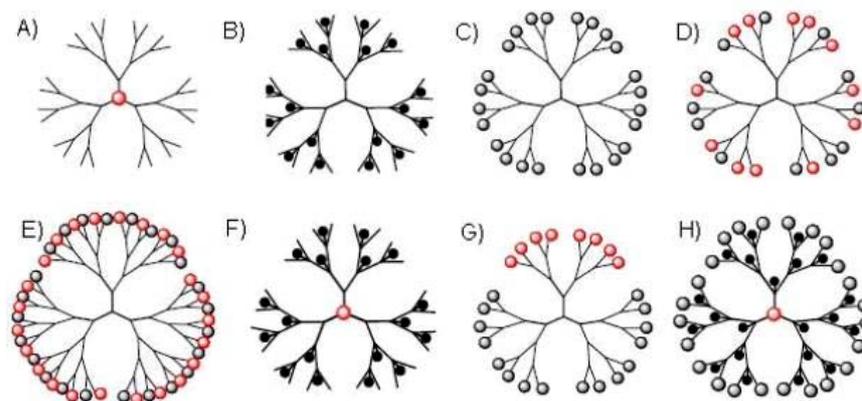


Abb. 7: Verschiedene Funktionalitäten: A-C: monofunktionell, D-G: bifunktionell, H: trifunktionell ^[4]

Für die Einführung von funktionellen Gruppen an Dendrimern ist im Hinblick auf die Synthese und mögliche Folgereaktionen unbedingt die chemische Orthogonalität der Funktionen zu berücksichtigen. Bei zusätzlicher Konjugation der Dendrimere an biologische Stoffe, wie Proteine, Peptide oder DNA ist auch auf die Verwendung bio-orthogonaler Gruppen zu achten, um keine Produktgemische oder Nebenreaktionen bei der weiteren Verarbeitung oder dem medizinischen Einsatz der Dendrimere zu erhalten.

Bis heute versucht man sich am hochkomplexen Aufbau von dendritischen Architekturen, welche verschiedene Funktionen (wie Farbstoffe, Proteine, aktive Wirkstoffe und Radiomarker) gleichzeitig an den einzelnen Ästen und dem Kern tragen ^[31]. Ein interessantes Beispiel mit sechs selektiv adressierbaren Gruppen (acht geschützte Amine, geschütztes Thiol, TBDPS-geschützte Hydroxylgruppe, freie Hydroxylgruppe, Lävulinsäurester und aktives Chlorid) wurde mittels bekannter Cyanursäurechlorid-Chemie für die konvergente Synthese eines multifunktionellen Dendrons erhalten ^[32]. Derartige komplexe Aufbauten zeigen das hohe Potential der multifunktionellen Dendrone mit vielseitigen Eigenschaften und Einsatz im medizinischen Bereich.

1.1.3 Synthese Dendritischer Molekülstrukturen

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen einem divergenten und einem konvergenten Ansatz für die Synthese von Dendrimern. In diesem Abschnitt sollen diese beiden Strategien vorgestellt und diskutiert werden. Neuere Synthesemethoden werden nicht detailliert besprochen, sondern nur kurz in ihrer Grundidee aufgeführt.

Divergente Synthese

Bei diesem Ansatz wird das Gerüst schrittweise vom Kern ausgehend aufgebaut. Jede Generation fordert mindestens zwei Reaktionsschritte: Die Aktivierung der Endgruppen und die folgende Verzweigungsreaktion (Abb. 8).

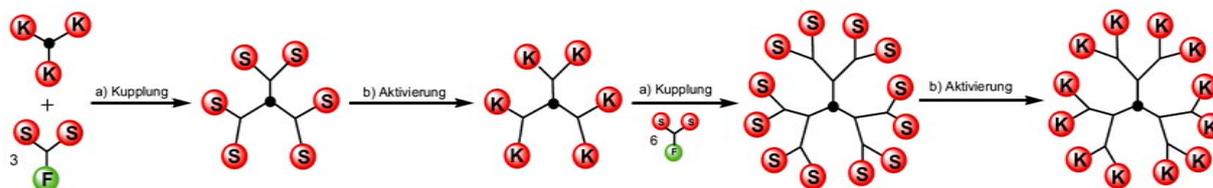


Abb. 8: Schema der divergenten Dendrimer-Synthese ^[4]

Man beginnt mit der Dendronisierung am Kern und aktiviert (z. B. durch Entfernen von Schutzgruppen) die entstandenen Endgruppen. Diese werden wiederum durch Kupplung verzweigt und für das Wachstum der nächsten Generation aktiviert. Sukzessive erhält man so die Dendrimer-Architektur durch die beschriebenen Iterationsschritte. Nachteil dieser Strategie ist die hohe Anzahl der Defekte im Gerüst, da nicht bei jeder Kupplung oder Aktivierung absolut 100% Reaktionsumsatz an den Endgruppen erreicht werden kann. Die Isolierung der strukturperfekten Moleküle ist sehr aufwändig und wegen der hohen Ähnlichkeit zu den defekten Strukturen kaum möglich. Man fand beispielsweise bei einem G4-PAMAM-Dendrimer lediglich 8% Reinheit der perfekten Struktur, welche durch einen divergenten Ansatz erhalten wurde ^[33]. Jedoch ermöglicht diese Methode auch die Einführung einer hohen Zahl von Generationen, da immer nur die Peripherie in die Reaktionen eingebunden ist.

Konvergente Synthese

Erstmals wurde die konvergente Synthesestrategie von *Fréchet et al.* im Jahre 1990 ^[11] vorgestellt. Die Methodik beginnt mit dem Aufbau einzelner Dendrone (Teilstücke), welche einen reaktiven fokalen Punkt (grünes F) tragen. In einem der letzten Schritte werden mehrere Dendrone an den Kern gekoppelt und man erhält aus den Teilstücken das gesamte Dendrimer. Die letzte Kopplung verlangt hohe Ausbeuten und erleichtert die Isolierung der defekten Strukturen, da der Molekulargewichtsunterschied zwischen perfekter Struktur und teilsubstituierten Kernen gravierend ist. Ebenso muss nicht mit sehr großen Überschüssen wie bei der divergenten Synthese gearbeitet werden, welches die

Aufarbeitung oftmals erleichtert. Daher können Dendrimere, welche konvergent synthetisiert wurden, mit sehr viel höherer Reinheit als im divergenten Ansatz erhalten werden ^[34, 35], sind aber wegen dem hohen sterischen Anspruch auf niedrigere Generationen beschränkt ^[36, 37].

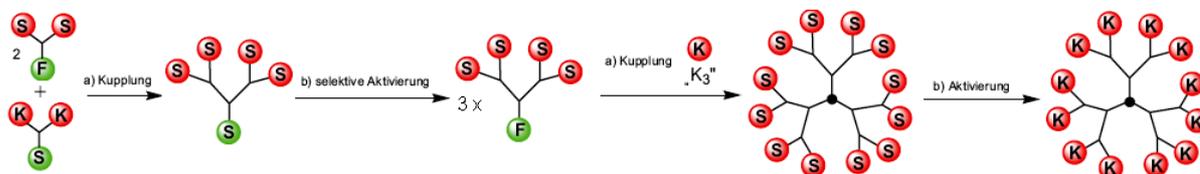


Abb. 9: Schema der konvergenten Dendrimer-Synthese ^[4]

Neuartige Synthesemethoden

Weitere neuere Synthesevarianten sollen, bis auf die *Click-Chemie*, in diesem Rahmen nur aufgezählt werden. Hierzu zählen die "Orthogonale Synthese" ^[38], die "Doppeltexponentielle-" ^[39] und "Hypermonomer Methode" ^[40] und Festphasen-Synthesen ^[41]. Ebenfalls möglich sind koordinationschemische Synthesen mit Metallkomplexen ^[42, 43]. Die für die vorliegende Arbeit relevante Click-Chemie ^[44] an Dendronen ermöglicht die Darstellung von Dendrimern mit verschiedenen Funktionalitäten, welche an den synthetisierten Strukturen von *Lee et al.* ^[45] verdeutlicht werden soll. Die durch einen divergenten Ansatz synthetisierten Azido-Dendrone konnten mit *n*-funktionalen Ethinyl-Kernen in einer 1,3-dipolaren Cycloaddition zum Dendrimer gekoppelt werden und waren nach einem Isolierungsschritt nur begrenzt verunreinigt. Es konnte ebenso der flexible Einsatz der Azid-Dendrone für weitere Ethinyl-Kopplungspartner und der Aufbau asymmetrischer Dendrimer-Architekturen eindrucksvoll an den vierten Generationen eines kombinierten Fréchet-Typ- und PAMAM-Dendrons gezeigt werden ^[46].

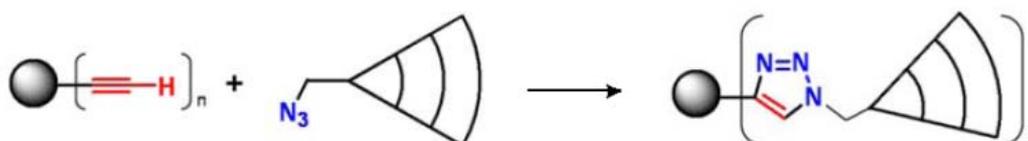


Abb. 10: Schema der 1,3 dipolaren Cycloaddition (Click-Reaktion) für den konvergenten Dendrimer-Aufbau

1.1.4 PAMAM-Dendrimere und Dendrone

Die bei der DOW CHEMICAL COMPANY von Tomalia entwickelten Poly(amidoamin)-Dendrimere („PAMAM“-Dendrimere) [12, 47, 48] waren die ersten Vertreter mit denen praktisch hohe Generationen erreicht werden konnten. Es sind die bisher am besten verstandenen dendritischen Systeme, die schon durch zahlreiche (chemo-)physikalische [6], biologische, physiologische [5] und *in vitro*- sowie *in vivo*- [49] Studien charakterisiert wurden.

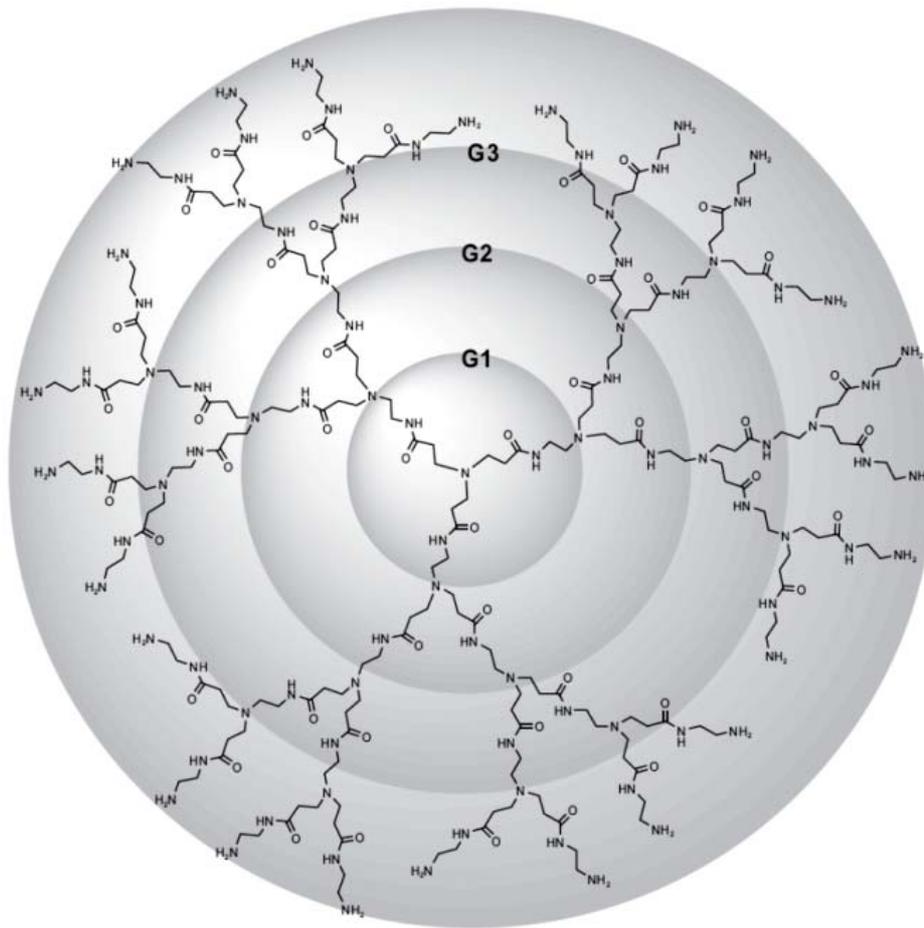


Abb. 11: G3-PAMAM Dendrimer mit Ammoniak-Kern

Neben einigen konvergenten Ansätzen [50] hat sich die divergente Synthese der PAMAM-Dendrimere von Tomalia et al. (inspiriert durch Vögtle) durchgesetzt (s. Abb. 12) [51]. Beginnend mit einem bifunktionellen Amin-Kern kommt es durch *Michael*-Addition mit Acrylsäuremethylester zur Verzweigung. Die Aktivierung und gleichzeitige Verlängerung der Endgruppen durch Amidierung mit Ethylendiamin führt nach vereinbarter Nomenklatur zur *nullten* ganzzahligen Generation G0,0 mit terminalen primären Aminen,

welche wieder zum Aufbau einer weiteren Generation genutzt werden können. Die nächste Ester-Stufe wird halbzahlig als G0,5 bezeichnet.

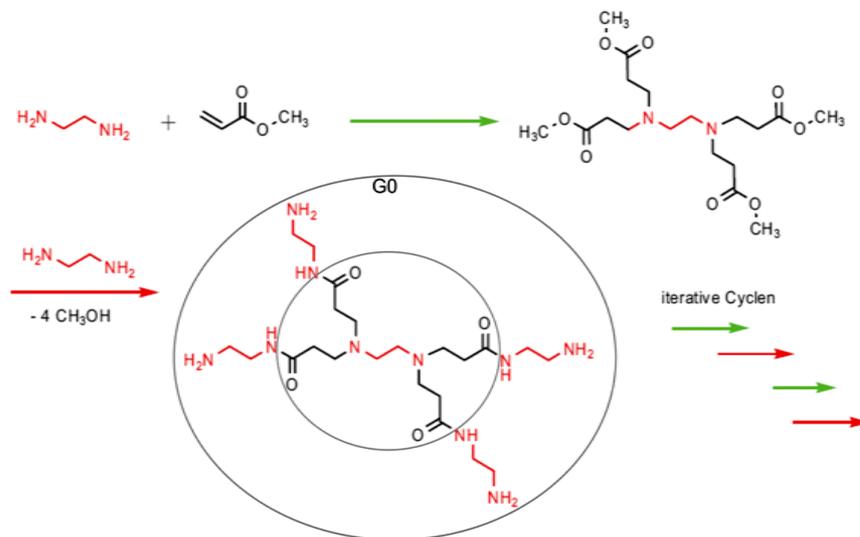


Abb. 12: Syntheschema eines PAMAM-Dendrimers mit Ethylendiamin-Kern (nach Tomalia et al.)

Seit einigen Jahren können PAMAM-Dendrimere der Generation 0 bis 10 in einer Vielfalt von Endgruppen im Handel bezogen werden ^[13] und stellen dadurch die ersten Vertreter einer kommerzialisierten Dendrimer-Serie dar.

PAMAM-Dendrimere sind als basische Polyamide anzusehen und daher gut in polaren Lösungsmitteln wie Dichlormethan, kurzkettigen Alkoholen, Dimethylformamid und Wasser löslich (in letzterem vor allem die aminoterminierten Vertreter). Ebenfalls ist eine hohe Hydrolysestabilität vorhanden. Im Vergleich zu ähnlichen Gerüsten wie z. B. Poly(propylenimin)-Dendrimern („POPAM“), haben PAMAM-Dendrimere ein viel größeres Volumen. Bereits die nullte Generation eines PAMAM-Dendrimers (mit nur 4 Endgruppen) nimmt einen größeren Raum ein als die fünfte Generation eines POPAM-Dendrimers (mit 64 peripheren Gruppen). Dementsprechend zeigt die erste Generation des PAMAM-Dendrimers mehr als die vierfache Molekülmasse der ersten Generation eines POPAM-Dendrimers ^[4].

Erst in jüngerer Zeit wurden funktionalisierte PAMAM-analoge Dendrone bis zur vierten Generation vorgestellt und für eine konvergente symmetrische Dendrimer-Synthese verwendet ^[50]. Die Synthese der PAMAM-Dendrone erfolgte divergent ausgehend von Propargylamin, welches den fokalen Kern darstellt. Die ethinyl-funktionalisierten Teilstrukturen konnten mit einem Azid-Kern durch *Huisgen*'s 1,3-dipolare Cycloaddition („Click“-Reaktion) gekoppelt werden. Auf ähnliche Weise gelang auch die Einbindung

verschiedener Kern-Elemente in die PAMAM-Dendrimere ^[50, 52]. Als gegensätzliche click-Funktion wurde ebenfalls von der gleichen Gruppe um *Lee et al.* ein Azido-PAMAM-Dendron (G1 bis G3) vorgestellt, welches ebenfalls mit einem Ethinyl-Kern oder auch einem Ethinyl-Dendron „geklickt“ werden konnte um symmetrische und unsymmetrische methylester-terminierte Dendrone aufzubauen ^[45, 46].

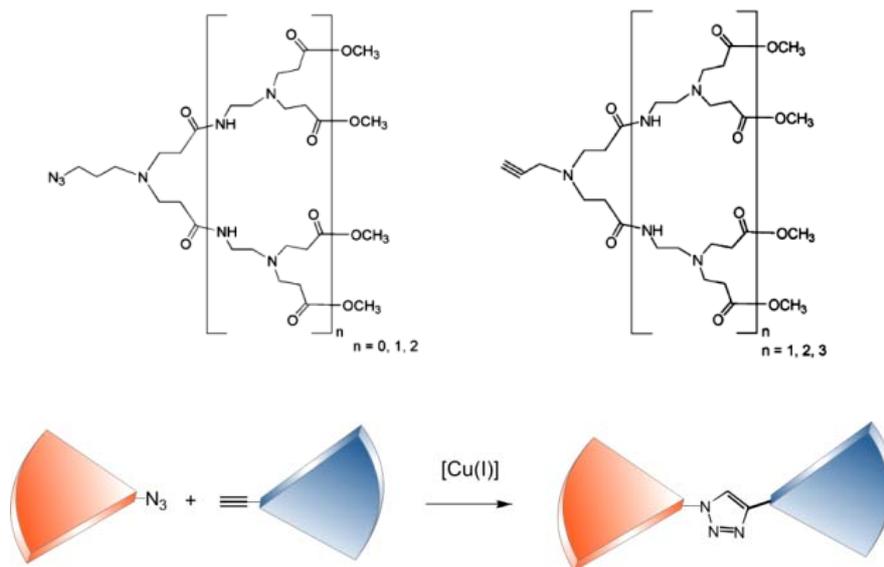


Abb. 13: Azido-(G1-3)-PAMAM-, Ethinyl-(G1-4)-PAMAM-Dendron und die Kopplung beider (*Lee et al.*)

Dendrone sind neben dem Aufbau großer Dendrimer-Moleküle auch wegen ihrer bifunktionellen Eigenschaften von großer Bedeutung. Die Strategie, den fokalen Punkt chemisch orthogonal zu den Endgruppen des Dendrons zu gestalten lässt die Anknüpfung einer Vielzahl von Strukturen zu. So entsteht dadurch ein architektonisch völlig unsymmetrisches Konstrukt, wobei man das Kopplungsmolekül gemeinsam mit dem angehängten Dendron als „dendronisiert“ bezeichnet (s. Abb. 14).

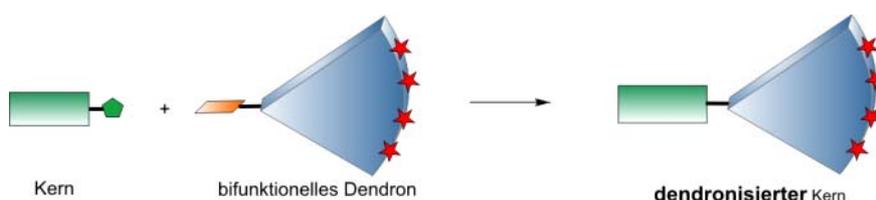


Abb. 14: Schematische Dendronisierung eines monofunktionalen Kerns

1.1.5 Dendrimer-Wirkstoff-Konjugate mit medizinischer Applikation

Wegbereiter des Feldes der polymeren Wirkstoff-Formulierung war Helmut Ringsdorf mit dem nach ihm benannten Modell der Anbindung von Pharmazeutika an makromolekulare Strukturen ^[53] (s. Abb. 15).

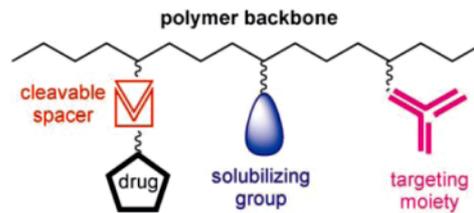


Abb. 15: Ringsdorf-Modell für polymere Therapeutika ^[54]

Dendrimere besitzen aufgrund ihrer hoch definierten Struktur und ihrer Reinheit für *in vivo*-Anwendungen besonders gute Eigenschaften und eignen sich daher für verschiedene Applikationen in den Bereichen des Imaging (Bildgebung), Wirkstoff-Transports, der Strahlentherapie und dem Tissue-Engineering (Gewebe-Konstruktion). Sie fungieren in diesen Bereichen immer als Trägergerüst für Chromophore, Wirkstoffe, Target-Liganden oder anderen funktionellen Moleküleinheiten (s. Abb. 17). Daher kann das Dendrimer-Gerüst in seiner Struktur für die einzelnen Anwendungsbereiche verändert, angepasst und optimiert werden. Entscheidende Aspekte für *in vivo*-Anwendungen sind immer Bioverteilung („*biodistribution*“, Beschreibung der relativen lokalen Konzentrationen des Wirkstoff-Konjugates in den Organen), Pharmakokinetik und intrinsische Toxizität des Konjugats ^[49]. Diese besagten Eigenschaften lassen sich fast ausschließlich durch den chemischen Aufbau des Dendrimers beeinflussen.

Pharmakokinetik und Bioverteilung (PAMAM)

Das Verständnis dieser Eigenschaft ist für die medizinische Anwendung essentiell, weil die Bioverfügbarkeit, Toxizität und letztlich Effizienz des Dendrimer-Wirkstoffkonjugats abhängig von den Raten der Gewebe-Akkumulation, der Wirkstofffreisetzung und der Eliminierung aus dem Körper sind ^[55]. Durch Größe des Dendrimers und Art der Endgruppen kann die Zirkulationszeit eingestellt werden.

Ungeladene oder negativ geladene Endgruppen verhelfen zu langen Aufenthaltszeiten im Blutstrom (da nicht-spezifische Interaktion mit dem hepatischen Gewebe unterdrückt wird) ^[55, 56, 57, 58], wohingegen positive Ladungen die Akkumulation in Leber, Nieren, Milz und

Pankreas hervorrufen, was mit amino-terminierten PAMAM-Dendrimern beobachtet wird^[59], da diese sich elektrostatisch an die Endothel- und Epithel-Zellen anlagern. So zeigen polykationische PAMAM-Dendrimere bei intravenöser oder intraperitonealer Verabreichung eine schnelle Eliminierung aus dem Blutstrom und die erwartete Anreicherung in Leber, Niere, Milz und Pankreas^[60, 61, 62]. Dagegen hat hydrophil PEGyliertes oder acetyl-modifiziertes PAMAM (jeweils ungeladen) eine lange Zirkulationszeit und keine Akkumulation in der Leber, was durch die gute sterische Abschirmung und Ladungsunterdrückung erklärbar ist^[56, 57, 60]. Die negativ-geladene Variante des PAMAM mit Carboxyl-Gruppen zeigt zwar lange Aufenthaltszeiten im Blut, jedoch weitgehende Anreicherung in der Leber^[56, 62].

Eine längere Zirkulationszeit kann auch durch hohe Molekulargewichte hervorgerufen werden, wenn sich der hydrodynamische Radius auf mehr als 4 nm vergrößert (Porengröße der filtrierenden glomerulären Basalmembran in den Nieren). Vergleicht man die dendritischen mit den linearen Architekturen gleicher Molmasse, zeigt sich immer eine längere Aufenthaltsdauer des Dendrimers im Blutstrom, was durch die sterisch anspruchsvollere Geometrie erklärt werden kann (s. Abb. 16)^[49, 63]. Der Vorteil längerer Zirkulationszeiten liegt in der verbesserten relativen Akkumulation des Konjugates in Tumorzellen, was bei *passivem* Targeting (keine durch Liganden zielgerichtete Adressierung an spezielle Zellen) nötig ist.

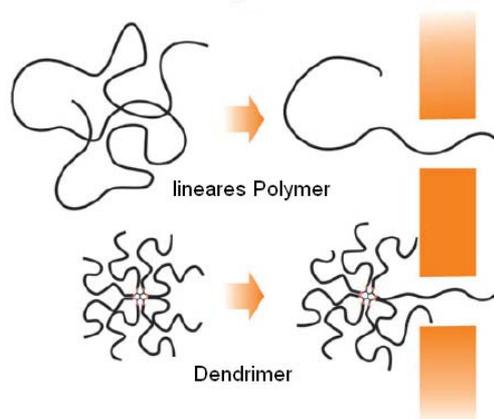


Abb. 16: Vergleich Dendrimer vs. lineares Polymer bei der auswaschenden Filtration in der Niere

Biokompatibilität und intrinsische Toxizität

Entscheidend für den Erfolg eines Dendrimer-Trägers ist seine Biokompatibilität und intrinsische Toxizität. Damit sind die Eigenschaften des reinen Dendrimer-Gerüsts mit den metabolischen Abbauprodukten, aber zunächst ohne den Wirkstoff oder das angehängte Reagenz gemeint. Sehr kleine Generationen der Dendrimere können (falls keine

intrinsische Toxizität vorliegt) leicht über die Nieren und den Urin ausgespült werden ^[58]. Wohingegen makromolekulare, höhere Generationen nicht durch den renalen (Nieren-) Filter passen und durch lange Zirkulationszeiten metabolisch abgebaut werden müssen. Hierzu ist bei der Wahl des Dendrimers besonders auf nicht-toxische Elemente zu achten, welche nach ausreichender Zirkulationszeit in kleinere Moleküle gespalten werden. Die PAMAM-Dendrimere eignen sich wegen ihrer Polyamid-Struktur für die enzymatische Hydrolyse und sind daher zunächst als biokompatibel einzustufen. Ebenso sind sich Poly(aminosäure)- und Polyester-Dendrimere in dieser Hinsicht einsetzbar ^[64, 65].

Die intrinsische Toxizität der polkationischen PAMAM-Strukturen ist allerdings für die Generationen G1-G5 als signifikant hoch einzustufen. *Duncan et al.* fanden bei drei verschiedenen Krebs-Zelllinien für eine Verweildauer von 72 Stunden zytotoxische IC₅₀-Werte von 50-300 µg/mL ^[66]. Für murine B16F10 Krebszellen fand man sogar schon nach 5 Stunden Inkubationszeit klare Schäden an den Zellwänden bei einer Konzentration von 5 µg/mL eines G4,0-PAMAM-Dendrimers. Der Zelltod durch Dendrimere wird durch Apoptose und/oder Necrose eingeleitet, wobei unterschiedliches Verhalten bei den einzelnen Dendrimern vorliegt ^[67, 68].

Wie im Abschnitt der Pharmakokinetik besprochen, hängt die *in vitro*-Toxizität mit dem Akkumulationsverhalten (besonders der kationischen Strukturen) zusammen und scheint deutlich mit der Zahl der Generation, der Konzentration und der Inkubationszeit zu korrelieren ^[69].

Erfolgreiche PAMAM-Wirkstoff-Konjugate

Durch Modifizierung der Endgruppen mit PEG-Ketten, Acetylgruppen oder mit Target-Liganden konnten die PAMAM-Dendrimere in Form verschiedenster Wirkstoff-Konjugate im Vergleich zum freien Wirkstoff oder dem linear-polymeren Konjugat (rein PEGylierter Wirkstoff) überdurchschnittlich gute Ergebnisse in *in vivo*-Studien erzielen ^[56, 57, 70, 71, 72].

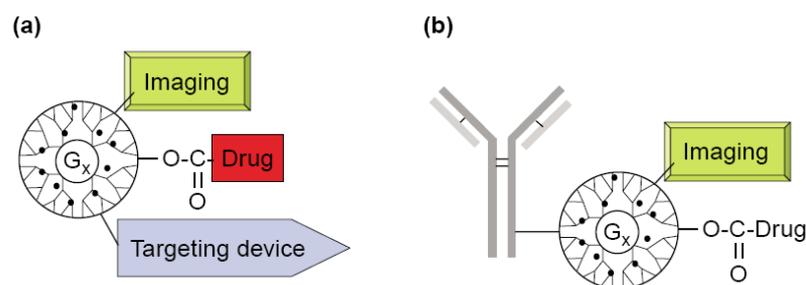


Abb. 17: Schema eines fortgeschrittenen Dendrimer-Konjugates mit kovalent-gebundenem Wirkstoff, Imaging-Gruppe (Chromophor oder Radiolabel) und a) Target-Funktion (z. B. Folsäure, RGD-Peptid) oder b) Antikörper

Warum Dendrimere und Dendrone?

Im Vergleich zu linearen Polymer-Konjugaten zeigen Dendrimere signifikant verbesserte Eigenschaften in Hinblick auf Akkumulation in krankem Gewebe (Tumorgewebe, entzündetes Gewebe), pharmazeutische Wirkstoff-Formulierung und Zirkulationszeit. In Folgendem sind die Vorteile dendritischer Strukturen für biomedizinische Anwendungen aufgezählt ^[49]:

- Hohe strukturelle und chemische Homogenität der Dendrimere erlaubt reproduzierbare Ergebnisse und lässt systematische *in vivo*-Studien zu, wohingegen lineare Polymer-Rückgrate meistens polydispers vorliegen und nur statistisch vergleichbare Untersuchungen zulassen.
- Bioverteilung und pharmakokinetische Eigenschaften, welche gezielt durch die Konformation und Größe der Dendrimere optimiert werden können. Dies erreicht man präzise durch das Variieren der Generationszahl oder durch Anbindung wasserlöslicher linearer Polymere (Dendrimer-Polymer-Hybride).
- Multifunktionalität der Dendrimere erlaubt die gleichzeitige Anbindung mehrerer Wirkstoffe, Chromophore oder Liganden. Und besonders Dendrone können durch Anbindung an Peptide, Proteine oder hochselektive Antikörper^[73] genutzt werden, um präzise die Funktionalität (Wirkstoff-Ladungskapazität) zu erhöhen. Dies gilt ebenso für Dendron-Poly(ethylenglycol)-Hybride (s. Abb. 18) ^[74, 75, 76].
- Hohe Liganden-Dichte an der Dendrimer-Oberfläche verbessert die multivalente Wechselwirkung von Ligand-Rezeptor-Bindungen. Anders als bei linearen Polymeren erhöht sich die Oberflächenfunktionalitäts-Dichte mit jeder Generation (annähernd) exponentiell. Dadurch ist die Targeting-Funktion der Dendrimere gegenüber linearen Makromolekülen deutlich verbessert.
- Kontrollierter Abbau kann durch die richtige Wahl des Dendrimer-Gerüsts gesichert werden. Hydrolysierbare Ester, enzymatisch spaltbare Amide oder selbst-zerfallende Dendrimer-Strukturen können hierbei angewendet werden ^[65].

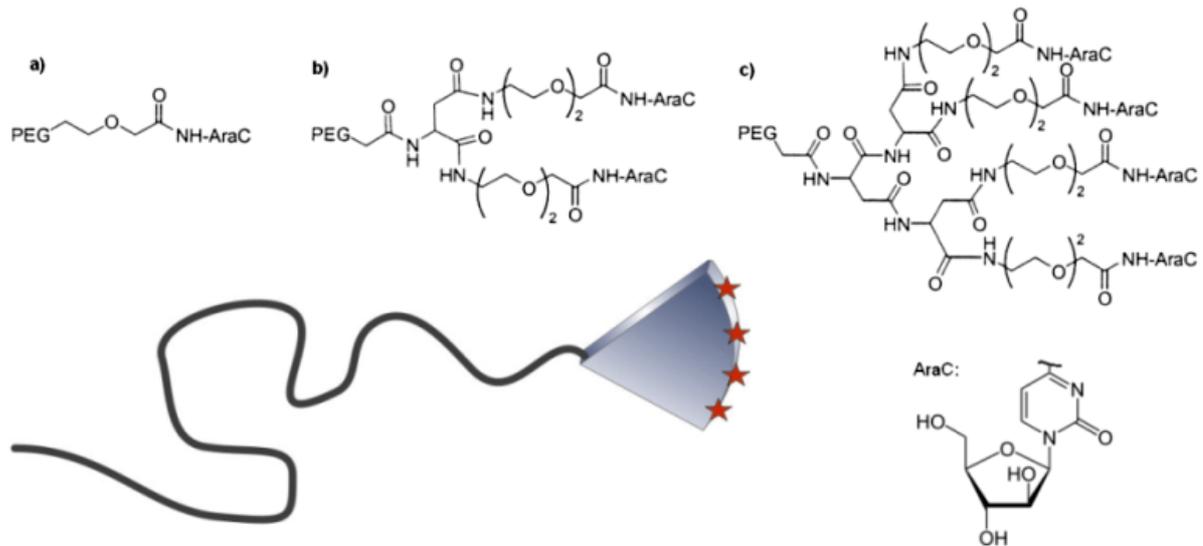


Abb. 18: Dendronisiertes PEG (40 kDa) auf Aspartat-Basis (a: G0, b: G1, c: G2) mit kovalent gebundenem Cytarabin als Zytostatikum (nach Greenwald et al.)^[75]

1.2 Biohybrid-Materialien

Die Vereinigung von synthetischen Materialien mit den hochkomplexen Bausteinen der Natur spielt in der modernen Wissenschaft eine wichtige Rolle und zeigt immer mehr anwendungsorientierte Einsatzmöglichkeiten. Vor allem in den Bereichen der biomedizinischen Chemie, Diagnostik und Nanotechnologie ist das Interesse an fortschrittlichen Materialien mit neuen Eigenschaften groß. Dadurch entstanden in den letzten Jahren unter anderem viele neue Ansätze für die Krebstherapie mit synthetisierten Polymer-Biohybriden. Es folgten klinische Studien, die die bisherigen reinen Wirkstoffe in den erzielten Ergebnissen übertreffen ^[54, 77, 78].

Unter der Hybridisierung von biologischen Stoffen versteht man das Zusammenbringen biologisch aktiver Komponenten mit rein synthetisch zugänglichen Materialien. Dies kann auf verschiedene Arten von Wechselwirkungen basieren, welche unter anderem kovalente Bindungen, supramolekulare oder biochemische Affinitäten einschließen. Weiterhin kann die Funktionalisierung einer biologischen Komponente *spezifisch* an bestimmten reaktiven Gruppen in definierter Anzahl oder *unspezifisch* (ebenso in Bezug auf Reaktivität und Quantität) erfolgen. Die spezifische und kovalente Anknüpfung eines synthetisierten Materials ist in Hinblick auf biologische Aktivität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

im Allgemeinen wünschenswert und stellt Wissenschaftler durch diesen Anspruch vor eine große Herausforderung^[79].

Auf der Seite der bioaktiven Strukturen ist eine Vielzahl von Klassen vertreten, welche niedermolekulare aktive Naturstoffe, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate und Proteine sein können, wobei sich in dieser Arbeit nur auf Proteine und Peptide mit *spezifischer kovalenter* Funktionalisierung bezogen wird.

Auf der Seite der synthetischen Materialien hat sich die Modifikation mit einer Reihe verschiedener künstlicher Polymere etabliert^[77, 80]. Erfolge konnten insbesondere in der Verbesserung der Biokompatibilität, Stabilität und (Wasser-)Löslichkeit erzielt werden^[81]. Die ersten Protein-Polymer-Konjugate wurden von *Davis et al.*^[82] durch die kovalente Anbindung von Poly(ethylenglykol) („*PEG*“) an die zugänglichen primären Amine (der Lysine) einer Proteinoberfläche dargestellt. Seither befinden sich bereits verschiedene „*PEGylierte*“ Proteine im klinischen und therapeutischen Gebrauch^[77, 78, 83, 84]. Bei neueren Hybridisierungen konnten die Vorteile der Verknüpfung von biologisch aktiven Materialien mit dendritischen Makromolekülen dargestellt werden (s. Kap. 1.1.5), welche im Vergleich zu den linearen Polymeren wiederum verbesserte Eigenschaften aufweisen^[49].

1.2.1 Dendrimer vs. Protein

Das Forschungsgebiet der Polymerchemie erlaubt einen Zugang zu verschiedensten makromolekularen Architekturen. Es können lineare, verzweigte, hypervverzweigte, dendritische, sternförmige, kammartige oder vernetzte Polymere hergestellt werden, welche sich bereits aufgrund ihrer Gestalt in den Eigenschaften grundlegend unterscheiden.

In einer einzigartigen Perfektion gelingt es der Natur, hochkomplexe Polymer-Strukturen durch den enzymatischen Apparat der Ribosomen in Form von Proteinen aufzubauen. Hierbei handelt es sich um definierte lineare Polypeptide, welche je nach Protein aus einer genau festgelegten Aminosäuresequenz aufgebaut sind. Durch intramolekulare Wechselwirkungen bilden die stets monodispersen Proteine definierte räumliche Strukturen aus, welche entscheidend für ihre physiologische Funktion sind. Bis heute lässt sich bislang die Kombination aus monodispersen makromolekularem Aufbau, hohe strukturelle Perfektion und spezifische funktionale Aktivität von Proteinen nicht präparativ chemisch verwirklichen.

Durch die aufkommende Dendrimer-Chemie in den 90er Jahren konnten die ersten Makromoleküle mit formstabiler Struktur in Form von Dendrimeren hergestellt werden. Proteinähnliche Dendrimer-Gerüste, welche ebenfalls Amidbindungen enthalten, wurden als „biomimetisch“ interpretiert und sollten proteinanalogue synthetische Materialien darstellen ^[27]. Sie zeichnen sich ebenso wie Proteine durch ihre hohe Strukturperfektion, Bioabbaubarkeit und monomolekulare Nanostruktur aus. Durch Anbindung chemisch-funktioneller Gruppen können Dendrimere ebenfalls bestimmte Funktionen erfüllen und ahmen somit ihre hochkomplizierten, natürlichen Gegenspieler modellhaft nach.

Die Oberfläche der Dendrimere unterscheidet sich allerdings von denen der Proteine: Durch den präzisen chemischen Aufbau tragen dendritische Makromoleküle meist gleichartige funktionelle Gruppen in der Peripherie und haben daher eine globular-homogene Struktur. Proteine sind dagegen mit vielen verschiedenen Gruppen wie Aminen, Thiolen, Disulfiden, Hydroxylgruppen, Carboxylaten und Aromaten ausgestattet, welche auch im Inneren der gefalteten Struktur unzugänglich sein können.

Chemisch gesehen lassen sich Dendrimere auf einfachem Wege in ihrer homogenen Peripherie verändern und mit funktionellen Gruppen ausstatten. Sie sind daher als Nano-Träger hervorragend geeignet und zeigen in Hinblick auf chemische Modifikation klare Vorteile gegenüber dem komplizierten chemischen Aufbau der Protein-Peripherie.

1.2.2 Eine hochspezifische Peptid-Modifikation: die Disulfid-Interkalation

Die chemische Modifikation eines Peptids oder Proteins findet an den funktionellen Gruppen der Oberfläche statt und setzt voraus, dass keine sterische Abschirmung durch Proteinfaltung vorliegt. Dadurch kann nicht jede beliebige Aminosäure des Peptid-Rückgrates fuer chemische Reaktionen herangezogen werden. Eine Funktionalisierung durch kovalente Anknüpfung kann nur an den reaktiven Seitenketten bestimmter Aminosäuren stattfinden, wohingegen eine bio-affine Modifizierung ganze Strukturdomänen benötigt (vgl. Biotin-Avidin-Affinität). Ebenso ist zu beachten, dass das anzuknüpfende Polymer Wasserlöslichkeit aufweisen muss, da im organischen Medium eine Denaturierung der Proteine und somit der Funktionsverlust auftritt.

Erste Modifikationen mit einfachen Polymeren wie Poly(ethylenglykol) wurden an den primären Aminen der Lysin-Seitenketten durchgeführt. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von z. B. Hydroxylgruppen reagiert dann das Amin selektiv mit den gewählten Reagenzien. Neuere Strategien bedienen sich weniger häufig vorkommender Aminosäuren

bzw. des N-Terminus, um Selektivität und damit definierte Konjugate erhalten zu können [85]. Für Modifikationen bevorzugte Aminosäuren sind Lysin, Cystein, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Phenylalanin, Tryptophan, Glutamin, Asparagin, C- und N-Terminus. Die sich von Protein zu Protein unterscheidende Verfügbarkeit der Oberflächenfunktionalitäten stellt bei der Modifikation eines jeden Proteins eine wiederkehrende Herausforderung dar. Um definierte Strukturen aus synthetischen Materialien und Proteinen aufbauen zu können, ist eine ortsspezifische und reproduzierbare Modifikation Voraussetzung.

Eine hochspezifische Variante der Protein-Kupplung nutzt die Zugänglichkeit von Disulfid-Brücken in der Tertiärstruktur von Proteinen und Peptiden [86, 87, 88]. Hierbei wird in einem ersten Schritt das Disulfid reaktiv geöffnet und man erhält zwei nukleophile Sulfide in räumlicher Nähe (**2** in Abb. 19). Der spezifische Linker **1** („Interkalator“) wird durch eine Michael-Addition zunächst an eines der beiden Sulfide gebunden und eliminiert automatisch eine aromatische Sulfinsäure, wodurch ein neues Michael-System für die nächste Addition entsteht. Der Angriff des zweiten Sulfids schließt die Brücke und sorgt für eine Strukturserhaltung des Proteins, da sich lediglich eine Propylen-Gruppe in die Disulfid-Brücke eingeschoben hat. Die physiologische Funktion des Proteins ist nicht beeinträchtigt, da die Tertiärstruktur nicht aufgefaltet wird.

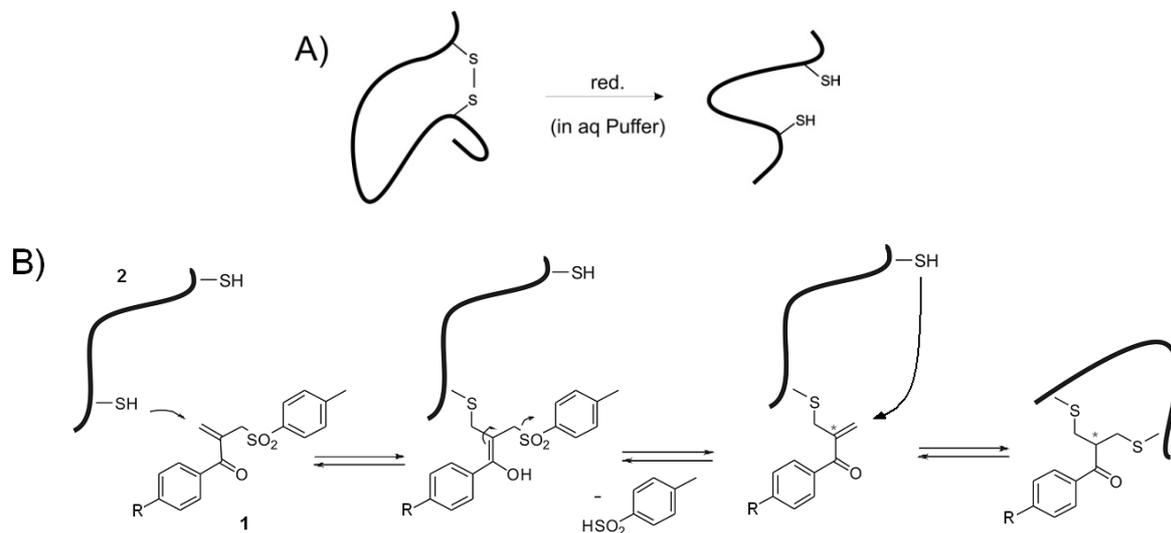


Abb. 19: A) Reduktion der Disulfidbrücke und B) Mechanismus der Interkalation in die Disulfidbrücke

Bei Anwesenheit mehrerer reaktiver Aminosäure-Seitenketten im Protein, stellt die Disulfid-Interkalation ein ausgesprochen spezifisches Werkzeug zur Modifikation dar. Die Variation des Restes R im Interkalator **1** (s. Abb. 19) lässt die Hybridisierung mit

verschiedenen synthetischen Materialien zu. Es können dabei zwei grundlegende Ansätze unterschieden werden (s. Abb. 20):

- „**Grafting-from**“ nennt man das Anknüpfen einer funktionellen Gruppe an den Interkalator **1** (z. B. in R-Position). Sie muss bio-orthogonale Reaktivität besitzen und kann zusammen mit dem Linker an das Protein verbrückend eingeführt werden. Nach Aufreinigung des reaktiven Proteins kann erst in einem zweiten Schritt die Hybridisierung erfolgen. Die Nachteile dieser Methode umfassen zwei aufwendige Reinigungsschritte am Biomaterial und das eventuelle Vorhandensein toxischer Nebenprodukte oder Katalysatoren im letzten Reaktionsschritt, was die Isolierung des Endproduktes besonders erschwert. Gerade die Abtrennung der ersten Reaktionsstufe ist kompliziert, da sich das Interkalations-Produkt kaum vom nativen Protein unterscheidet.
- Das „**Grafting onto**“ ist die verbreitete Variante und setzt den vollständigen Aufbau der synthetischen Komponente vor der Bio-Kupplung voraus. Erst im letzten Schritt wird die Hybridisierung vorgenommen und das Biokonjugat muss nur einmal aufgereinigt werden. *Brocchini* ^[87] und *Baker* ^[89, 90] zeigen mit verschiedenen Verbrückungsreagenzien die vollständige PEGylierung einfacher Peptide auf diesem Weg.

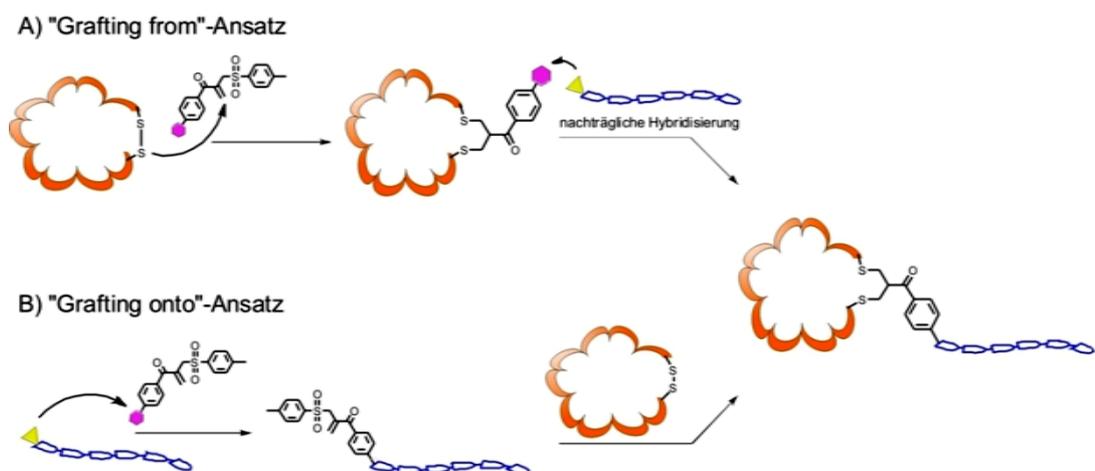


Abb. 20: Verschiedene Hybridisierungs-Strategien

1.2.3 Dendronisierte Proteine und Peptide

Die Wirkstoff-Hybridisierung mit Dendronen und die zusätzliche Anknüpfung von adressierenden Liganden (*targeting ligands*) liefert vielversprechende Kandidaten für moderne Therapieansätze^[31] und Diagnoseverfahren^[91].

Abb. 21: Vereinigung von Dendrimer und Protein: Dendronisiertes Protein

Die Dendronisierung biologischer Verbindungen (speziell an Proteinen) ist bisher nur selten gelungen und wird in wenigen Beispielen wie durch *Kochendörfer*^[92] und *Kostiainen*^[93, 94] an komplexen Proteinen mit verschiedenen Synthese-Strategien gezeigt. Es wurde ebenso in Modell-Studien mit PEGylierten Proteinen dargestellt, dass verzweigte PEG-Protein-Konjugate im Vergleich zu den linearen Analoga bessere Stabilität und langsamere Metabolisierung aufweisen, was die pharmakokinetischen Eigenschaften für den effizienten biomedizinischen Einsatz optimiert^[95, 96]. Dendrone steigern sogar den sterischen Effekt des verzweigten PEG-Polymers und können dadurch die Stabilität des Konjugats weiter erhöhen; sie wirken raumfüllend und besitzen im Gegensatz zum knäulbaren PEG weitgehende Formstabilität und hohe Monodispersität. Des Weiteren kann einerseits das Dendron-Gerüst für verbesserte Zellaufnahme und Membran-Permeabilität sorgen und andererseits können an Dendrone zusätzliche Funktionen angebunden werden, wodurch sich das Protein-Dendron-Konjugat zu einem vielseitigen, multifunktionellen Nano-System entwickelt. Die flexible Variation der Dendron-Generationen erlaubt die Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen Größe des angehängten Dendrons, was grundlegende Studien zur Optimierung der Zirkulationszeit eines Proteins oder Peptids ermöglicht.

Die Gruppe um *Kochendörfer* nutzte eine konvergente Proteinsynthese, bei der das Protein in vier Teilen gesondert in seiner Aminosäuresequenz synthetisiert wird ^[92]. Es werden in die (an der Festphase synthetisierten) Peptidsequenzen unnatürliche Aminosäuren eingebaut, welche ein Keton in der Seitenkette tragen (Lävulinsäure an Lysin amidiert). Durch chemo-selektive Oximierung einer Aminoxy-Gruppe mit dem Keton konnten die einzelnen Peptid-Sequenzen dendronisiert werden (s. Abb. 22). Zusammenfügen der einzelnen Sequenzen ergab ein monodisperses dendronisiertes Erythropoetin („Epo“-Protein), welches in *in vivo*-Studien verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften im Vergleich zum unmodifizierten Protein zeigt und seine Aktivität beibehält.

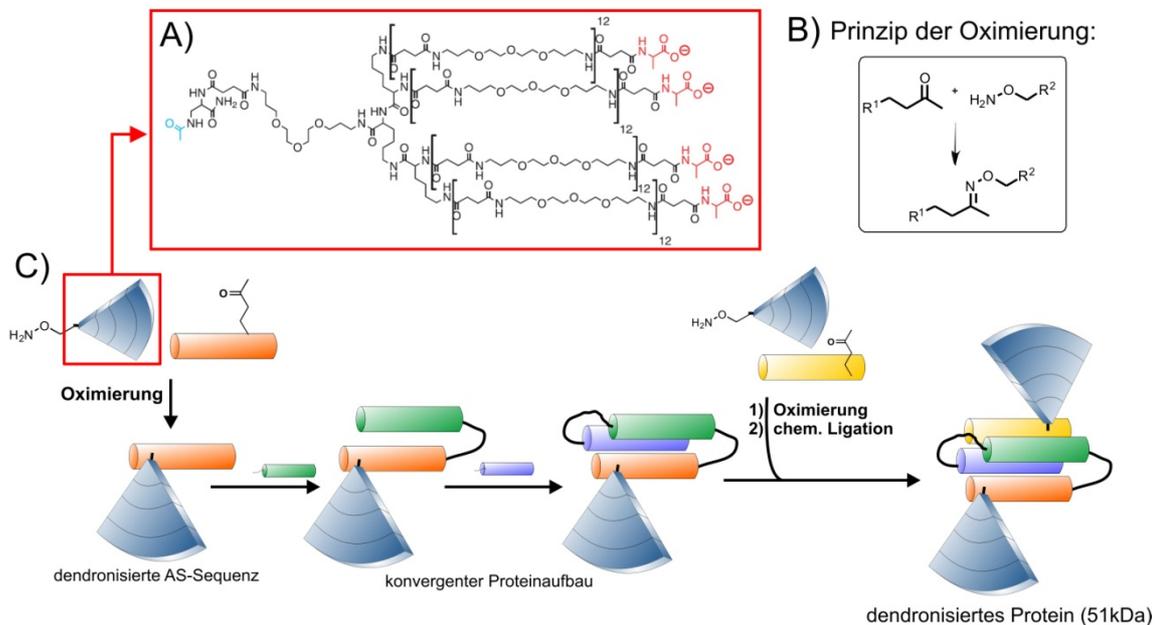


Abb. 22: A) Struktur des Aminoxy-Dendrons, B) Oximierung als Kupplung, C) Syntheschema des konvergent-hergestellten dendronisierten Proteins

Eine posttranslationale Dendronisierung von BSA wird durch die Gruppe von *Kostiainen et al.* vorgestellt. Es wird dabei ausgenutzt, dass bestimmte Proteine (wie BSA oder Hydrophobin) nur eine chemisch-zugängliche Cystein-Seitenkette tragen wodurch hohe Selektivität erreicht werden kann. Das verwendete Dendron wird mit einem Maleimid-Linker durch Michael-Addition an die Cystein-Seitenkette gehängt (s. Abb. 23 A) ^[93, 94].

Weitgehend unterschiedlich ist die bio-affine Bindung der hyperverzweigten Poly(glycerol)-Dendrone von *Frey et al.* ^[97]. Die Kopplung der Dendrone an das Avidin-Protein beruht dabei auf der hohen Affinität zu Biotin, welches an das Dendron in einem „grafting onto“-Ansatz gebunden ist. Es wurde zunächst ein aktiviertes Biotin-Derivat an

das Dendron gebunden und dann vierfach an Avidin konjugiert um das dendronisierte Tetramer zu erhalten (s. Abb. 23 B).

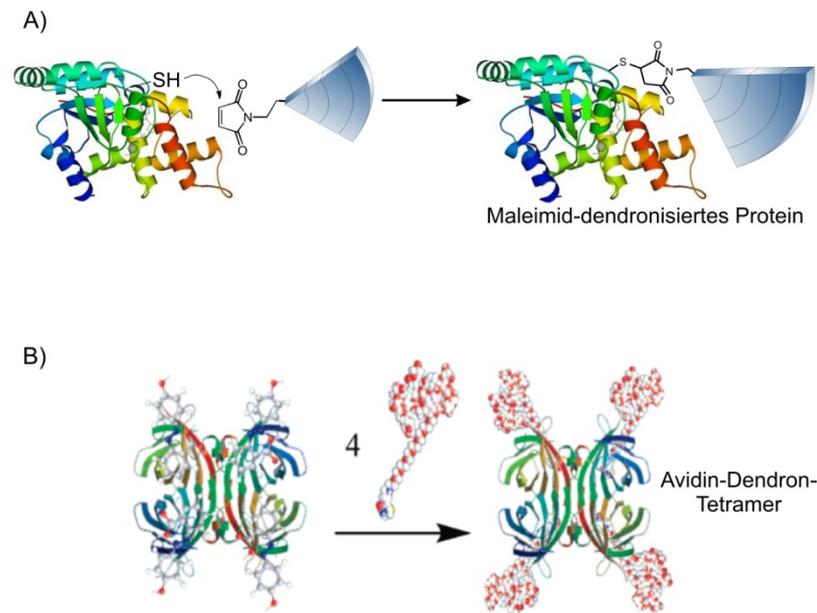


Abb. 23: A) Posttranslationale Dendronisierung durch Maleimid-Michael-Addition, B) 4-fache Dendronisierung mit hyperverzweigtem Poly(glycerol) durch Avidin-Biotin-Affinität (Frey et al.)

1.2.4 Ein universelles Peptid: Somatostatin und seine Funktionen

In der vorliegenden Arbeit soll das Peptidhormon Somatostatin dendronisiert werden. Somatostatine bilden eine Gruppe von cyclischen Peptiden die besonders starke Inhibitionseffekte für die Ausschüttung von Hormonen, wie zum Beispiel Wachstumshormone, Insulin und Glucagon zeigen ^[98]. Sie werden im Hypothalamus gebildet und sind die natürlichen Gegenspieler des Wachstumshormons, dessen Produktion und Ausschüttung gehemmt wird. Außerdem wirkt Somatostatin der Produktion und Freisetzung von Hormonen und Sekreten in zahlreichen Drüsengeweben des Körpers entgegen, insbesondere im Pankreas des Gastrointestinaltraktes. Beeinflusst werden unter anderem die Hormone Insulin und Glukagon, Gastrin, Cholezystokinin, Sekretin und vasoaktives intestinales Peptid (VIP) sowie die Freisetzung der Magensäure. Diese Inhibitionseffekte erlauben den Einsatz von Somatostatin-Analoga zur klinischen Behandlung von Akromegalie und endokrinen Tumoren wie dem Pankreastumor, einen der am schwersten behandelbaren Tumore. Die Entdeckung der fünf Somatostatin-Rezeptoren in den 90-er Jahren erbrachte ein detaillierteres Verständnis über die biologische Wirkungsweise und die Rezeptorbindung des Somatostatins ^[99]. Seither ist eine Vielzahl

von Synthesen mehrerer Analoga des Somatostatins bekannt, welche verbesserte Eigenschaften gegenüber dem nativen Peptid zeigen und den klinischen Einsatz erstmals erlauben ^[100].

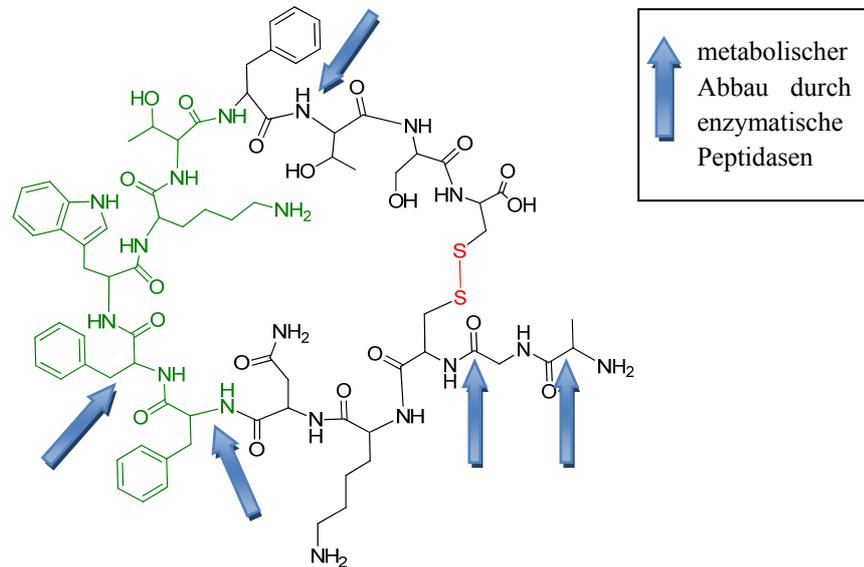


Abb. 24: natives Somatostatin-14 (Pharmakophor in grün) mit markierten metabolischen Abbaustellen

Das cyclische Peptid Somatostatin-14 ist aus 14 Aminosäuren aufgebaut, wobei der Ringschluss durch eine Disulfidbrücke an zwei Cystein-Seitenketten stattfindet (s. Abb. 24). Die β -Schleife des Somatostatins mit der Aminosäure-Sequenz Phe⁷-Trp⁸-Lys⁹-Thr¹⁰ (grün gezeigt) ist für die pharmakologische Aktivität verantwortlich (Pharmakophor) und kann nur in der vorliegenden cyclischen Form an Rezeptoren binden ^[101]. Allerdings konnte das native Somatostatin mit einer Plasma-Halbwertszeit von zwei bis drei Minuten nicht für therapeutische Zwecke eingesetzt werden. Untersuchungen zum Metabolismus des cyclischen Peptids zeigten, dass der enzymatische Abbau gezielt an bestimmten Aminosäure-Sequenzen stattfindet ^[102]. Dies führte zur Entwicklung neuer Analoga des Somatostatins und es entstand das erste zugelassene Arzneimittel *Octreotid*[®] mit verbesserten pharmakinetischen Eigenschaften für den klinischen Einsatz ^[103]. In Deutschland ist *Octreotid*[®] zur Behandlung der Akromegalie und bestimmter Magen-Darm-Tumoren zugelassen.

2. Motivation und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung neuartiger, makromolekularer Biohybridarchitekturen, welche aus einer biologisch aktiven Struktureinheit und einer dendritischen Einheit bestehen, die die Eigenschaften des nativen biologischen Stoffs ergänzt bzw. verbessert. Hierzu sollen insbesondere medizinisch relevante Moleküle wie Peptide mit einem synthetischen Dendrimer in ihren Funktionen vereint werden, um Hybrid-Therapeutika mit einem neuem Eigenschaftsprofil zu erhalten.

Es müssen mindestens drei maßgeschneiderte Bausteine gewählt werden, um ein solches Biohybrid-Makromolekül aufzubauen (s. Abb. 25):

- Biologisch aktive Komponente (therapeutisches Peptid)
- Synthetische Komponente (Dendrimer/Dendron)
- Linker für die selektive Kupplung von Bio-Komponente und Dendron

In Abb. 25 ist die retrosynthetische Analyse des dendronisierten Somatostatins gezeigt. Die Darstellung kann prinzipiell über zwei Wege erfolgen, wobei sich Weg 1 vom Peptid her aufbaut und Weg 2 ein reaktives Dendron als Schlüsselkomponente umfasst. Die einzelnen Bausteine können flexibel an den gewünschten Stellen der Strategie eingebracht werden.

Will man zunächst das funktionalisierte Somatostatin bereitstellen und in einem zweiten Schritt an das Dendron anknüpfen (Weg 1), sind insgesamt zwei kritische Reaktionsschritte am Peptid notwendig. Dies ist einerseits aufwändig wegen der komplizierten Aufarbeitung und andererseits nachteilig für die toxikologische Reinheit des Endproduktes, da durch den Einsatz der Azido-Alkin-Click-Chemie toxische Kupferionen benötigt werden. Diese sollten im letzten Reaktionsschritt für den Erhalt des fertigen Therapeutikums vermieden werden.

Der alternative Weg 2 beginnt zunächst mit der Bereitstellung des Dendrons mit einer reaktiven Gruppe im Kern. Der Disulfid-Interkalator (Peptid-Linker), welcher chemisch-orthogonal mit einer Ethinyl-Funktion versehen ist, kann durch 1,3-dipolare Huisgen-Cycloaddition an das Dendron geknüpft werden. Diese Reaktion ist ebenfalls kupferhaltig, kann aber noch vor der Peptid-Interkalation von toxischen Metallionen befreit werden. Bis

hierhin ist die die Reaktionsführung in organischen Lösungsmitteln möglich und muss nicht unter Berücksichtigung des pH-Wertes für das Peptid in physiologischer Salzlösung durchgeführt werden. Dies erleichtert den praktischen Umgang und die Synthese zum dendritischen Interkalator. In einem letzten Schritt kann dieser dann bei gepufferten Bedingungen, ohne die Anwesenheit kritischer Ionen, in die Disulfidbrücke des Somatostatins interkaliert werden.

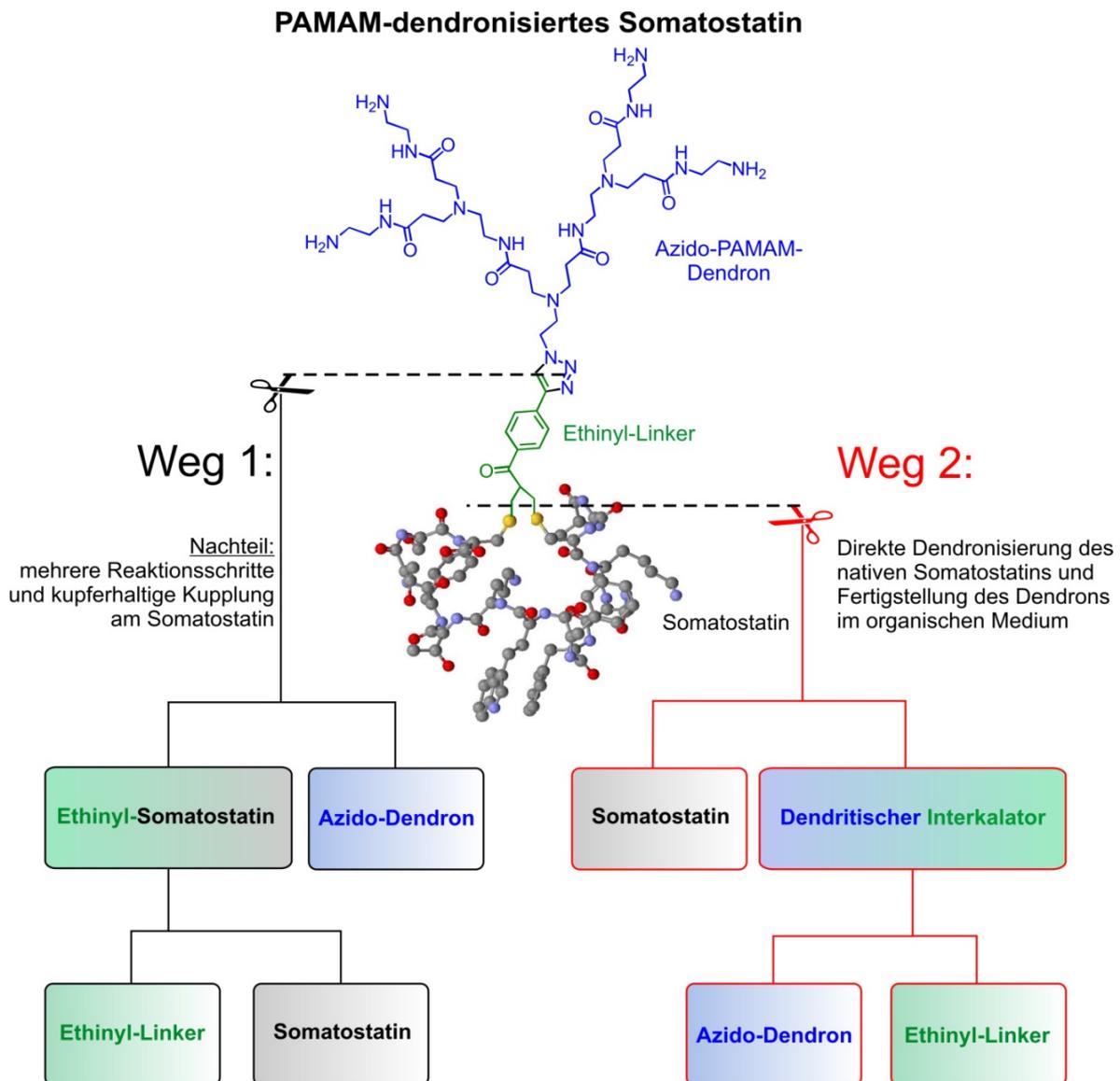


Abb. 25: Schematische Retrosynthese des dendronisierten Somatostatins und dessen Bausteine

Somatostatin als bioaktives Peptid

Für grundlegende Studien zur selektiven Protein- und Peptidfunktionalisierung durch neue dendritische Strukturen bedient sich die vorliegende Arbeit zunächst an dem zyklischen Modell-Peptid Somatostatin, um exemplarisch die Hybridisierung zu beleuchten. Aufgrund seiner zyklischen Struktur, die von 14 Aminosäuren gebildet wird, vereint das körpereigene Somatostatin strukturelle Komplexität sowie eine wichtige physiologische Funktion als Botenstoff zur Signalübermittlung. Somit stellt Somatostatin als zyklisches Neuropeptid eine gute Plattform für die Untersuchungen zur Dendron-Hybridisierung dar. Es kommt ausschließlich in Wirbeltieren vor und hat vielseitige Funktionen in der Hormonregulierung des Körpers (siehe Kap. 1.2.4). In höheren Konzentrationen ist es an der Signaltransduktion beteiligt und leitet den kontrollierten Zelltod ein (Apoptose) und hat somit auch als Krebstherapeutikum sowie in der Diagnostik Relevanz^[106, 107].

Dendrone als Bio-Konjugate

Zur Hybridisierung des Somatostatins soll zu Beginn ein neuartig funktionalisiertes Dendron basierend auf einem PAMAM-Gerüst dargestellt werden (siehe Kap. 1.1.4 und 1.1.5). Die Poly(amidoamin)-Dendrimere sind (je nach Art der Endgruppen) gut bioverträglich und zählen zu den am häufigsten eingesetzten Dendrimer-Vertretern für pharmakologische Untersuchungen. Ihre basische Polyamid-Struktur ist bioabbaubar und sorgt bei Einsatz höherer Generationen für verbesserte Akkumulation in der Bauchspeicheldrüse^[60, 61, 62], dem Wirkungsort des Somatostatin-Peptids. Die Wasserlöslichkeit kann durch Amino-Endgruppen gewährleistet werden, da diese im physiologischen pH-Wert überwiegend protoniert vorliegen. Ihre Oberflächen-Multifunktionalität erlaubt auch die kovalente Anknüpfung weiterer molekularer Komponenten (z. B. Zytostatika, Targeting-Moleküle oder Farbstoffe).

Wegen der kurzen Halbwertszeit des nativen Somatostatins im Blut (3 - 4 Minuten) könnte das Dendron durch sterische Effekte den metabolischen Abbau des Peptids beeinflussen und eine längere Zirkulationszeit gewähren. Das würde den größten Nachteil des nativen Somatostatins bei der klinischen Anwendung verbessern.

Disulfid-Linker

Für die Funktionalisierung von Disulfidbrücken soll ein strukturell flexibler „Interkalator“ entwickelt werden, welcher sich zwischen die beiden Schwefelatome einer Disulfidbrücke einfügen lässt und diese dann verbrückt (Mechanismus siehe Kap. 1.2.2) [86-88]. Es soll insbesondere gezeigt werden, dass die Disulfidbrücke des Somatostatins mit Hilfe eines Additions-Eliminierungs-Mechanismus ortsgerichtet adressierbar ist. Dies erlaubt eine Funktionalisierung mit gleichzeitiger Erhaltung der Schleifenstruktur im zyklischen Peptid, da die ehemalige Disulfidbrücke weiterhin durch eine Propylen-Einheit zusammengehalten wird (siehe Abb. 26). Der Strukturerthalt ist für die physiologische Funktion des Pharmakophors ausschlaggebend und kann durch Fixierung der beiden Schwefelatome in unmittelbarer Nachbarschaft sichergestellt werden.

Das in dieser Arbeit dargestellte Linkerglied soll einerseits die Reaktion mit Disulfidbrücken und andererseits weitere funktionale Gruppen aufweisen (-R in Abb. 26), welche durch orthogonale Chemie unabhängig von den Funktionen der Peptidseitenketten adressiert werden können. An dieser Stelle ist die Anbindung des Dendrons möglich.

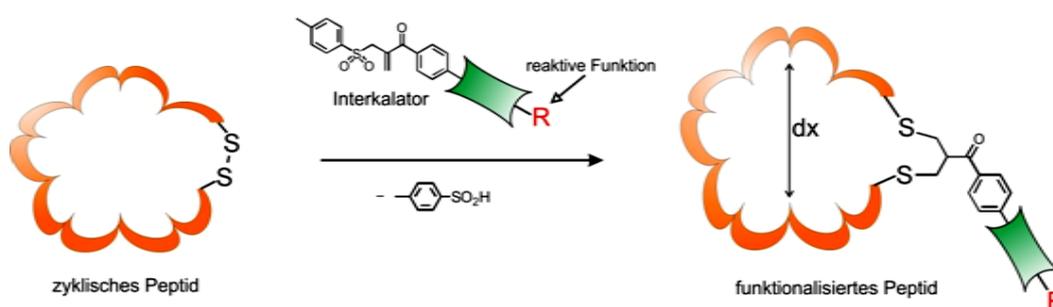


Abb. 26: Schema der Disulfid-Interkalation unter Strukturerthalt des Peptids

Der Aufbau der anvisierten Biohybride soll nach einem Baukasten-Prinzip ermöglicht werden (s. Abb. 25), wobei jede Komponente für die endgültige Kupplungsreaktion vorbereitet wird. Der Aufbau des gesamten Hybrids erfolgt dann nach einer strategischen Reihenfolge, wie in Abb. 1 dargestellt.

Da bisher die in Kap. 1.2.3 gezeigten Dendronisierungsstrategien von Proteinen und Peptiden einen entweder hohen Grad an Komplexität und Aufwand oder das Einbüßen von Monodispersität fordern, fokussieren sich die Interessen auf neue hochspezifische Methoden und die Entwicklung effizienterer Synthesewege.

Zielstrukturen

Zunächst wird das kernfunktionalisierte Azido-Dendron nach einem divergenten Ansatz gemäß dem Standard-PAMAM-Protokoll synthetisiert.

Als zweiter Baustein wird der Peptid-Interkalator an das Dendron geknüpft. Die Anbindung erfolgt über Click-Reaktion. Der Interkalator wurde in seiner Ethinyl-Variante von Anne Pfisterer (Weil, Müllen *et al.*) entwickelt ^[111, 112] und kann für die Dendronisierung nachsynthetisiert werden.

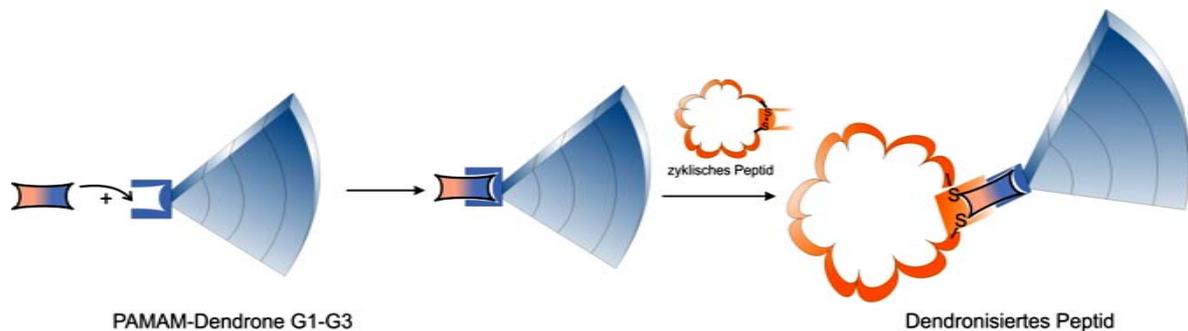


Abb. 27: "Grafting onto"-Dendronisierung mit bifunktionellem Linker an zykisches Peptid

Man erhält einen dendritischen Interkalator, der universell und flexibel an verschiedene Peptide oder Proteinen angebracht werden kann. Dies lässt schnelle Vergleichsstudien zwischen den einzelnen Generationen des Dendrons zu. Es führt die bisher aufwändigen, komplizierten und unspezifischen Dendronisierungen zu einem konvergenteren Weg, welcher flexibel die Studie der Dendron-Architektur und Endgruppen zulässt.

Um den Synthesepfad nach Weg 1 zu beschreiben (s. Abb. 25) wird natives Somatostatin durch den niedermolekularen Ethinyl-Linker funktionalisiert. Die Synthese wurde bereits in unserer Gruppe entwickelt und der Ethinyl-Somatostatin-Baustein wird durch A. Pfisterer bereitgestellt ^[111]. Auch hier finden die Dendrone mit reaktivem Kern ihren Einsatz in der „grafting from“-Dendronisierung an das Ethinyl-Somatostatin.

In Abb. 28 ist eine Übersicht über die Zielstrukturen für das Konzept der Dendronisierung gezeigt. Die Verfügbarkeit jedes einzelnen Bausteins erlaubt den flexiblen Einsatz der Strukturen an verschiedenen Stellen der Syntheserouten und zeigt die Vielfältigkeit und Flexibilität auf dem Weg zu dendronisierten Biomaterialien.

Bausteine der Peptid-Dendronisierung

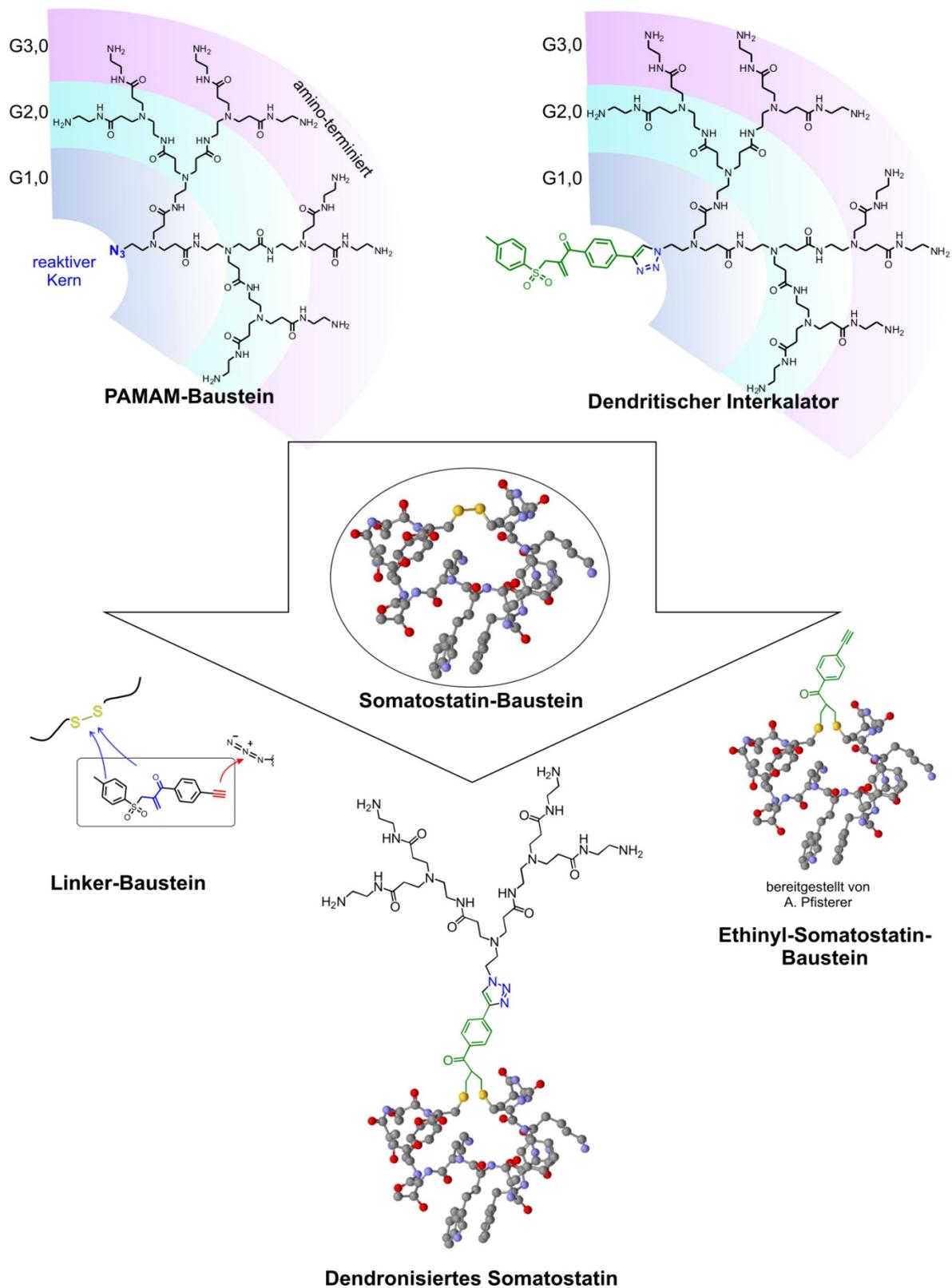


Abb. 28: Baukasten mit den verfügbaren Strukturen zur flexiblen Dendronisierung von Peptiden

3. Ergebnisse und Diskussion

Durch die Herstellung von Dendrimer-Biohybriden können die Eigenschaften beider Materialien gezielt vereint werden. Man profitiert von den definierten und multifunktionalen Strukturen der Dendrimere, während man gleichzeitig eine physiologische Funktionalität durch die bio-aktive Komponente erhält. Das Zusammenspiel beider Bausteine könnte zu einem verbesserten oder erweiterten Wirkungsprofil führen oder neue Wirkungsmechanismen ermöglichen. Allerdings stellt die Herstellung von Dendrimer-Biohybridmolekülen zahlreiche Herausforderungen an die organische Chemie und die Charakterisierung. Alleine die Synthese hochdefinierter, strukturperfekter Dendrimere ist nur mit großer Sorgfalt zu bewerkstelligen. Das Zusammenfügen von Dendrimer- und Peptidbausteinen erfordert interdisziplinäres Verständnis sowie die Anwendung von verschiedenen Methoden aus den Bereichen von Chemie, Biologie und Biochemie. Durch die polare Natur der Peptide muss man sich weitgehend auf Wasser als Lösungsmittel beschränken, was die Planung und Reaktionsführung beeinflusst und oft erschwert. Hinzu kommen schließlich aufwändige Reinigungsschritte sowie die schwierige Charakterisierung der hergestellten Biohybride in Wasser oder in Pufferlösung.

In einer schematischen Retrosynthese lassen sich die Grundbausteine des Dendron-Peptid-Konjugats darstellen (Abb. 29). Es wird dabei in die Bausteine Dendron, spezifisches bifunktionales Bindeglied (Linker) und Peptid aufgeteilt, welche alle drei getrennt und defektfrei bereitgestellt werden müssen. Der Linker bildet die Verbindung zwischen Dendron und Peptid und sorgt für die ortsgerichtete Verknüpfung der Bausteine Peptid und Dendron an einer definierten Stelle. Hierzu wird eine Reaktionsführung angewendet, die auf der einen Seite als Click-Reaktion und auf der anderen Seite als Disulfid-Interkalation (s. Kap. 1.2.2) zueinander orthogonal und jeweils hochspezifisch ist.

In diesem Kapitel werden die Synthesen der Grundbausteine für die Dendronisierung des Somatostatin-Peptids beschrieben. Beginnend mit den funktionellen Dendronen wird über die Herstellung der spezifischen Linker und dann über die Kupplung zwischen Dendron und Linker berichtet. Der abschließende Schritt – die Dendronisierung des Somatostatins – wird ausführlich mit den Versuchen zur Aufreinigung und Charakterisierung diskutiert.

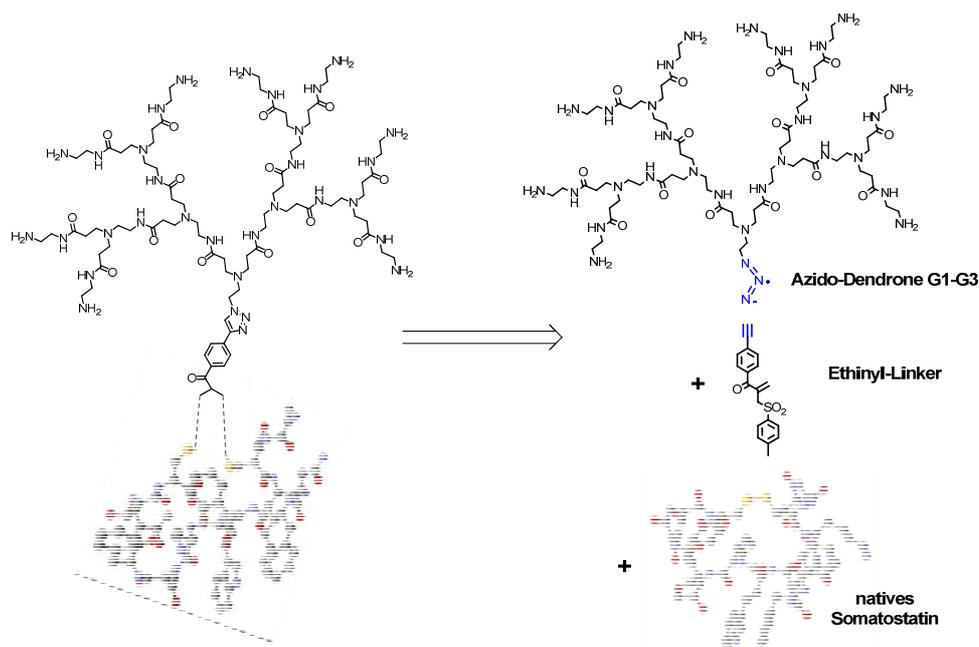


Abb. 29: Retrosynthetische Analyse der Grundbausteine für dendronisiertes Somatostatin

3.1 Synthese der Dendrone

Für die Synthese der Dendrone wird das PAMAM-Gerüst gewählt, welches nach einem divergenten Standard-Protokoll aufgebaut werden kann. Im Kern (an der Spitze des Dendrimerastes) befindet sich ein aliphatisches Azid, das für eine Click-Reaktion (1,3-dipolare Cycloaddition) in jeder Dendron-Generation bereitstehen soll. Somit erfolgt ausgehend von einem Azido-Kern der schrittweise Aufbau der Generationen G1 bis G3 (Abb. 30), so dass jede Zwischenstufe eine Azidfunktion besitzt, die in einer bioorthogonalen Cycloaddition in nachfolgenden Reaktionen umgesetzt werden kann.

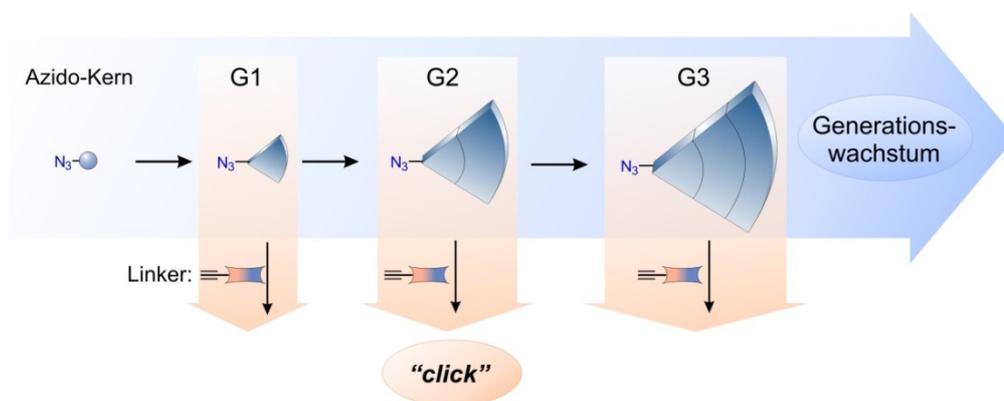


Abb. 30: Divergente Dendron-Synthese mit Möglichkeit zur Click-Reaktion in jeder Generation

3.1.1 Azido-PAMAM-Dendrone

In der Literatur wird von Lee *et al.* mehrfach von Azido-PAMAM-Dendronen berichtet ^[45, 113], welche in der Struktur weiterhin von Ng Yuen Wah David (Arbeitskreis Prof. T. Weil, Universität Ulm) modifiziert wurden. Die hier beschriebenen Synthesen sind dadurch in einer engen Kooperation mit Ng Yuen Wah David entwickelt worden und sind Teil seiner Doktorarbeit.

Azido-PAMAM-Dendrone werden in der Literatur über eine divergente Syntheseroute dargestellt. In dem vorliegenden Ansatz beginnt man mit 2-Azido-ethylamin statt 3-Azido-propylamin als Kern-Baustein. Zum Aufbau der ersten Generation wird mit Acrylsäuremethylester in einer Michael-Addition zum zunächst halbzahligen Azido-G_{0,5}-PAMAM-Dendron **3** umgesetzt, welches weiter unter Amidierung mit Ethylendiamin zum Azido-G_{1,0}-PAMAM **4** reagiert. Iteration der beiden Schritte ergibt das Wachstum um jeweils eine Generation. Bisher sind die Azido-PAMAM-Dendrone (mit Propylenkern) bis zur Generation 2,5 beschrieben.

Der Synthese-Plan dieser Arbeit basiert bis auf den Kernbaustein auf den Vorschriften von Lee *et al.* ^[45] und den bisher unveröffentlichten Ergebnissen von Ng Yuen Wah David. Es wurde mit 2-Azido-ethylamin lediglich eine kürzere Kerneinheit gewählt (Lee *et al.*: 3-Azido-propylamin), um dem Dendron geringstmögliche Flexibilität am Peptid-Konjugat zu gewähren. Die Rigidität ist für die einseitige Abschirmung des zyklischen Somatostatin-Peptids gewünscht, weil die dem Disulfid gegenüberliegende Schleifenseite die pharmakophore Funktion besitzt (s. Kap. 1.2.4) und ein „Umschlingen“ des Peptids vom Dendron somit unerwünscht ist. Es wird im Laufe der Arbeit ebenfalls diskutiert, ob der klein-gewählte Ethylen-Spacer im Kern negativen sterischen Einfluss auf die geplante Click-Reaktion hat.

2-Azido-ethylamin-Kern (2)

Der Kern 2-Azidoethylamin **2** wurde nach einer Literaturvorschrift ^[114] synthetisiert. Die Reaktion erfolgt im wässrigen Medium und nach basischer Aufarbeitung wird das Produkt in die organische Phase (Diethylether) überführt und darin gelagert. Wegen des hohen Stickstoffgehaltes (Atomverhältnis $N_C / N_N = 0,5$; es herrscht Explosionsgefahr für Stoffe mit $N_C / N_N \leq 3$ nach Smith ^[118]) ist es extrem explosiv und darf auf keinen Fall vollständig isoliert werden bzw. lösemittelfrei gehandhabt oder gelagert werden. Aus der etherischen Lösung wurde direkt eine Probe für die ¹H-NMR-Charakterisierung

entnommen und es konnte durch Peak-Integration das Verhältnis von Lösemittel und Produkt erfolgen. Daraus lässt sich durch Kenntnis der Molekulargewichte die Ausbeute der Reaktion bestimmen. Es wurde eine verbesserte Ausbeute von 91% gegenüber der Literaturangabe von 82% erreicht, was durch höhere Reaktionstemperatur und optimierte Bedingungen beim Einengen der Produktlösung am Rotationsverdampfer erklärbar ist (das Produkt ist leicht flüchtig). Das FT-IR-Spektrum zeigt die Azido-Gruppe bei einer Wellenzahl von 2097 cm^{-1} , was mit der Literatur übereinstimmt.

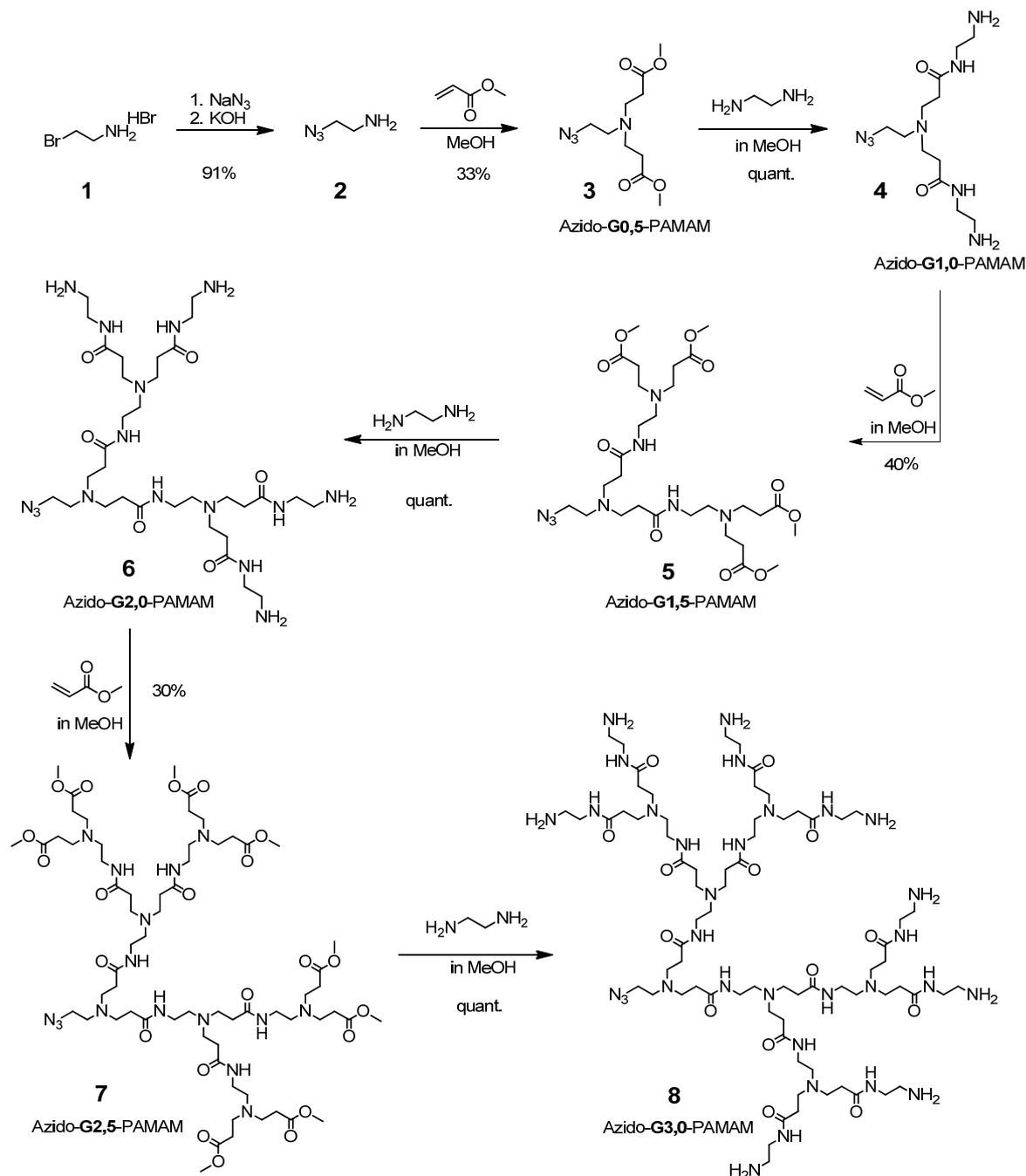


Abb. 31: Divergenter Synthesepfad des Azido-PAMAM-Dendrons G1 bis G3

Gn.5-PAMAM-Dendrone: Michael-Addition

Ausgehend von der etherischen Lösung des Azids **2** wurde durch zweifache Michael-Reaktion das Azido-G_{0,5}-Dendron hergestellt. Die Ausbeute dieser Reaktion konnte nach chromatographischer Reinigung auf 33% optimiert werden. Anders als erwartet verläuft die Addition nicht mit einer hohen Ausbeute und es werden viele polare Nebenprodukte erhalten. Die Optimierung der Ausbeute erfordert allerdings ein besseres Verständnis darüber, auf welchem Reaktionsweg die Nebenprodukte gebildet werden. Hierzu wurde eine Mischung verschiedener polarer Nebenprodukte durch Chromatographie getrennt und unter Verwendung der NMR-Spektroskopie untersucht.

Der Vergleich zu dem Spektrum des aufgereinigten Produktes **3** und des Edukts **2** deutet das Spektrum der Reaktionsmischung darauf hin, dass die Nebenreaktion an der Azidogruppe stattfindet, da das Tripletts-NMR-Signal der Protonen der vicinalen Methylengruppe verschoben ist (Abb. 32). In drei verschiedenen, separat isolierten Fraktionen konnte kein Tripletts mit vergleichbarer Verschiebung der Methylengruppe gefunden werden (obere drei Spektren in Abb. 32). Dagegen weisen die weiteren Protonensignale der Nebenprodukte des Azids **3** bei 2,8 ppm, 2,65 ppm und 2,45 ppm eine geringe Verschiebung auf, was auf die Erhaltung der chemischen Umgebung dieser Strukturelemente hindeutet. Die Nebenprodukte wurden nicht detaillierter untersucht, weil sich aus den diskutierten Spektren ein deutlicher Hinweis zur Abbau-Stelle am Azid ergibt.

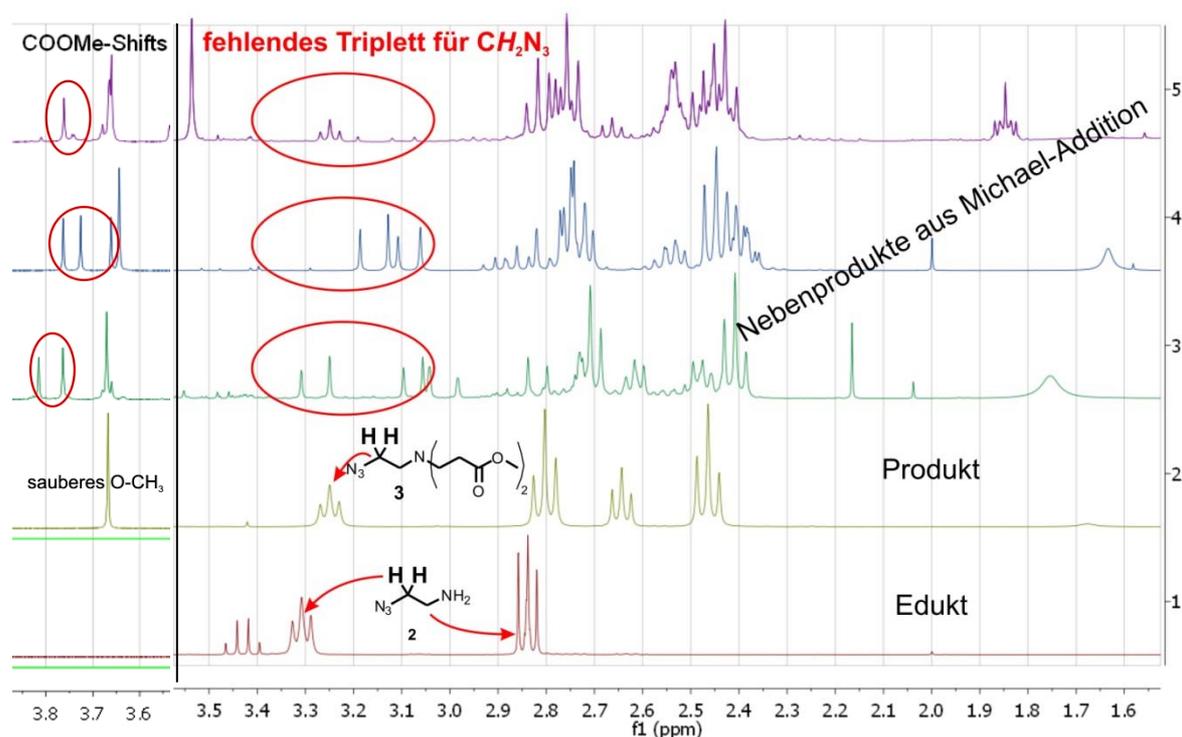


Abb. 32: ¹H-NMR-Vergleich der Nebenprodukte von Azid **2** und **3**

Aus der Literatur ist der Abbau einer Azid-Gruppe mit einem polarisierten Olefin (α , β -ungesättigter Ester) bekannt. Es bildet sich in einer 1,3-diploren Cycloaddition ein Triazolin **9** (und ein Regioisomer), welches durch Eliminierung von Stickstoff zum Aziridin **10** abgebaut werden kann^[115, 116] oder eine intramolekulare Umlagerung eingeht (siehe z. B. **11** in Abb. 33, Reaktionsweg b)^[117]. Aus diesen so entstehenden, hochreaktiven Spezies können in Anwesenheit von Nukleophilen eine Fülle von Folgeprodukten entstehen, wodurch der Abbau des Azids **3** mit Acrylsäuremethylester erklärbar ist.

Die Signale im Tieffeld der Methylestergruppen (linke rote Kreise) könnten den Dubletts der Triazolin-Protonen (**9** in Abb. 33) entsprechen, welche bekanntlich hohe Kopplungskonstanten im Bereich von 10-14 Hz aufweisen^[115]. Im grünen Spektrum 3 liegt die Konstante bei 15 Hz und im blauen Spektrum 4 (linkes Dublett) bei 10,2 Hz. Dies deutet auf die Ausbildung eines Triazolins hin, allerdings konnte kein endgültiger Strukturbeweis erbracht werden. Es sei auch erwähnt, dass kein einfaches Michael-Addukt (mit erhaltener Azid-Funktion) gefunden wurde.

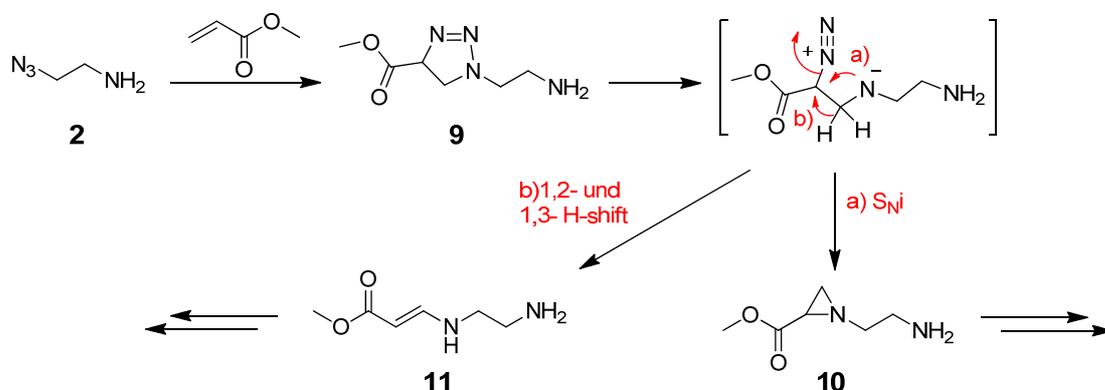
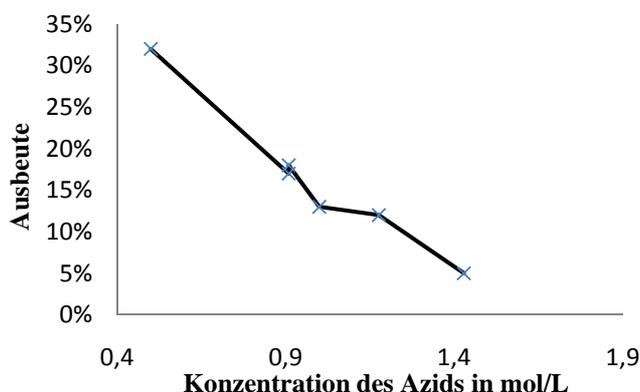


Abb. 33: Mögliche Abbaureaktionen am Azid durch aktivierte Olefine

Es ist weiterhin bemerkenswert, dass die gezeigten Nebenreaktionen ausschließlich am Kern und nicht an den Endgruppen der Äste stattfinden. Dies unterdrückt den Einbau von Defekten im Dendron-Gerüst höherer Generationen und ermöglicht eine leichtere Abtrennung der Kern-Nebenprodukte. Das reine Wachstum der Generationen gelingt daher bis zur dritten Generation defektfrei. Für höhere Generationen ist die Abtrennung der Kern-Nebenprodukte jedoch sehr schwierig da eine hohe chemische Ähnlichkeit zwischen den Nebenprodukten und dem gewünschten Azido-Dendron besteht.

Für die Unterdrückung dieser Nebenreaktion wurden Versuche zur Optimierung der Reaktionsdauer, Konzentrationen und Substratverhältnisse durchgeführt. Als Reaktionsdauer stellte sich eine optimierte Zeit von 21 Stunden heraus. Bei niedrigerer Konzentration des Azids werden die besten Umsätze erhalten (siehe Diagramm 1) und bei hohem Überschuss an Acrylsäuremethylester findet die Nebenreaktion wie erwartet häufiger statt. Es wurde die beste Ausbeute bei einem Stoffmengen-Verhältnis von 1:4 (Azid 2:Acrylsäureester) erzielt, welches auch das niedrigste getestete Verhältnis darstellt (mit z. B. 1:15 wurden nur 12% Ausbeute erreicht).

Diagramm 1: Konzentrationsabhängige Ausbeute des Azidso-Dendrons 3 (G0,5)



Trotz der Optimierung der Reaktionsparameter konnte nicht die in der Literatur angegebene Ausbeute von 86%^[45] erreicht werden. Dies könnte zum Einen an der noch immer zu hohen Menge an eingesetztem Acrylsäureester liegen (es werden 2,5 eq. vorgeschlagen) oder sich zum Anderen durch den Unterschied der Kerngruppe begründen lassen, welche im gezeigten Fall eine Methylengruppe weniger als die Dendrone von *Lee* trägt. Durch die kurze Ethylen-Gruppe als Spacer zwischen Azid und Amin kann es zu einer zusätzlichen elektronischen Polarisierung des Azids kommen und die Nebenreaktion wäre somit gegenüber einem Propylen-Spacer (wie von *Lee*) begünstigt.

Für höhere Generationen können ähnliche Reaktionsbedingungen angewendet werden. Wird mit einem größeren Überschuss an Acrylat gearbeitet, dann muss eine verkürzte Reaktionszeit eingeplant werden. Die erreichten Ausbeuten für G1,5 (5) und G2,5 (7) liegen bei 40% beziehungsweise 30%. Über den Trend, dass die Ausbeuten bei G1,5 höher als bei G0,5 und G2,5 sind, berichten auch *Lee et al.*,^[45] deren Ausbeuten in der halben Generationsabfolge mit 86%, 91% und 64% berichtet wurden, was in den vorliegenden Experimenten allerdings nicht erreicht werden konnte. Die Aufreinigung der halbzahligen Dendron-Generationen erfolgt mit zunehmend polarer Säulenchromatographie:

- Azido-G0,5-PAMAM (**3**), 50% Hexan/EtOAc, Ausbeute: 33% (454 mg)
- Azido-G1,5-PAMAM (**5**), 17% MeOH/EtOAc, Ausbeute: 40% (264 mg)
- Azido-G2,5-PAMAM (**7**): 17% MeOH/DCM, Ausbeute 30%. (86 mg)

Die mittels NMR ermittelten Signale (^1H und ^{13}C) stimmen mit den Literaturwerten von *Lee et al.* sehr gut überein. Für die markante Azido-Methylengruppe ist eine geringe Tieffeldverschiebung von Generation G0,5 \rightarrow G1,5 zu erkennen, wobei die peripheren Methylester konstante Signale ergeben (s. Abb. 34). Vermutlich polarisiert das erste ausgebildete Amid in G1,0 die Solventumgebung und verändert dadurch die elektronische Umgebung der Methylengruppe am Azid. Auch die Amid-Protonen in G1,5 verschieben sich gering zum Tieffeld beim Generationswachstum zu G2,5, was analog erklärt werden kann. Jedoch gilt zu bedenken, dass Wechselwirkungen (vor allem Wasserstoffbrücken) zwischen den Amidgruppen der Peripherie ausgebildet werden, was zu einer Aggregation der Äste führt und die inneren Amid-Protonen beeinflusst. Durch Wasserstoffbrücken ergibt sich eine zunehmende Verschiebung ins Tieffeld.

Jede halbe Generation zeigt die IR-Aktivität der Azido-Gruppe (2096 cm^{-1}) im abnehmenden Verhältnis zur Carbonylschwingung (1730 cm^{-1}) mit zunehmender Dendron-Generationszahl.

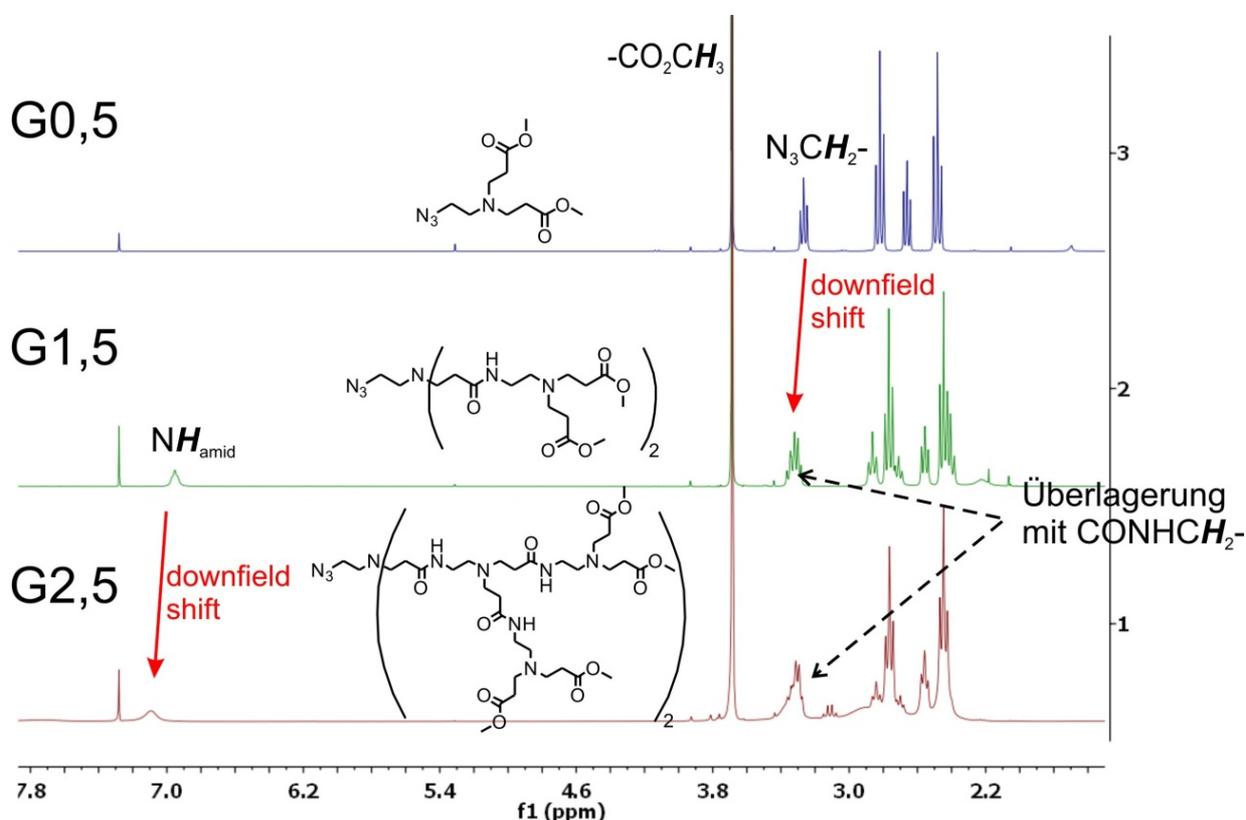


Abb. 34: NMR-Spektren der halben Generationen des Azido-Dendrons

Gn.0-PAMAM-Dendrone: Amidierung

Die Synthese der ganzzahligen Azido-Dendrone erfolgt über exzessive Amidierung mit einem großen Überschuss von Ethylendiamin in konzentrierter methanolischer Lösung. In diesem Reaktionsschritt können signifikante Defekte im Dendron-Gerüst auftreten, was durch einen Überschuss von mindestens 25 eq. Diamin pro Estergruppe verhindert werden kann (s. Abb. 35). Der intramolekulare Ringschluss von **12** ist dann statistisch gegenüber einem zweiten Angriff von Ethylendiamin benachteiligt und wird unterdrückt. Es können auch lange Reaktionszeiten (für G3,0 ca. 5 Tage) angewendet werden, da keine Nebenreaktion beobachtet werden.

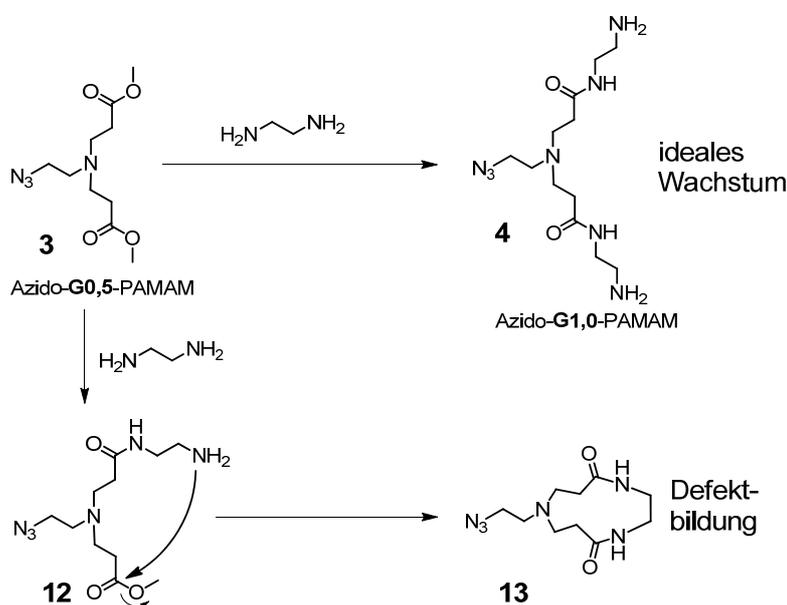


Abb. 35: Defektbildung bei Amidierung

Organische Azide können auch als Pseudo-Halogenide angesehen werden ^[119], sodass im basischen Medium mit polarem, protischen Lösungsmittel eine nukleophile Substitution durch ein primäres Amin (eingesetztes Ethylendiamin = EDA) stattfinden kann, welche zum Nebenprodukt **14** führt (siehe Abb. 36 rechts). Dies wurde mit den vorliegenden Analysen nicht beobachtet und ist allerdings auch nur schwer zu detektieren. Im FD-MS werden die Dendrone wegen guter Chelatisierung von Kationen oftmals als Natrium- oder Kaliumsalze detektiert. Das im Kern EDA-substituierte G₁-Dendron hätte als Natriumsalz die gleiche Masse wie das Kaliumsalz des idealen Produktes. In der Massensanalyse treten Signale bei $m/z = 314$ g/mol (für M⁺) und $m/z = 354$ g/mol auf (Abb. 36 rechts). Das Auftreten der genannten Salze kann die Substitution als Nebenreaktion nicht vollständig ausschließen, da dessen Signal mit dem Natriumsalz des Azido-G_{1,0}-PAMAM **4**

überlagert. Jedoch kann im FT-IR-Spektrum (Abb. 36) die deutliche Anwesenheit des Azids durch die asymmetrische Streckschwingung bei 2096 cm^{-1} gezeigt werden ^[120] (die symmetrische Streckschwingung für aliphatische Azide liegt variabel bei etwa 1260 cm^{-1}). Daraus kann zumindest geschlossen werden, dass die Verunreinigung durch das kernsubstituierte Nebenprodukt **14** nicht oder nur in geringem Maße vorhanden ist und somit fast ausschließlich das gewünschte Azid erhalten wurde.

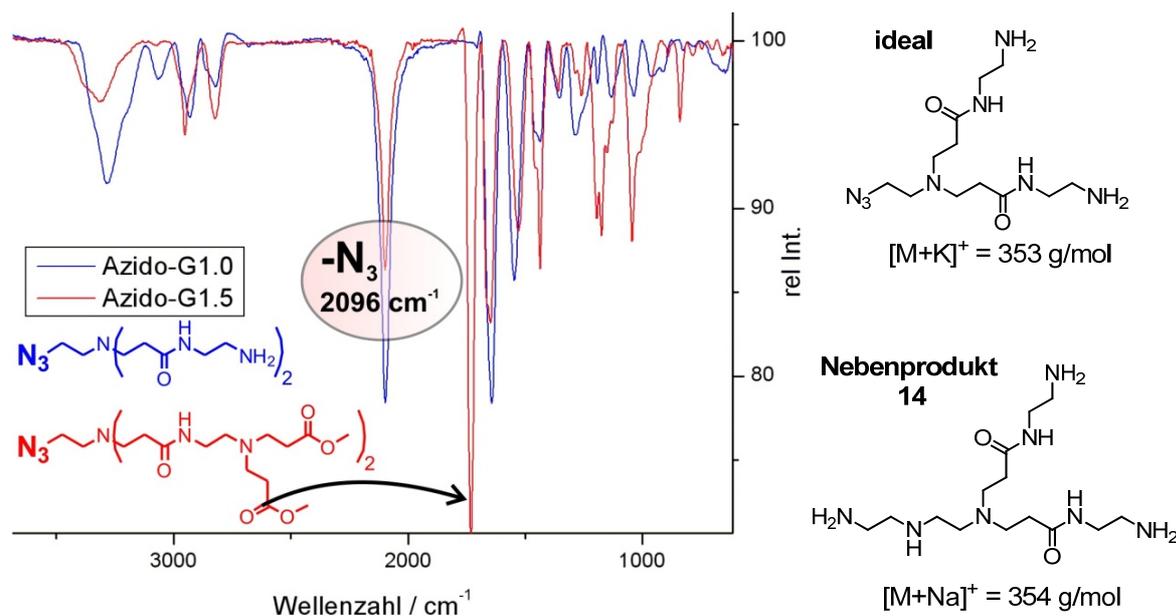


Abb. 36: (links) IR-Spektrum der Azido-G1,0- und G1,5-Dendrone, (rechts) gleiche m/z des [Nebenproduktes + Na] und des [Produktes + K]

Eine ganzzahlige Generation $G_n.0$ muss zur Reinigung von allen Reaktionskomponenten isoliert werden, was durch azeotrope Entfernung des Überschusses an Ethylendiamin mit Toluol:Methanol (= 9:1) möglich ist. Durch NMR-spektroskopische Analyse wird die vollständige Umsetzung aller Dendron-Äste sichergestellt (signifikante Defekte wurden nicht detektiert). Es ist keine Chromatographie nötig und die Umsetzung gelingt stets in quantitativer Ausbeute, wie auch in der Literatur berichtet wird.

Die Löslichkeit der Amino-terminierten Dendrone in Dichlormethan nimmt mit steigenden Generationen G_0 - G_3 ab. Während G_0 (Kern **2**) und $G_{1,0}$ (**4**) noch gut in DCM löslich sind, konnte $G_{2,0}$ (**6**) nur begrenzt und $G_{3,0}$ nicht gelöst werden. Für die Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie wurde daher für die höheren Generationen deuteriertes Methanol verwendet, wobei $G_{1,0}$ und $G_{2,0}$ auch gute Spektren in CDCl_3 lieferten.

Insgesamt birgt die Synthese der Azido-Dendrone einige Nachteile: Die Verfügbarkeit und Reinheit höherer Generationen ist wegen der schlechten Ausbeute durch die besprochenen Nebenreaktionen am Kern eingeschränkt. Mit zunehmender Dendron-Generation wird die Abtrennung der Nebenprodukte (Nebenreaktion am Kern) schwieriger, da sich die Gerüste chemisch sehr ähnlich sind. Der hydrodynamische Radius und die Polarität von Produkt und Nebenprodukten sind fast identisch und lassen keine gute Auftrennung durch Chromatographie mehr zu. Dies motiviert zu einer Änderung des Synthese-Plans. Es wurde daher der Weg zu neuen Dendronen gesucht, welche in besseren Ausbeuten und höherer Reinheit zugänglich sind.

Durch das gezeigte Baukasten-Prinzip (vgl. Kap. 2) lassen sich strukturelle Änderungen in der Architektur vornehmen, ohne dass das Gesamtkonzept der Peptid-Dendronisierung signifikant verändert werden muss. Um die Nebenreaktion an der Azido-Gruppe während der Michael-Addition mit Acrylsäuremethylester zu unterdrücken, muss entweder eine andere Funktionalität im Kern gewählt werden (Austausch des Azids) oder das Dendron-Gerüst verändert werden, damit kein Michael-System für die dipolare Cycloaddition mit dem fokalen Azid zur Verfügung steht. Dieser Ansatz wird im folgenden Abschnitt erläutert.

3.1.2 Ethinyl-PAMAM- und hybrides Azido-PAMAM-Lysin-Dendron

Um die Syntheseprobleme des Azido-PAMAM-Dendrons zu beheben, müssen die in Abb. 33 gezeigten Nebenreaktionen verhindert werden. Auf der einen Seite kommt daher der simple Austausch der Azido-Gruppe gegen eine andere reaktive Funktionalität in Frage. Andererseits kann auch das Dendron-Gerüst verändert werden, sodass die Azido-Gruppe erhalten bleibt, aber nicht mit den „Gerüst-Monomeren“ in Reaktion tritt. Es muss also nach einer orthogonalen Chemie zwischen Kern und Dendron-Endgruppen gesucht werden, welche trotzdem noch die Ansprüche an das biohybride System erfüllt und die Verknüpfung des Dendrons mit dem Somatostatin-Peptid ermöglicht.

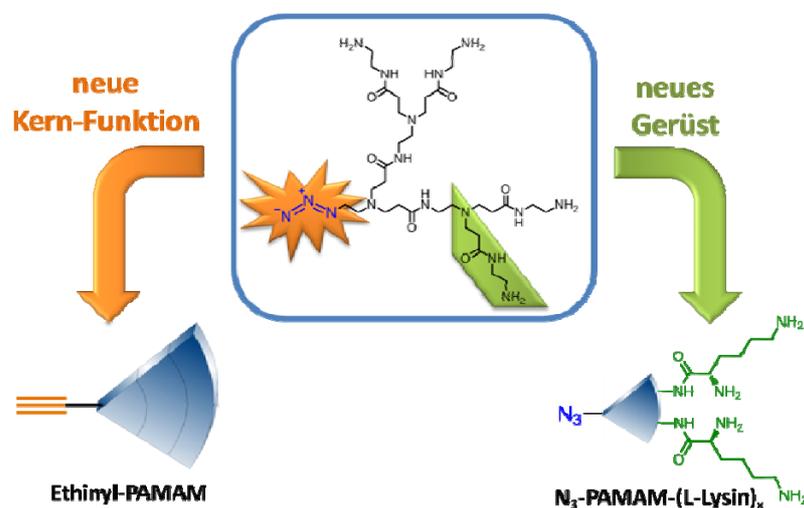


Abb. 37: Behebung der Nachteile am Azido-PAMAM-Dendron

Austausch des Kerns: Ethinyl-PAMAM

Als neue Funktion im Kern wird eine Ethinyl-Gruppe gewählt (Abb. 37). Propargylamin **15** (s. Abb. 39) ist kommerziell erhältlich und kann für den Aufbau des Dendrons direkt eingesetzt werden. Die Synthese ist bis zur Generation G3,5 literaturbekannt^[50]. Terminale Acetylene haben in jüngerer Zeit viel Aufsehen durch ihren Einsatz in neuen metallkatalysierten Reaktionen erregt. Durch den Ethinyl-Kern können flexibel mehrere Synthesewege eingeschlagen werden, welche in Abb. 38 schematisch dargestellt sind. Die einfache Umkehrung des bisherigen Synthesepfades ist möglich, da für die Click-Reaktion das erforderliche Azid auch an dem Peptid-Linker eingeführt werden könnte (s. Abb. 38, mittlere Reaktion). Daneben ist mit der Ethinyl-Funktion auch eine Kreuz-Kupplung nach Sonogashira-Hagihara^[121] möglich, wodurch sich weitere, attraktive

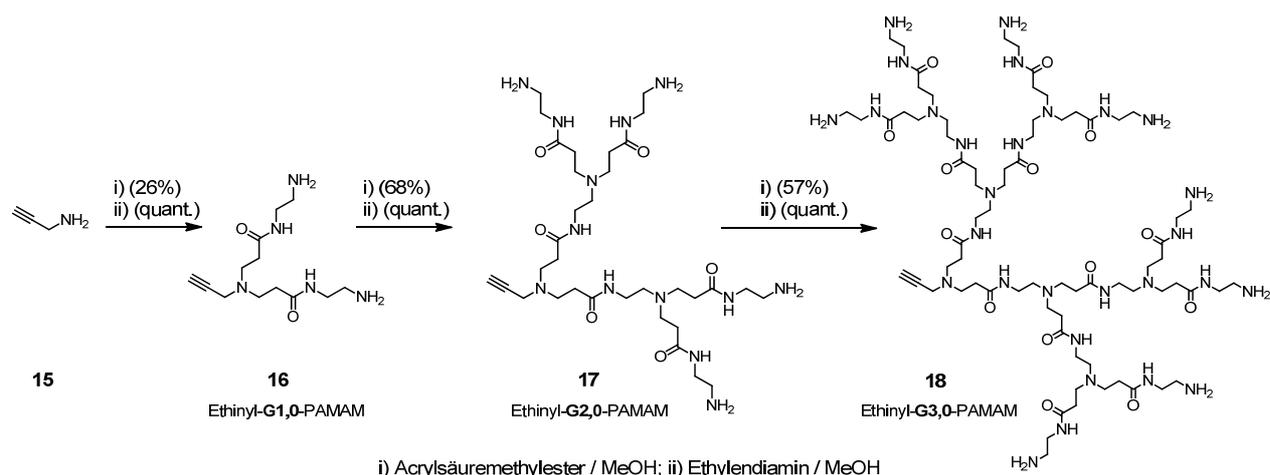


Abb. 39: Synthese der Ethynyl-PAMAM-Dendrone, G1-G3

Die erhaltenen Ethynyl-Dendrone wurden mittels IR-, NMR-Spektroskopie, FD-MS und MALDI-TOF-MS charakterisiert. Die Signale stimmen mit denen der Literatur^[50] überein und die Anwesenheit der Ethynylgruppe kann deutlich durch die Hochfeldverschiebung des terminalen Acetylen-Protons sichtbar gemacht werden. Das Signal spaltet als Triplet mit einer geringen 4J -Kopplung von 2,2 Hz zu den Methylenproton auf. Die dem Acetylen vicinale Methylengruppe weist die gleiche 4J -Kopplungskonstante auf und zeigt ein Dublett bei 3,4 ppm (s. Abb. 40). Einen ähnlichen Polarisations-Effekt wie bei den Azido-Dendronen **3**, **5** und **7** zeigen die geringen Tieffeldverschiebungen der Kern-Protonen beim Übergang von G0,5 zu G1,5. Dies könnte durch die Polarisierung der Lösungsumgebung durch die in G1,5 neu-ausgebildeten Amid-Bindungen erklärt werden. Aggregation und Wasserstoff-Brückenbildung der einzelnen Dendrimer-Zweige von G2,5 zeigt die unterschiedlichen Verschiebungen der Amid-Protonen von innerer und äußerer Schale des Dendrons (Abb. 40).

In den Massenspektren konnten die ganzzahligen Generationen nicht nachgewiesen werden, da die polaren Aminogruppen keine Detektion mittels FD-MS und MALDI-TOF-MS ermöglichten. Die halbzahligen Generationen G1,5 und G2,5 sind nachweisbar und aggregieren mit Natrium- und/oder Kalium-Salzen, welche auch mit einer Peak-Differenz von 23 g/mol bzw. 39 g/mol sichtbar sind (Abb. 41).

Die gewünschte Erhöhung der Ausbeuten der Ethynyl-Dendrone konnte weitgehend erzielt werden (Tab. 1), jedoch wurden nicht die Literaturwerte^[50] von nahezu vollständiger Umsetzung erreicht. Es konnte aber anhand des Ethynyl-G0,5-Dendrons gezeigt werden,

dass keine Nebenreaktion am Kern mit Methylacrylat stattfindet, da 26% des zweifachen Michael-Adduktes *und 64% des einfachen Michael-Adduktes isoliert wurden, ohne dass Abbauprodukte am Azid auftreten. Die vollständige Umsetzung wurde wegen der zu kurz gewählten Reaktionszeit nicht erreicht.

Tab. 1: Ausbeuten der halbzahligen Dendrone

Generation	Azido	Ethynyl
G0,5	33%	26%*
G1,5	40%	68%
G2,5	30%	57%

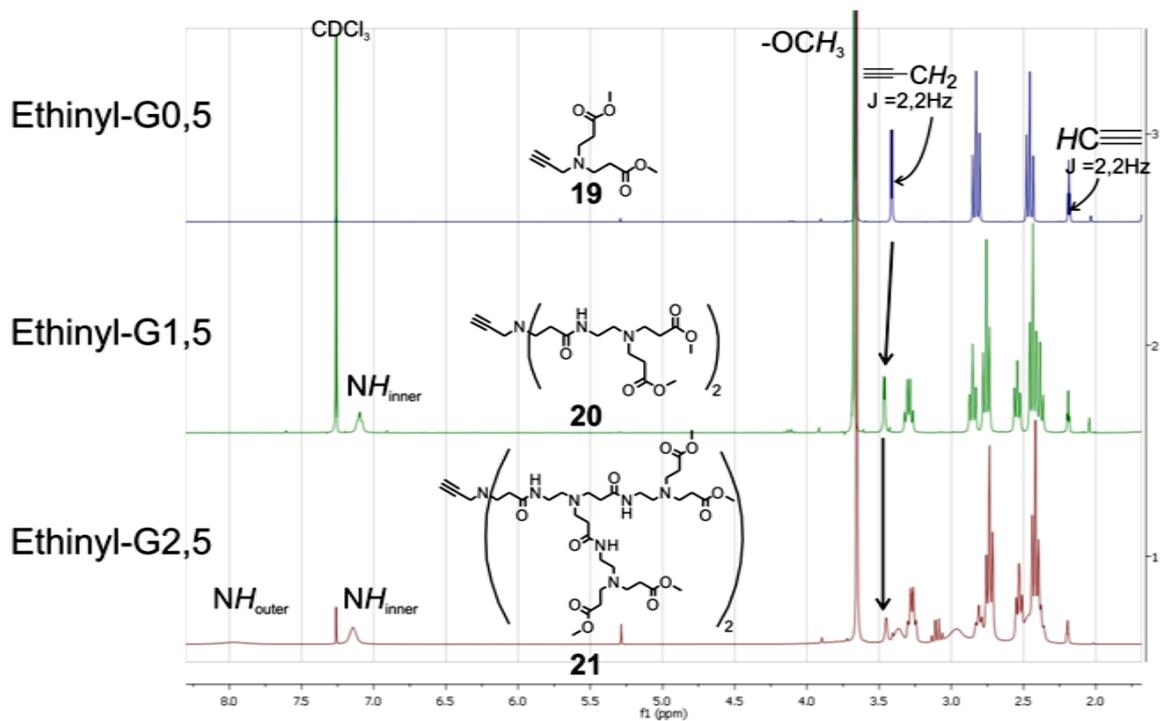
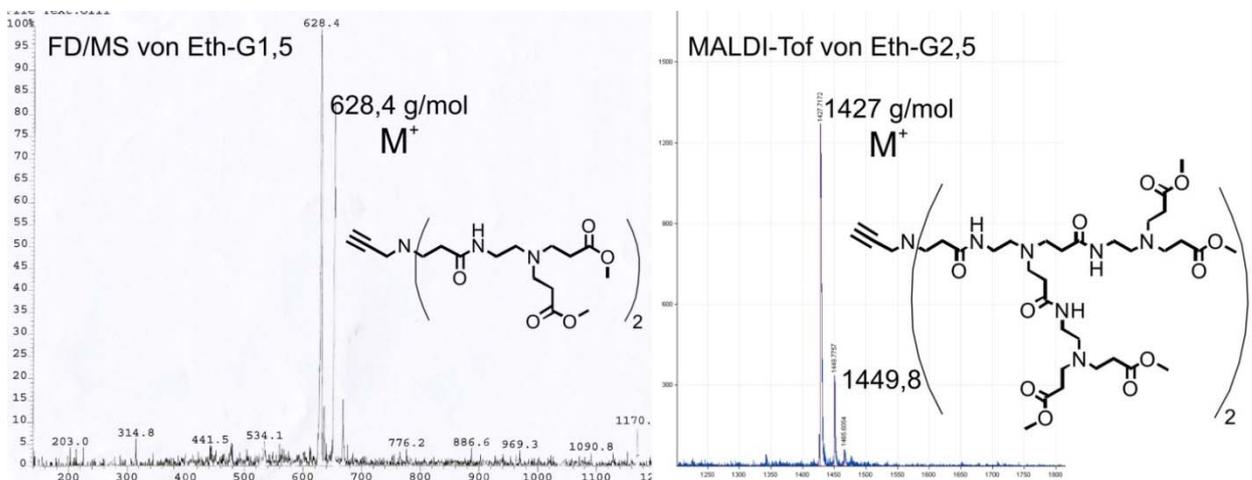
Abb. 40: ¹H-NMR-Spektren der halbzahligen Ethynyl-Dendrone

Abb. 41: Massenspektren der Ethynyl-Dendrone G1,5 und G2,5

Austausch des Gerüsts: Lysin-basierte Dendrone

Um die Azido-Funktion für die Click-Reaktion am Dendron zu erhalten kann das Gerüst geändert werden, damit das reaktive Azid chemisch orthogonal zum Dendron-Aufbau ist. Für die Vergleichbarkeit zum PAMAM-Dendron und um die biologische Verträglichkeit der gewählten Bausteine zu gewährleisten, wird die natürliche Aminosäure L-Lysin als Gerüstbaustein gewählt. Dieser C6-Baustein trägt ein primäres „ε-Amin“ in der Seitenkette. Nach der Systematik von Denkewalter *et al.* können durch den Einsatz von Schutzgruppen Dendrimere auf L-Lysin-Basis aufgebaut werden ^[10]. Ebenso wurde von Fréchet *et al.* gezeigt, dass gemischte Dendrimer-Gerüste Lysin-Einheiten enthalten können, welche durch einfache Peptid-Chemie eingeführt werden ^[65]. Das erhaltene Dendron ist analog zum PAMAM-Gerüst polarer Natur und als ein Polyamid anzusehen. Lysin kann als „intrinsische“ Verzweigungseinheit angesehen werden, da es drei funktionelle Gruppen trägt bereits eine Verzweigung am α-C mitbringt.

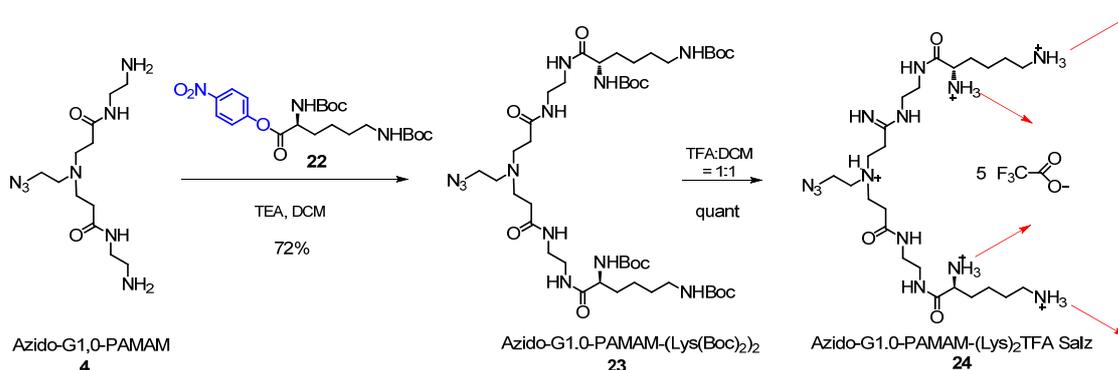
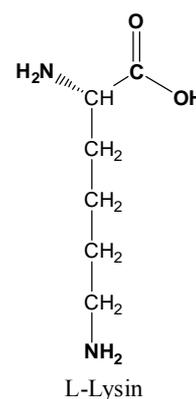


Abb. 42: Syntheschema des Lysin-basierten Dendrons

Der Aufbau höherer Generationen an Azido-PAMAM-Dendronen ist durch die Michael-Addition mit Nebenreaktion am Azid-Kern gehindert. Ausgehend von Azido-G1,0-PAMAM-(NH₂)₂ **4** kann aber eine Amidkupplung mit dem aktivierten, ε-geschützten Lysin **22** vorgenommen werden (s. Abb. 42). Mit der *ortho*-Nitrophenyl-Gruppe steht ein Aktivester zur Verfügung, so dass kein Kopplungsreagenz eingesetzt werden muss. Die Aufreinigung erfolgt einzig durch Auswaschen der unreaktierten Verbindungen und des *o*-Nitrophenols. Hierzu wird zunächst das überschüssige Lysin **22** mit *N,N*-Dimethyldiaminoethan versetzt, welches in einer Amidkopplung zum tertiären Amin-Lysin-Addukt reagiert und somit sauer ausgewaschen werden kann. Das Boc-geschützte Dendron **23** wird

dagegen in der organischen Phase gehalten und kann isoliert werden. Es konnten gute Ausbeuten von 72% des isolierten Dendrons **23** erzielt werden. Die nachfolgende Entfernung der Boc-Schutzgruppen mit TFA verläuft quantitativ und es wird ein in Wasser und in Methanol löslicher Feststoff erhalten (als TFA-Salz **24**).

Die Charakterisierung erfolgte durch NMR-Spektroskopie und MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Das MALDI-Massenspektrum zeigt zusätzlich Abbauprodukte der Boc-Gruppe, die während der Ionisation entstehen. Die Boc-Schutzgruppe baut sich im MALDI mit einer Massendifferenz von ca. 88 g/mol ab und trägt dazu noch die Kalium- (39 g/mol) und Natrium- (23 g/mol) Ionen (s. Abb. 42). Das NMR-Spektrum zeigt die Anwesenheit der Boc-Schutzgruppen und der Azido-Funktion (anhand der vicinalen Methylenprotonen).

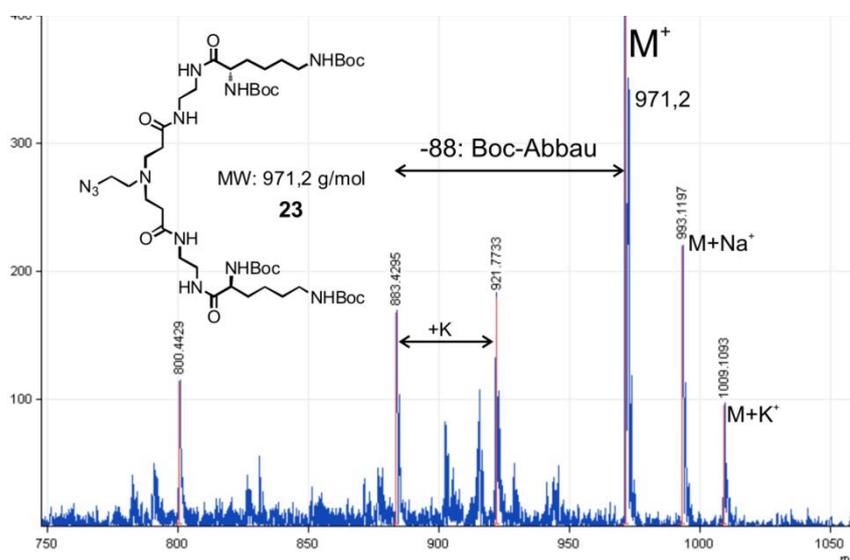


Abb. 43: MALDI-TOF-MS des Lysin-Dendrons 23 mit Boc-Abbau

Die erhaltene Dendron-Struktur kann nach Entfernung der Boc-Schutzgruppen für den Aufbau höherer Generationen genutzt werden. An dieser Stelle sollte allerdings nur dargestellt werden, dass Azido-Dendrone mit verschiedenen Gerüsten in guten Ausbeuten hergestellt werden können, ohne dass die sensitive Azid-Gruppe Nebenreaktionen eingeht.

Für die weitere Arbeit wurden jedoch die bekannten Azido-PAMAM- und Ethinyl-PAMAM-Strukturen verwendet, um PAMAM-dendronisiertes Somatostatin zu erzielen. Allerdings soll noch einmal darauf hingewiesen werden, dass sich Lysin-basierte Dendrimere für einen analogen Dendrimer-Aufbau eignen und sich zusätzlich durch die unterschiedliche Reaktivität der Amine oder Schutzgruppenchemie Dendrone mit zwei unterschiedlichen Funktionseinheiten darstellen lassen.

3.2 Linkersynthesen

Nach dem beschriebenen Aufbau der Dendrone muss an deren reaktiven Kern ein spezifischer Linker für die Peptidfunktionalisierung geknüpft werden. In Kapitel 1.2.2 wurde die hochspezifische Funktionalisierung von Disulfid-Brücken vorgestellt. Mit einem Linker der allgemeinen Struktur **25** können reduzierte Disulfid-Brücken kovalent verbrückt werden, sodass sich Linker **25** zwischen die Schwefelatome „einschiebt“. Der Additions-Eliminierungs-Mechanismus ist in der Einleitung dieser Arbeit (1.2.2) ausführlich diskutiert.

Bisher wurde eine Reihe von Derivaten der Struktur **25** hergestellt. Der Rest *R* ist vielseitig variierbar und kann sogar kürzere Poly(ethylenglycol)-ketten tragen ^[86, 87]. Mit diesen modifizierten Strukturen können beliebige Funktionalitäten an Peptiden und Proteinen eingeführt werden, welche Farbstoffe, ATRP-Initiatoren und weitere Makromoleküle umfassen ^[111, 112]. Bisher wurde jedoch noch nicht die Anheftung eines Dendrimers oder Dendrons in der Literatur gezeigt. Für die synthetisierten Azido- und Ethinyl-Dendrone musste der richtige Linker für die Syntheseplanung gewählt werden, damit eine orthogonale Chemie zum Dendron-Aufbau möglich ist. In Abb. 44 sind einige Derivate des Interkalators gezeigt. Für die vorhandenen Ethinyl- und Azido-Dendrone eignet sich besonders der Iod-Monosulfon-Linker **28** beziehungsweise der Ethinyl-Linker **29**.

Die Sonogashira-Kreuzkopplung soll mit dem aromatischen Iod-Linker und dem Ethinyl-Dendron gezeigt werden. Es ist bekannt, dass die Palladium-katalysierten C-C-Kupplungen eine Reihe von funktionellen Gruppen tolerieren und auch große Ethinyl-Bausteine reaktiv genug sind. Die synthetisierten Azido-Dendrone sollen in einer Click-Reaktion mit dem Ethinyl-Linker **29** gekoppelt werden.

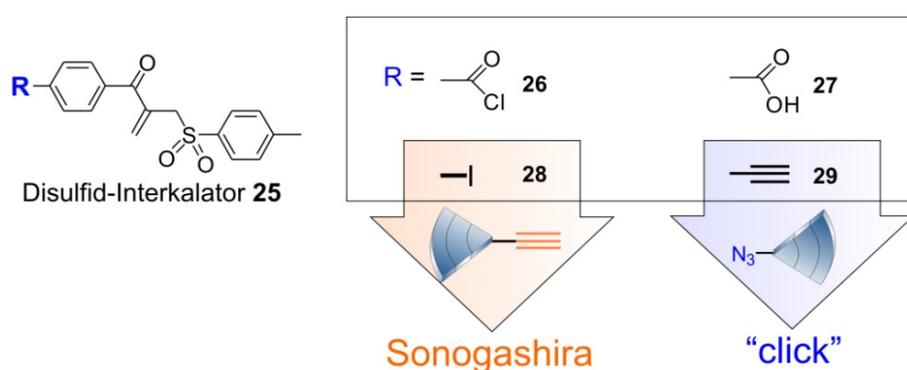


Abb. 44: Derivate des Disulfid-Interkalators

Die Synthese der Interkalatoren **28** und **29** folgte nach einer Vorschrift von Anne Pfisterer (Weil, Müllen *et al.*) [111, 112]. Die Synthese wurde am MPI-P Mainz entwickelt und war zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit noch nicht öffentlich publiziert, wurde jedoch trotzdem als Bestandteil der vorliegenden Arbeit genutzt und optimiert.

3.2.1 Iod-monosulfon-Linker

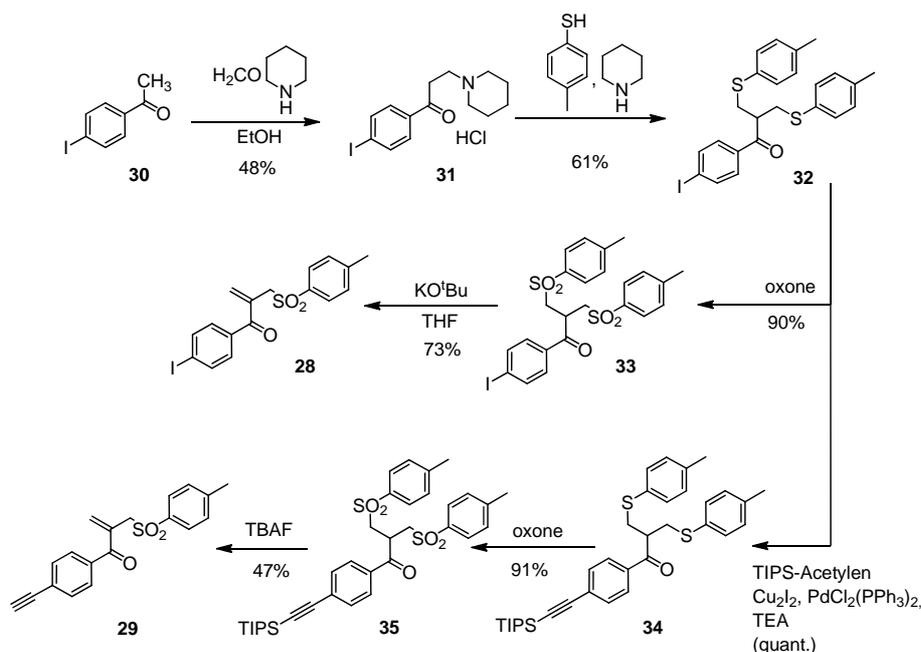


Abb. 45: Syntheschema des Iod-Monosulfons **28** und Ethinyl-Monosulfons **29**

Das Iod-Monosulfon kann in vier Schritten aus Iod-Acetophenon **30** hergestellt werden. Nach Umsetzung von **30** in einer Mannich-Reaktion kann das entstehende Salz **31** durch erneute Mannichreaktion und *in situ* Eliminierung von Piperidin ein reaktives Michael-System ausbilden. Die Addition von 4-Methyl-thiophenol führt zum Iod-bissulfid **32**. Diese wichtige Zwischenstufe ermöglicht ebenfalls den Zugang zum Ethinyl-substituierten Linker. Für die Iod-Endstufe wird mit Kaliumperoxosulfat („oxone[®]“) mild zum Iod-bissulfon **33** oxidiert. Die letzte Stufe ist wegen der Basenlabilität des Iods mit großer Sorgfalt durchzuführen, da das extrem basische Kalium-*tert.*-butanolat nicht in zu hohen Konzentrationen eingesetzt werden darf. Dies führt sonst zum Abbau der Iod-Funktion. In kleinen, niederkonzentrierten Portionen zugegeben reagiert es allerdings zur Eliminierung einer Sulfinsäure und damit zum Iod-Monosulfon **28** mit aktivem Michael-System.

3.2.2 Ethinyl-monosulfon-Linker

Ausgehend von der wichtigen Zwischenstufe Iod-bissulfid **32** gelingt durch Sonogashira-Hagihara-Kreuzkupplung die Einführung der TIPS-Acetylen-Gruppe. Diese Reaktion verläuft mit ausgezeichneter Ausbeute, was an der hohen Reaktivität des aromatischen Iods und des kleinen Acetylen-Bausteins liegt. Bei niedermolekularen Acetylenen ist eine gute Komplexierung des Kupfers an das acide Alkin möglich; weiterhin erfolgt eine rasche und ungehinderte reduktive Eliminierung am Palladium-Zentrum, was gute Ausbeuten und kurze Reaktionszeiten ermöglicht. Die Oxidation zum TIPS-Ethinyl-bissulfon **35** gelingt unter milden Bedingungen wie beim Iod-Derivat in sehr guten Ausbeuten. Es ist wiederum der letzte Reaktionsschritt, welcher mit dem sehr basischen Fluorid zu niedrigen Ausbeuten führt. Die Entfernung der TIPS-Schutzgruppe verläuft gleichzeitig mit der Eliminierung einer Sulfanilsäure ab und führt so direkt zum Ethinyl-monosulfon **29**.

Die Charakterisierung beider Endstufen fand mittels NMR-Spektroskopie und FD-MS statt. Die erhaltenen Daten stimmen mit denen von A. Pfisterer ^[111, 112] überein. In Abb. 46 sind die ¹H-NMR-Spektren der Endstufen des Iod-Linkers **28** und des Ethinyl-Linkers **29** gezeigt. Man erkennt die Anwesenheit des Olefins an den stark aufgespaltenen Protonen **e** und **f**. Die Methylengruppe (**H_d**) neben dem Sulfon und die aromatische Methylgruppe (**H_a**) ergeben jeweils ein Singulett. Das Acetylen-Proton zeigt eine charakteristische Verschiebung von 3,21 ppm ebenfalls als Singulett. Die aromatischen Protonensignale können durch COSY-NMR-Technik eindeutig zugeordnet werden (hier nicht erläutert).

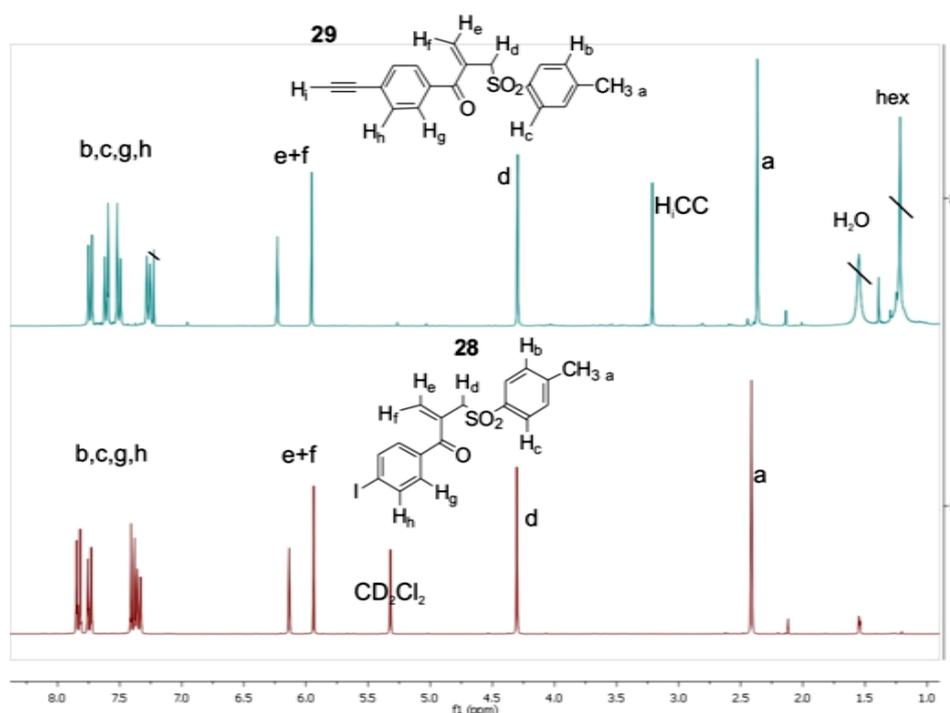


Abb. 46: ¹H-NMR-Spektren der Iod- und Ethinyl-Linker

Für die Empfindlichkeit der stark-basischen Umsetzung (s. Abb. 45) zu den Endstufen des Monosulfons **28** und **29** wird (neben der labilen Iod-Bindung in **28**) eine Deprotonierung der Methylengruppe (vicinal zum Sulfon) vermutet. Sulfon-Gruppen gelten als Carbonyl-Analoga und besitzen daher saure Protonen in direkter Nachbarschaft. Das Monosulfon **25** hat zwei konjugierte Systeme, die nur durch die Methylengruppe mit einem sp^3 -Zentrum getrennt sind. Eine Deprotonierung würde zu einem kreuz-konjugierten π -System (**25a**) führen, welches vielleicht zu Nebenreaktionen neigt und den Abbau des Monosulfons fördert (Abb. 47). Da die beschriebenen Verunreinigungen an beiden Monosulfonen (**28** und **29**) beobachtet werden, kann davon ausgegangen werden, dass es sich tatsächlich um eine thermodynamische Unstabilität in der direkten Umgebung der Sulfongruppe oder des Michaels-System handelt.

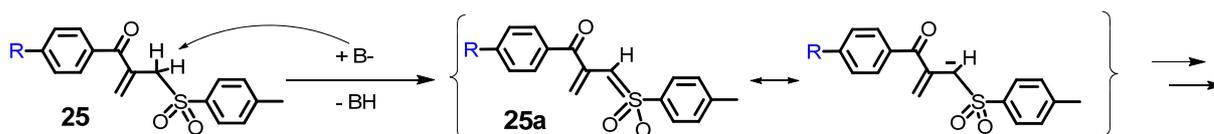


Abb. 47: Vermuteter Abbau der Monosulfone 28 und 29 im stark-basischen Medium

3.3 Dendritische Interkalatoren G1-G3

Die hergestellten Ethinyl- und Azido-PAMAM-Dendrone können mit nun an den Peptid-Linker **25** gekuppelt werden. Für das Ethinyl-Dendron wird eine metallkatalysierte Sonogashira-Hagihara-Kreuzkupplung ^[121] eingesetzt, die eine C-C-Knüpfung mit Erhalt der Dreifachbindung darstellt. Die Azido-Dendrone werden durch kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition („Click-Reaktion“) ^[123] mit dem Ethinyl-Linker **29** umgesetzt und bilden aromatische Triazole als Brückenglied aus. Es soll von jeder Generation G1-G3 der PAMAM-Dendrone mindestens ein Derivat (Triazol- oder Acetylen-überbrückt) synthetisiert werden. Die gebildeten Dendron-Linker-Konjugate ermöglichen dann für die Verbrückung der Disulfidbrücke des Somatostatin-Peptids und können auch als dendritische „Makro-Interkalatoren“ verstanden werden.

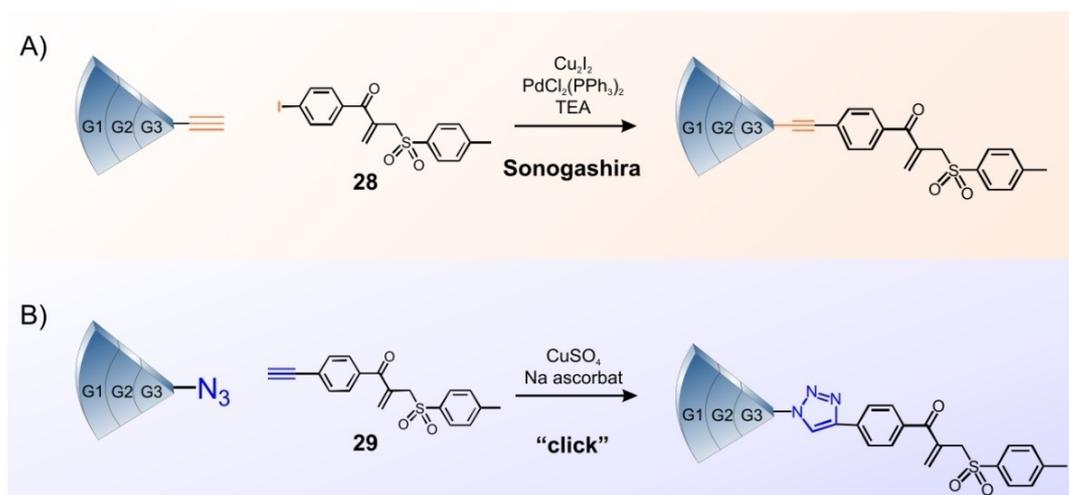


Abb. 48: Dendron-Linker-Konjugation via A) Sonogashira-Kupplung B) Huisgen-Cycloaddition

3.3.1 1,3-Dipolare Cycloaddition

Für die kupferkatalysierte Click-Reaktion (Alkin-Azid-Cycloaddition) wurde eine standardisierte Methode mit der *in situ* Bildung von Cu(I) aus CuSO_4 versucht. Diese Bedingungen wurden auch in der Literatur verwendet, um halbzahlige Generationen (Methylester-Schale) der entsprechenden Azido-PAMAM-Dendrone an niedermolekulare Acetylene zu knüpfen ^[45, 46]. In dieser Arbeit sollen jedoch die ganzzahligen Dendrone eingesetzt werden, da die peripheren Aminogruppen für Wasserlöslichkeit sorgen.

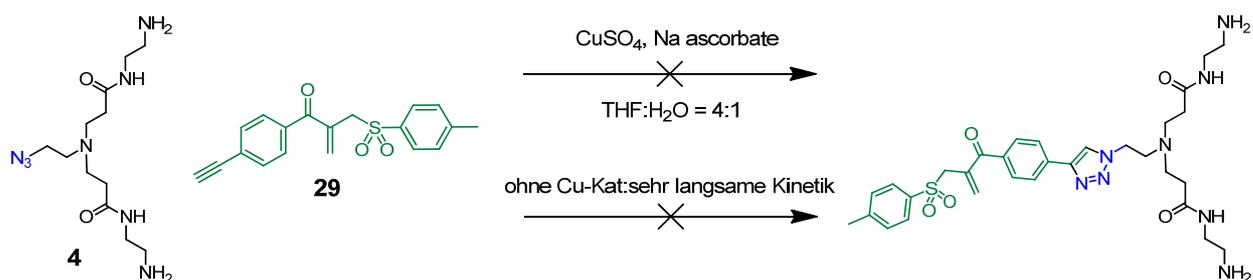


Abb. 49: Getestete Bedingungen für die Click-Reaktion des Linkers mit dem G1,0-Dendron

Es wurden mehrere Ansätze mit dem Azido-G1,0-Dendron-(NH₂)₂ **4** und dem Ethinyl-Linker **29** getestet (s. Abb. 49). Dazu wurde **29** mit CuSO₄ versetzt und durch Zugabe von Natriumascorbat wurde *in situ* ein Kupfer(I)-Ion erzeugt, was die Bindung mit dem terminalen Acetylen eingeht. Die bekannten Farbumschläge von blau nach grün fanden hierbei statt und zeigten die Aktivität des Cu(I)-Ions. Nach Zugabe des Dendrons **4** trübte sich die Lösung und wurde gelblich. Schon nach 10 Minuten konnte man einen gelben Feststoff isolieren, welcher unlöslich in DMF, DMSO, DCM, Wasser, THF und Hexan war. Ein IR-Spektrum des Feststoffes zeigte keine Azido-Bande bei 2095 cm⁻¹. Dies lässt auf eine Reaktion am Azid schließen. Weitere Charakterisierungen waren nicht erfolgreich. Es wurde vermutet, dass nicht das gewünschte Produkt gebildet wurde, da gute Löslichkeit durch Vorhandensein des Dendrons gegeben sein sollte. Vielmehr könnte sich durch die Mehrzähigkeit des Dendrons **4** ein stabiler Kupferkomplex gebildet haben. Die hohe Affinität von Aminen zu Kupfer-Ionen ist bekannt. Dazu stehen am Dendron drei Amin-Funktionen mit freien Elektronenpaaren zur Verfügung, welche einen Chelat-Komplex bilden könnten. Die bevorzugte Koordinationszahl sechs würde bei zwei Dendronen pro Kupfer-Ion eingehalten werden.

Die Reaktionsführung ohne Kupferkatalysator war ebenso nicht erfolgreich. Durch Dünnschichtchromatographie (DC) konnte auch nach 24 Stunden kaum ein Umsatz festgestellt werden; das UV-aktive Produkt wurde nur durch einen sehr schwachen Spot auf der DC detektiert. Im Vergleich zu den hohen Umsätzen zu Produkt **39** ist die Intensität des Produkts aus der kupferfreien Reaktion als sehr gering zu bezeichnen.

Für eine Unterdrückung der vermuteten Komplexbildung müssen zunächst die freien Amine der ganzzahligen Dendron-Generationen mit Schutzgruppenfunktionen versehen werden. Die Einführung der Boc-Schutzgruppe gelingt hier in guten Ausbeuten und konnte

bisher für die Generationen 1,0 und 2,0 mit einer Säulen-Chromatographie als Reinigungsschritt angewendet werden. Lediglich bei G3,0 treten Probleme bei der Chromatographie auf. Die Synthese der dritten Generation wurde dann auf der Ethinyl-Dendron-Route durch Sonogashira-Kupplung versucht, was später in diesem Kapitel diskutiert wird.

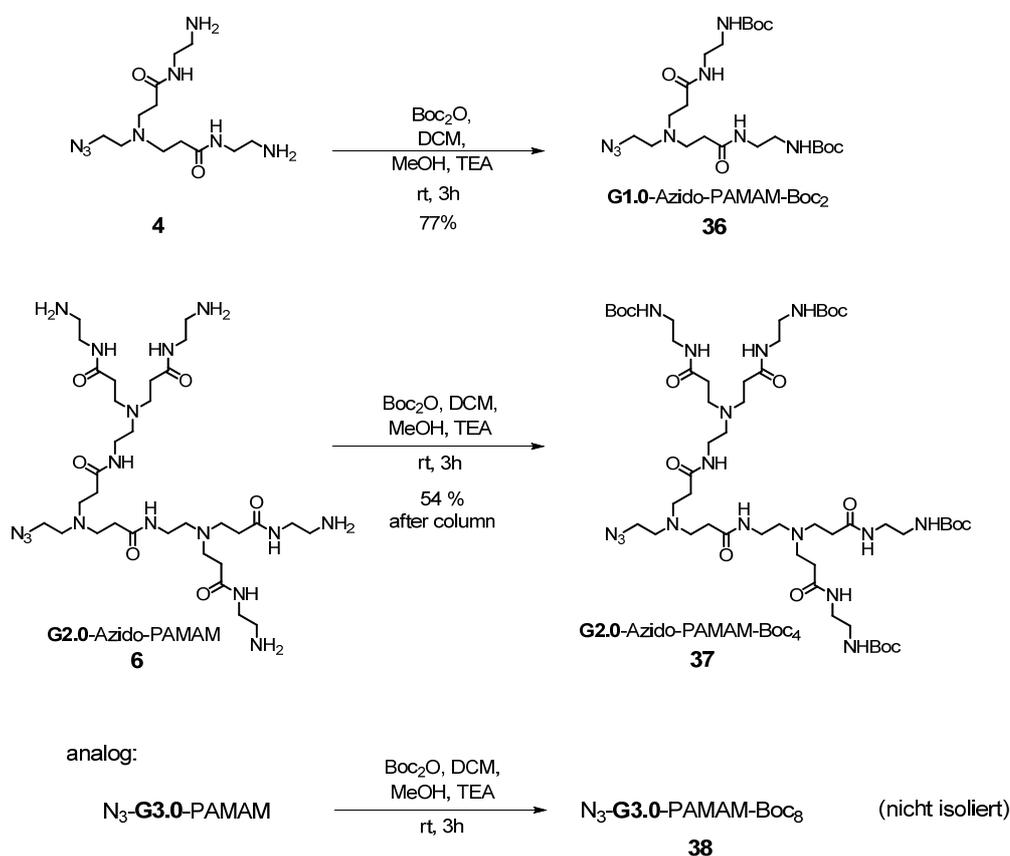


Abb. 50: Einführung der Boc-Schutzgruppen an den Dendronen G1 bis G3

Nach gelungener Einführung der Schutzgruppen konnte die Click-Reaktion unter milden Bedingungen durchgeführt werden. Es wurde eine neuere Variante des Kupfer-Katalysators verwendet, welche verbesserte Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln hat und direkt Kupfer(I) zur Verfügung stellt, ohne es erst *in situ* erzeugen zu müssen^[122]. Zunächst wurden alle Komponenten außer dem Kupfer-Katalysator zur Reaktion gebracht. Durch DC-Kontrolle der katalysatorfreien Lösung konnte nach 20 Stunden nur ein minimaler Umsatz festgestellt werden. Nach Zugabe von 3mol% Cu(MeCN)₆PF₆ und 2,6-Lutidin als Ligand konnte innerhalb von zwei Stunden fast vollständiger Umsatz beobachtet werden. Nach einem Chromatographie-Schritt und der einfachen Entfernung der Schutzgruppen mittels TFA/DCM=1:1 konnte eine Ausbeute von 88% mit G1.0 (41) und 56% mit G2.0 (42) erreicht werden.

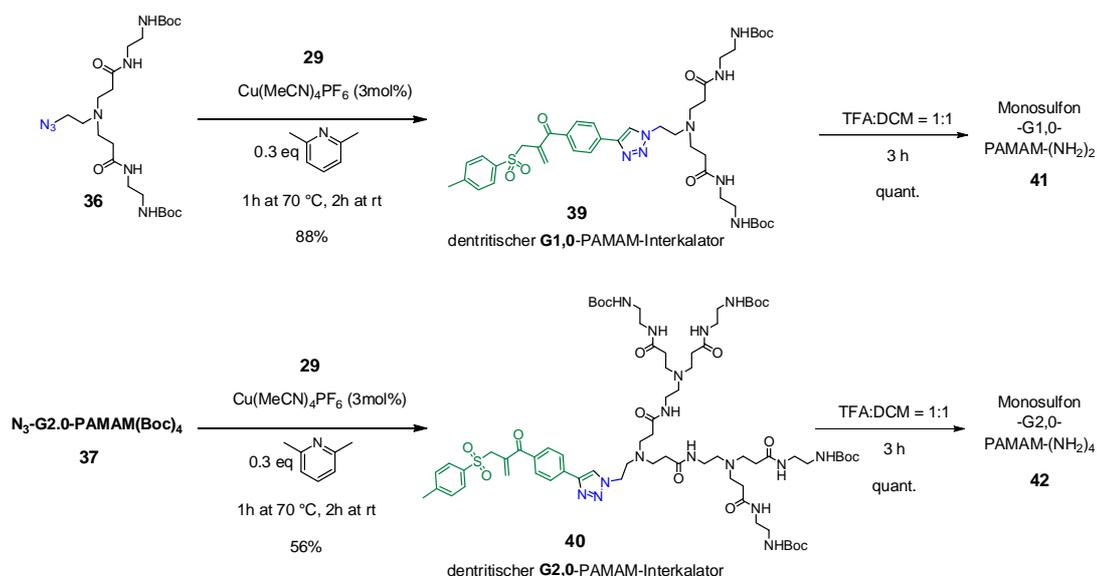


Abb. 51: Click-Reaktion zwischen Linker und Dendron

Bei der Reinigung der Linker-Dendron-Konjugate **39** und **40** kann Säulenchromatographie mit Silika-Gel angewendet werden. Durch Zugabe einer kleinen Menge von EDTA auf die Silika-bepackte Säule kann das Kupfer (als freies Salz oder Komplex, Cu(I) oder Cu(II)) mit einem sehr geringen R_f -Wert zurückgehalten werden. Das Click-Produkt **39** konnte durch MALDI-TOF-MS, FD-MS, hochaufgelöstes ESI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR und FT-IR-Spektroskopie charakterisiert werden. Das Verschwinden der Azid-Bande im IR-Spektrum korreliert mit dem Verlauf der Click-Reaktion zum aromatischen Triazol. Auch im NMR kann das tieffeldverschobene Protonensignal des aromatischen Triazols detektiert werden (s. Abb. 52).

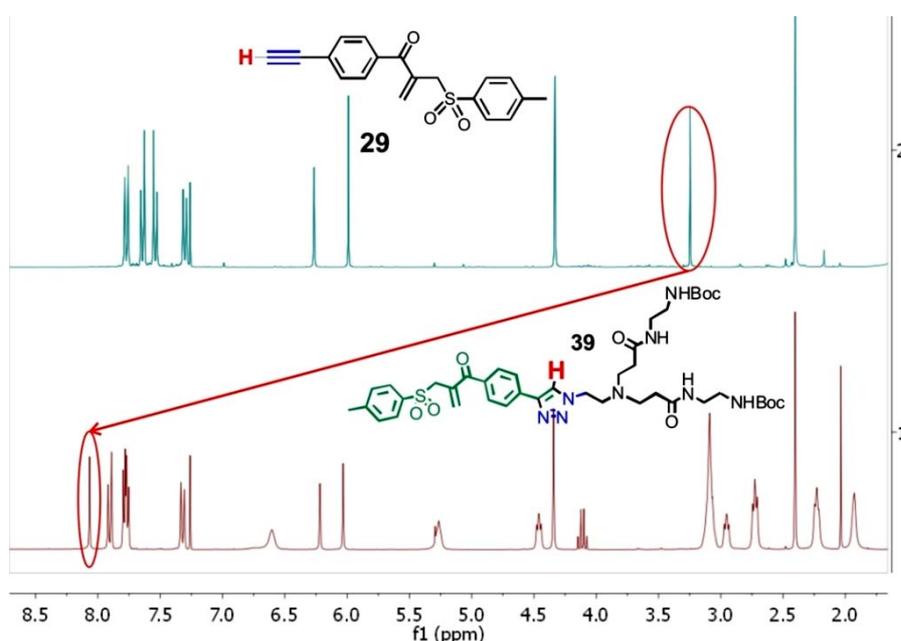


Abb. 52: NMR-shift des Acetylen-H zum aromatischen Triazol-H

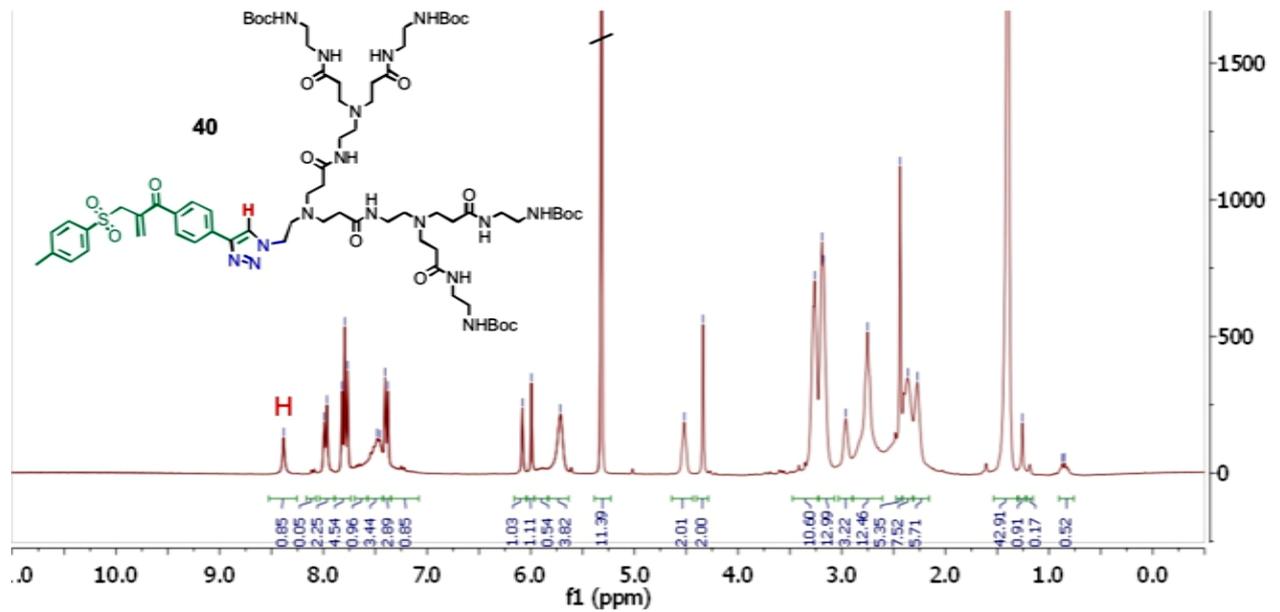
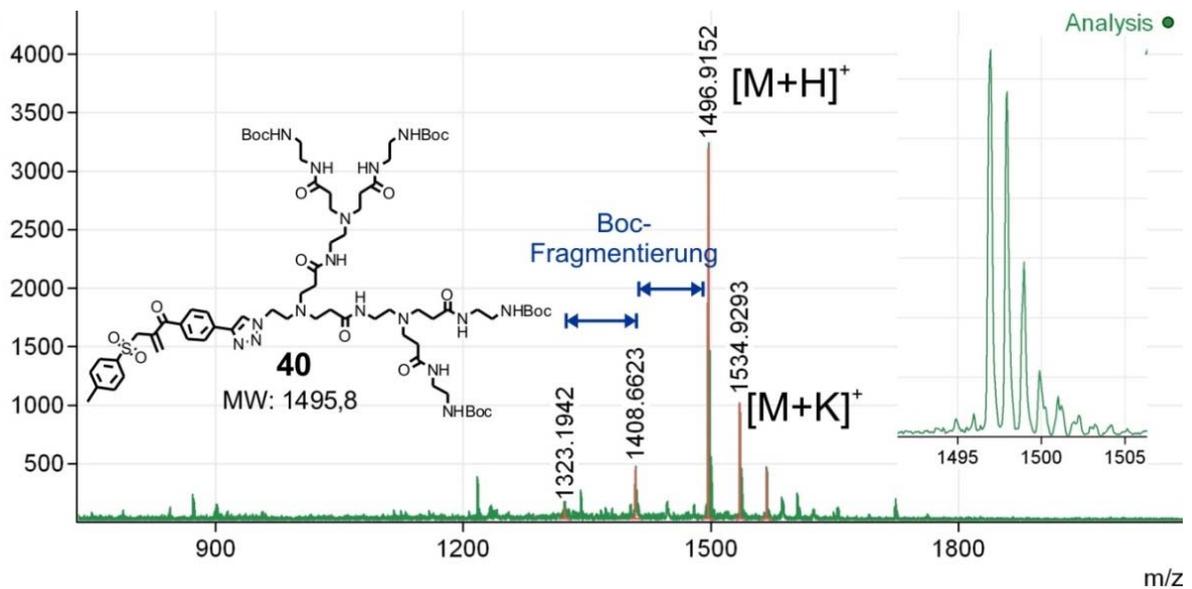
Abb. 53: $^1\text{H-NMR}$ des dendritischen Interkalators 40

Abb. 54: MALDI-TOF-Massenspektrum des G2 dendritischen Interkalators 40 mit Boc-Gruppen

3.3.2 Der Sonogashira-Ansatz

Als Weiterentwicklung der Stephens-Castro-Kupplung wurde im Jahr 1975 die palladiumkatalysierte Variante als Sonogashira-Kupplung vorgestellt ^[121].

Die Ethinyl-Dendrone **16**, **17** und **18** sollen als Alkin-Komponente mit dem Iod-Interkalator **28** gekuppelt werden. Dazu ist zunächst ein mechanistisches Verständnis des Reaktionsablaufes notwendig, um die richtigen Bedingungen für die Dendron-Kupplung wählen zu können. In einem ersten katalytischen Schritt bildet das Cu(I) einen *side-on*-Komplex (**E**) und später einen *end-on*-Komplex (**F**, in Abb. 55). Das Acetylen wird dann auf den aktiven Pd-Komplex übertragen, mit der Triebkraft der Bildung von CuI. Es folgt die *cis*-Anordnung (**C**→**D**) des Acetylens und des Kopplungspartners (**R**). Diese Umordnung am Palladium ist sterisch sehr anspruchsvoll und wird durch große Reste **R'** erschwert.

Dies ist der Grund für eine schlechte Kinetik mit sterischen Kopplungsreagenzien, welche sich nur träge in *cis*-Konformation anordnen können. Die reduktive Eliminierung (**D**→**A**) kann ausschließlich in *cis*-Stellung unter Ausbildung der C-C-Bindung erfolgen. Durch den großen Tolman-Kegelwinkel der Triphenylphosphin-Liganden wird die Eliminierung beschleunigt, besonders bei großen Resten **R'** und **R**.

Werden die Ethinyl-Dendrone als Acetylen-Komponente in der Sonogashira-Reaktion eingesetzt, so liegt mit steigender Dendron-Generation ein sterisch-anspruchsvollerer Rest **R'** vor. Für G3,0 ist daher mit schlechten Ausbeuten zu rechnen, da der Mechanismus im Schritt **C**→**D** träge abläuft, allerdings schnell reaktiv eliminiert wird (**D**→**A**).

Werden die amino-terminierten Ethinyl-Dendrone-(NH₂)_x als Acetylen-Komponente in der Sonogashira-Reaktion eingesetzt, kann wegen der freien Amine wahrscheinlich eine ähnliche Nebenreaktion wie bei der Click-Reaktion mit CuSO₄ ablaufen (siehe Abb. 49).

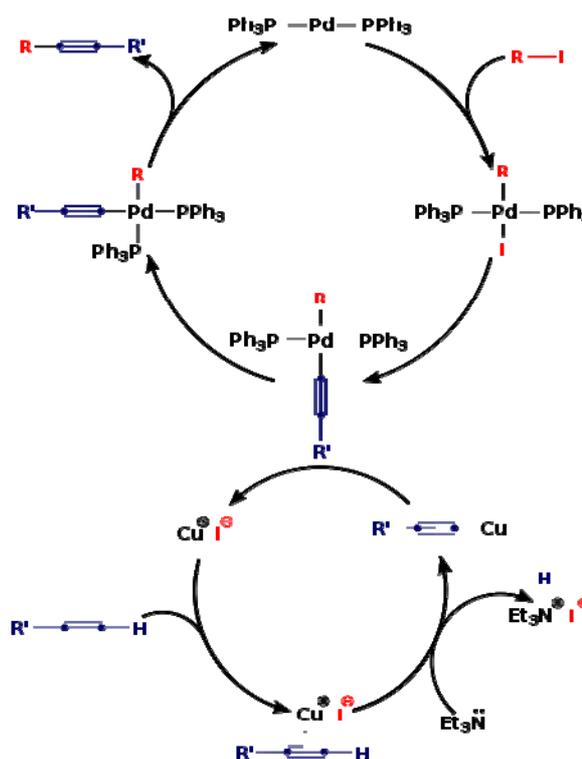


Abb. 55: Mechanismus der Sonogashira-Kupplung

Das Dendron bildet vermutlich mit den freien Aminen einen stabilen Kupfer-Komplex und fällt als Niederschlag aus. Um dies zu verhindern werden auch die Ethinyl-Dendrone **16-18** vor der kupferhaltigen Kupplung mit Boc-Schutzgruppen versehen. Die Umsetzung mit Boc-Anhydrid erfolgt in guten Ausbeuten. Jedoch ist eine chromatographische Reinigung der G1,0- und G2,0-Dendrone(Boc)_x nötig um überschüssiges Boc₂O zu entfernen. Dies kann bei G1,0 und G2,0 nicht durch basisches Auswaschen durchgeführt werden, da die Dendrone zu polar sind und die organische Phase verlassen könnten. Da das G3,0-Dendron(Boc)₈ genügend unpolare Schutzgruppen in der Peripherie trägt, wurde das Auswaschen des Boc₂O bei der Reaktion zum Ethinyl-G3,0-PAMAM-(Boc)₈ versucht und gelang mit gutem Erfolg.

- Ethinyl-G1,0-PAMAM-Boc₂ (**43**): 123 mg (72%, nach Chromatographie)
- Ethinyl-G2,0-PAMAM-Boc₄ (**44**): 216 mg (50%, nach Chromatographie)
- Ethinyl-G3,0-PAMAM-Boc₈ (**45**): 170 mg (nahezu quant. durch Auswaschen).

Die erhaltenen Dendrone sind gut löslich in Methanol, Dichlormethan und *N,N*-Dimethylformamid, jedoch schlecht löslich in Wasser und Acetonitril. Die Charakterisierung erfolgte durch NMR- und Massenspektroskopie. Die NMR-Daten zeigen die Anwesenheit der Boc-Schutzgruppen mit einem intensiven Singulett bei 1,40 ppm. Die Verhältnisse der Integrale passen für jedes Dendron im Rahmen des Fehlers gut mit der Theorie überein. Das MALDI-TOF-Spektrum (Abb. 56) zeigt das Produkt-Signal bei 2454 g/mol und eine exponentiell-abfallende Signalfolge mit durchschnittlich 88 g/mol Differenz zueinander. Zunächst können darin Defekte des Dendron-Gerüsts vermutet werden. Jedoch entsprechen die Differenzen nicht einer unvollständigen Boc-Schutzung. Der Abbau oder das Fehlen von ein bis acht Boc-Schutzgruppen würde jeweils einen Unterschied von 100,1 g/mol ergeben (siehe rechts in Abb. 56). Der exponentielle Verlauf deutet auf eine Fragmentierung während der MALDI-TOF-Messung hin. Es wurde eine saure Matrix (Sinapinsäure) verwendet, welche die Laser-induzierte Fragmentierung der Boc-Schutzgruppen herbeiführt. Bei Beschuss mit geringerer Laserleistung konnte abnehmende Fragmentierung im Verhältnis zum Produktsignal beobachtet werden. Dieses Phänomen wurde bei allen Dendronen und Derivaten mit Boc-Schutzgruppe beobachtet; bei den synthetisierten Molekülen ohne Boc-Gruppe konnte in keinem Fall eine ähnliche Fragmentierung oder die Anwesenheit von Defekten in den Dendronen festgestellt werden.

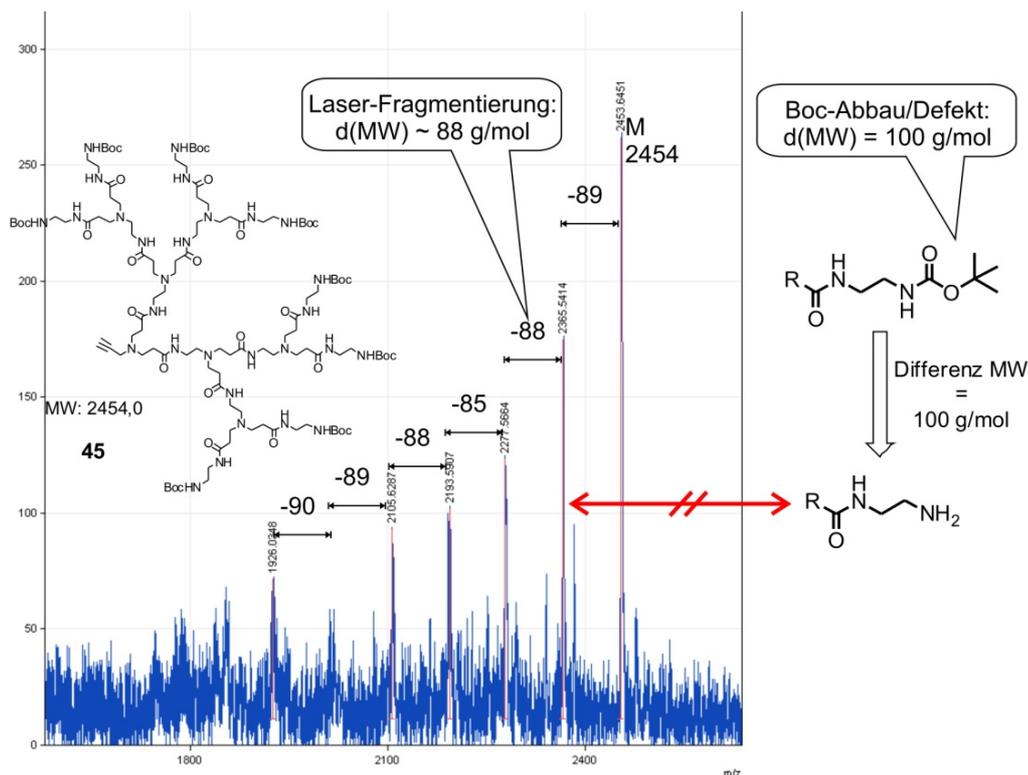


Abb. 56: MALDI-TOF-Massenspektrum des Ethynyl-G3,0-PAMAM-Dendrons 45 mit Boc-Fragmentierung

Die Kopplungsreaktion der ersten Generation des Ethynyl-Dendrons mit dem Iod-Monosulfon gelingt in guten Ausbeuten (Abb. 57). Der Farbumschlag für den aktive Palladiumkatalysator-Komplex konnte schon nach 25 Minuten Reaktionszeit beobachtet werden. Zusätzlich lässt sich nach wenigen Stunden schon kein unfunktionalisiertes Dendron mehr detektieren. Dies war gemäß dem beschriebenen Reaktionsmechanismus wegen der kleinen Größe des G1,0-Dendrons zu erwarten.

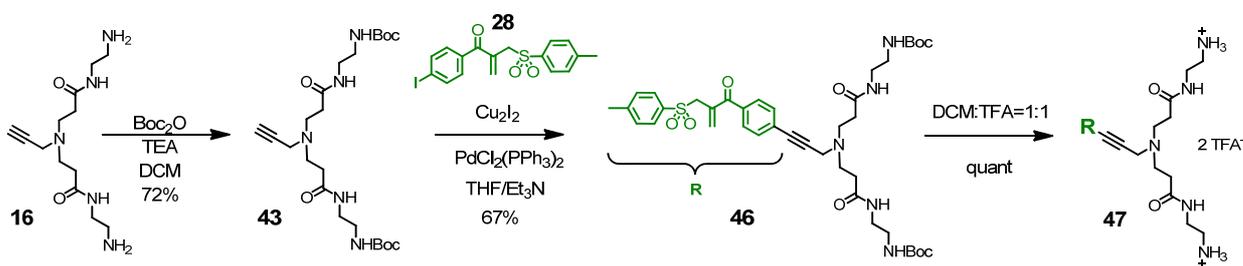


Abb. 57: Sonogashira-Kopplung nach Boc-Schützung am Beispiel des G1-PAMAM

Nach chromatographischer Trennung und Entfernung der Kupferionen (siehe unten), konnte das Sonogashira-Produkt **46** durch FD-Massenspektroskopie mit einem Signal bei 738 m/z nachgewiesen werden (s. Abb. 58). Das berechnete Isotopenmuster konnte durch

hochaufgelöste ESI-Massenspektroskopie wiedergegeben werden und liefert zusammen mit den ^1H -, ^{13}C - und IR-Spektren den Strukturbeweis.

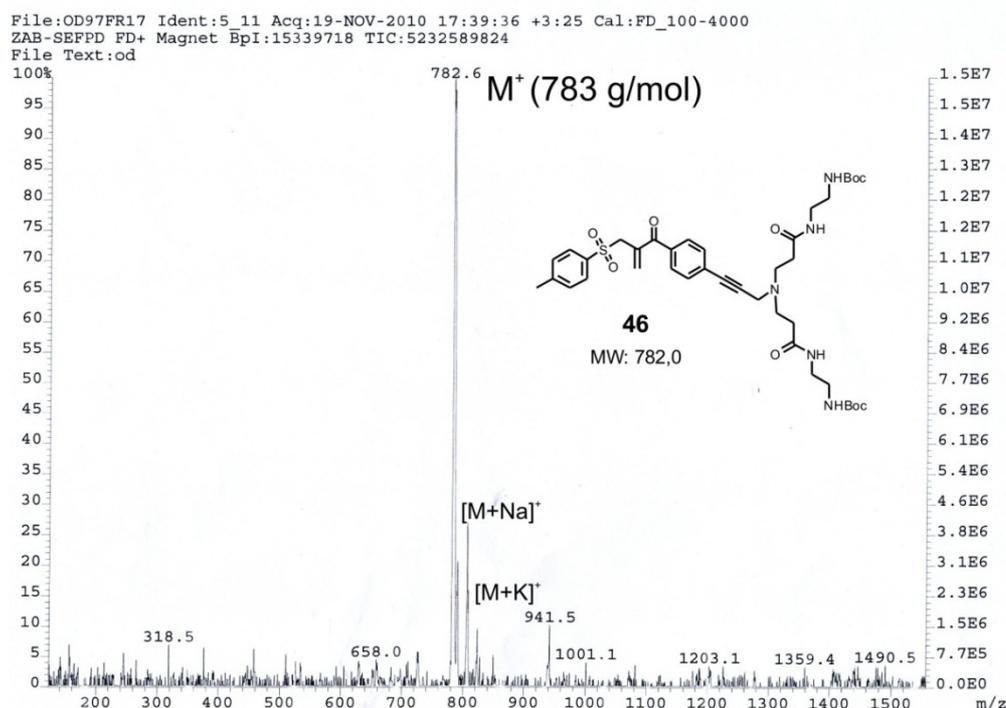


Abb. 58: FD-MS des G1,0-dendritischen Interkalators mit Boc-Gruppen (**46**)

Ähnlich wie bei der Huisgen-Cycloaddition (Kap. 3.3.1) müssen nach der Kreuzkupplung toxische Metallreste entfernt werden. Hierzu wurde eine kleine Menge EDTA auf die Säule gegeben, welches das restliche Kupfer in einem stabilen Komplex festhält damit dieses nun mit einem geringen R_f -Wert nicht von der Säule gewaschen wird. Die Prüfung auf die Anwesenheit restlicher Kupfer-Ionen in der Probe wurde jedoch vorgenommen.

Für die zweite Generation wurde das Sonogashira-Konzept nicht angewendet, da bereits ein Monosulfon-G2,0-triazolyl-PAMAM **40** aus der Click-Reaktion (s. Abschnitt 3.2.1) vorliegt.

Die sterisch anspruchsvolle Sonogashira-Reaktion am Ethinyl-G3,0-PAMAM-Dendron- (Boc_8) **45** wurde unter gleichen Bedingungen wie die G1,0-Kupplung, jedoch mit dreifachem Überschuss an Iod-monosulfon **28** durchgeführt. Der erwartete Farbumschlag für den aktiven Palladium-Komplex wurde allerdings erst nach ca. 18 Stunden Reaktionszeit beobachtet, was durch die träge G3,0-Alkin-Komponente erklärbar ist, welche sich sehr langsam vom Kupfer- auf den Palladiumkatalysator überträgt. Die großen Reste am terminalen Acetylen sorgen für eine gehemmte Kinetik und erfordern daher längere Reaktionszeiten. Nach 28 Stunden wurde die Reaktion durch wässrige

Aufarbeitung beendet und ohne chromatographische Trennung ein MALDI-TOF-Massenspektrum gemessen. Es zeigt sich, dass kein unfunktionisiertes Ethinyl-G3,0-Dendron **45** (MW = 2454 g/mol) in der Lösung detektiert werden kann und vermutlich vollständiger Umsatz erreicht wurde. Das Monosulfon-G3,0-Dendron **48** ergibt nur als Kupfersalz ein Signal bei 2822 m/z in der Massenanalyse (Abb. 59). Damit liegt eine Differenz von 6 m/z zur berechneten Masse von $[M+Cu]^+$ vor. Das Isotopenmuster ist gut erkennbar und die erwartete Fragmentierung der Boc-Schutzgruppen kann mit einer Signalfolge von ca. -88 m/z ab einer Masse von 2822 m/z beobachtet werden.

Ein weiteres Signal tritt bei $m/z = 3049$ auf und kann mit keiner Salzbildung erklärt werden. Dieses Nebenprodukt wurde nicht weiter untersucht, da keine Abtrennung der Nebenprodukte erfolgte. Versuche zur chromatographischen Aufreinigung auf Kieselgel bleiben erfolglos, da das erhaltene Dendron einen sehr geringen R_f -Wert mit allen getesteten Lösungsmittel-Systemen aufweist. Es konnte keine Isolierung im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden um weitere Charakterisierungen durchzuführen, jedoch ist eine Auftrennung durch die HPLC-Methodik aussichtsreich. Dies soll zukünftig für die Bereitstellung eines kupferfreien G3,0-Dendrons zur Peptidfunktionalisierung weiter bearbeitet werden.

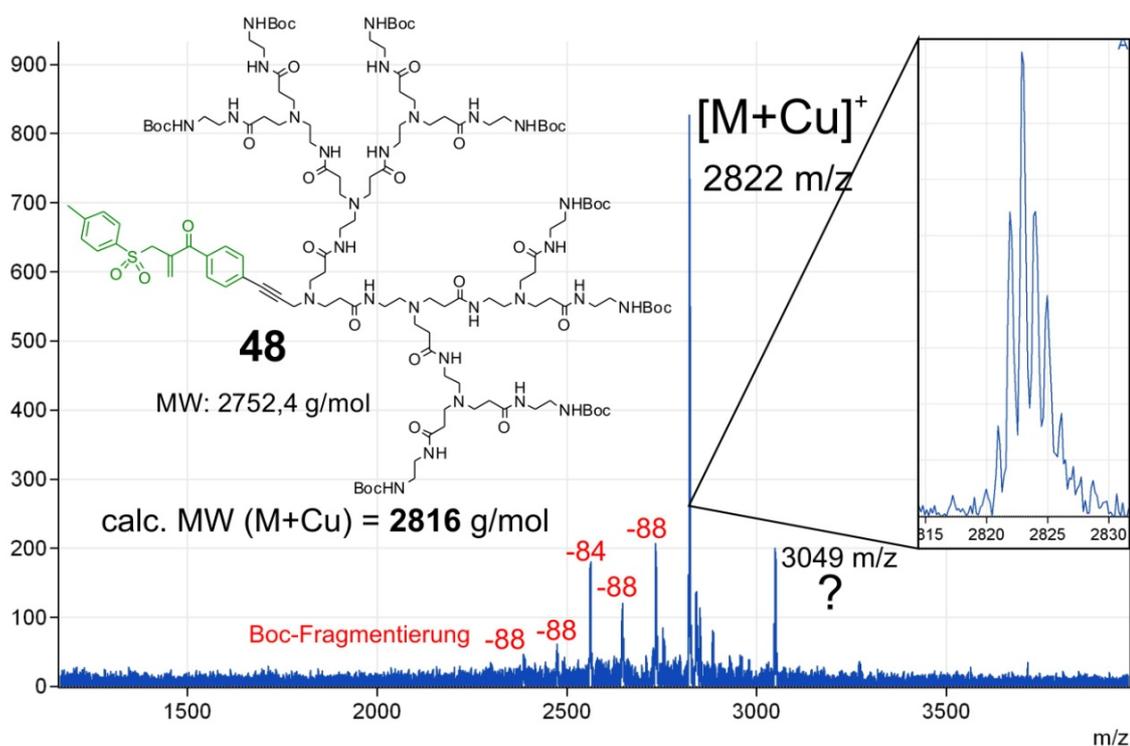


Abb. 59: MALDI-TOF-MS des G3,0- dendritischen Linkers mit Boc-Schutzgruppen

3.4 Darstellung der dendronisierten Peptide

Nach Bereitstellung der Azido- und Ethinyl-Dendrone sowie der dendritischen Linker wurde die Dendronisierung des Somatostatin-Peptids versucht. Dies kann prinzipiell auf zwei Wegen erfolgen (s. Abb. 20 in Kapitel 1.2.2). Als „grafting from“ bezeichnet man den stufenweisen Aufbau ausgehend vom Peptid und als „grafting onto“ die direkte Modifikation des nativen Peptids mit einem bereits stufenweise aufgebauten Dendron. Das Peptid steht in nativer Form kommerziell zur Verfügung.

In der vorliegenden Zielsetzung soll für die Reihenfolge des Aufbaus nur zwischen den drei Bausteinen *Dendron*, *Linker* und *Peptid* unterschieden werden. Dabei wurden Dendron und Linker, wie zuvor beschrieben, zunächst in einer divergenten Route einzeln synthetisiert und abschließenden (je nach Ansatz-Prinzip grafting from/onto) in einer festgelegten Reihenfolge zusammengeführt.

Die Modifikation am Somatostatin-Peptid kann mit den bereits vorgestellten Linker-Molekülen der allgemeinen Struktur **25** erfolgen (s. Abb. 45 und Abb. 47). Hierbei wird die Disulfidbrücke des Somatostatins mit einem Additions-Eliminierungs-Mechanismus (s. Abb. 19, Kap 1.2.2) hochspezifisch adressiert.

3.4.1 „Grafting from“-Ansatz für Somatostatin

In diesem Ansatz wird zunächst das Peptid spezifisch auf die Dendronisierung vorbereitet indem man eine Disulfid-Funktionalisierung vornimmt und mithilfe der HPLC-Technik aufreinigt. Das Peptid trägt dann eine bioorthogonale Funktion, welche gezielt durch die Dendrone adressiert werden kann. Es muss eine letzte Reinigung der Endstufe erfolgen, da man bei der Peptid-Modifikation stets mit Überschuss an Reagenzien arbeitet. Der große Nachteil dieser Methode liegt in den zwei Aufreinigungsschritten des Peptids, welches eine geringe chemische Stabilität besitzt und teuer ist. Weiterhin ist die Isolierung von polaren biologischen Materialien in Wasser oft aufwändig und fordert große Sorgfalt, sodass ein einziger Reaktionsschritt am Peptid wünschenswert wäre.

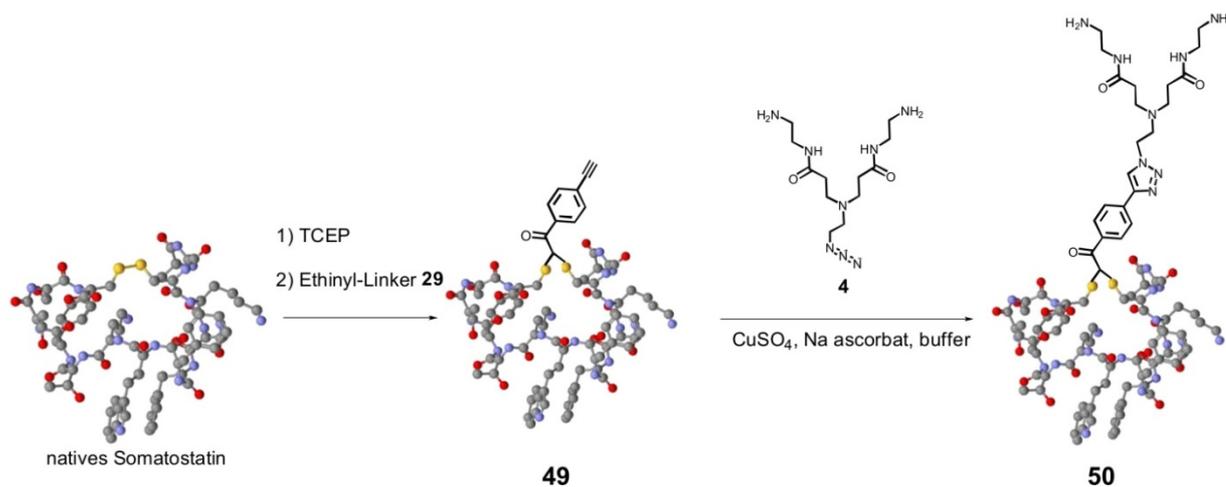


Abb. 60: "Grafting from" Dendronisierung des Somatostatins

Es soll mit dem vorliegenden Experiment nur das Prinzip des „grafting from“-Ansatzes gezeigt werden. Dazu wurde in einer engen Kooperation mit Anne Pfisterer die Experimente geplant. A. Pfisterer führte hierzu die Herstellung und Aufreinigung des Ethinyl-modifizierten Somatostatins **49** durch ^[111, 112], dessen Synthese Teil ihrer Doktorarbeit ist und somit hier nicht im Detail geschildert werden soll. Um das Prinzip der zweistufigen Modifikation des Somatostatins zu prüfen wurde lediglich ein Experiment zur Dendronisierung mit dem Azido-G1,0-PAMAM **4** durchgeführt. Wegen der geringen Verfügbarkeit des Ethinyl-Somatostatins **49** konnte die Click-Reaktion nur im analytischen Maßstab demonstriert werden. Hierzu wurde das Dendron **4** und Ethinyl-Somatostatin in PBS-Puffer (pH 6,2, 0,05 M) mit katalytischen Mengen CuSO₄ und Natriumascorbat für 20 Stunden inkubiert. Die Charakterisierung erfolgte mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie und konnte zeigen, dass eine erfolgreiche Umsetzung zum G1,0-dendronisierten Peptid **50** erreicht wurde. Jedoch wurde auch freies Ethinyl-Somatostatin detektiert. Es erfolgte keine Aufreinigung, da nur das Prinzip vorgestellt werden sollte.

3.4.2 „Grafting onto“-Ansatz für Somatostatin

Für die „grafting onto“-Dendronisierung kann das native Somatostatin direkt eingesetzt werden und in einer zweistufigen Eintopf-Reaktion mit dem Dendron gekuppelt werden. (s. Abb. 61). Im ersten Schritt wird die Disulfidbrücke des zyklischen Somatostatins durch Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) unter Bildung von zwei Sulfid-Gruppen reduziert ^[124], welche dann nach dem Additions-Eliminierungsmechanismus ^[87] (s. Abb. 19) die

Interkalation des Dendrons ermöglichen. Dies ist besonders herausfordernd wegen der großen sterischen Abschirmung des Linkers durch das angehängte Dendron.

Die Reaktion wird wegen der verbesserten Löslichkeit in 40% Acetonitril/PBS-Puffer (0,05 M) durchgeführt. Brocchini *et al.* [87] berichten von optimierten Bedingungen beim Einsatz dieses Puffers. Das organische Lösungsmittel verhindert zusätzlich die Aggregatbildung; alternativ zu Acetonitril kann auch *N,N*-Dimethylformamid verwendet werden, was ebenfalls bei 40%igen Anteil die besten Umsetzungen liefert [111, 112].

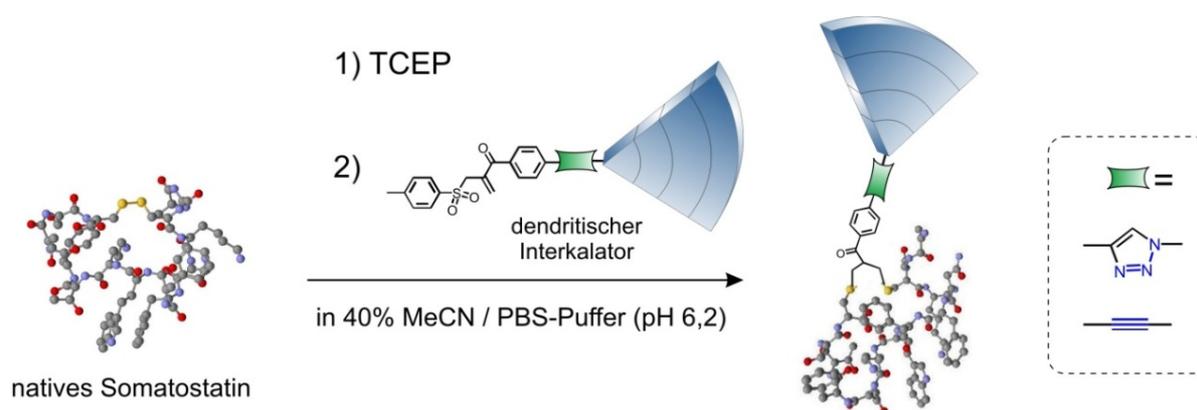


Abb. 61: "Grafting onto"-Dendronisierung des nativen Somatostatins

Dendronisierung mit Gn.0-PAMAM-(NH₂)_x, (n = 1, 2)

Es wurde Somatostatin (1eq.) mit TCEP (2eq.) und der doppelte Überschuss von jeweils G1,0- und G2,0-Dendron angesetzt (Ansatzgröße: ca. 10 mg). Für die G1,0-Dendronisierung wurde das Amino-terminierte Dendron **47**, welches durch Sonogashira-Kupplung hergestellt wurde, verwendet. Die G2,0-Dendronisierung erfolgte mit dem Triazol-Produkt **42** des PAMAM-Dendrons.

Die Reaktionslösung wurde zunächst für 24h nur in PBS-Puffer (pH 6.2) inkubiert und dann mit 40% Acetonitril verdünnt. Für die Reaktionskontrolle wurden MALDI-TOF-Massenspektren aufgenommen. Nach zwei Tagen Reaktionszeit konnte ein Produktsignal detektiert werden, wobei unreaktiertes Somatostatin deutlich als Edukt zurückbleibt. Vermutlich wird durch die Dendronisierung der Übertritt des Produktes in die Gasphase oder seine Flugeigenschaft verringert, wodurch die Signal-Verhältnisse nicht als quantitativ betrachtet werden dürfen.

In Abb. 62 und Abb. 63 sind die MALDI-TOF-Massenspektren der Reaktionslösung der G1,0- und G2,0-Dendronisierung (**51** und **52**) gezeigt. Das größte Signal entspricht jeweils dem unfunktionalisierten Somatostatin, welches nicht reagiert hatte. Durch die Zugabe von

zwei Equivalenten TCEP stellt der vorliegende Massenpeak wahrscheinlich eine lineare, reduzierte Form des Somatostatins an. Es ist bekannt, dass im gegebenen Medium die TCEP-Reduktion innerhalb weniger Stunden vollständig abläuft^[90]. Im Verhältnis zum nativen Peptid-Signal ist die Höhe des Signals für das dendronisierte Peptid sehr klein; es liegt gerade über der Detektionsgrenze. Dies kann hauptsächlich zwei Gründe haben:

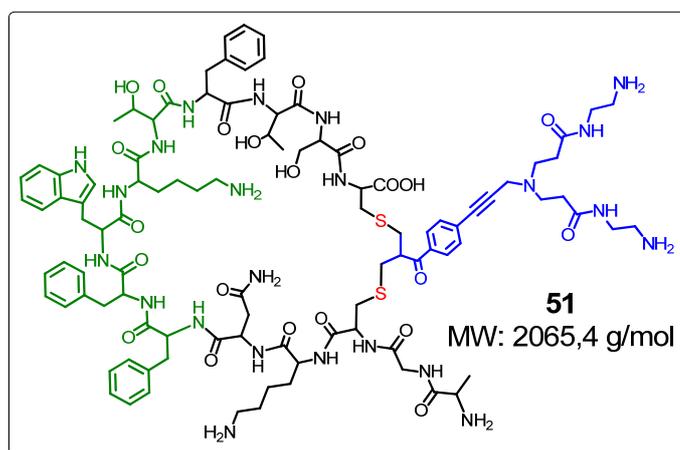
- 1) Schlechte Flugeigenschaften oder nur begrenzter Übertritt in die Gasphase des PAMAM-dendronisierten Peptids im MALDI-TOF-MS. Dafür spricht auch, dass das reine Dendron nicht im Spektrum als Verunreinigung zu sehen ist, weil es schlechte Flugeigenschaften als freies Amin hat.
- 2) Sehr geringer Umsatz zum dendronisierten Produkt. Dieser Punkt soll nachfolgend ausführlicher diskutiert werden, da durch eine Optimierung der Reaktionsbedingungen höhere Ausbeuten erzielt werden könnten.

Ein großer Nachteil bei der Arbeit mit Somatostatin umfasst dessen schlechte Löslichkeit und die Ausbildung von Aggregaten. Es ist bekannt, dass natives Somatostatin nanometergroße Fibrillen bildet, welche unlöslich sind^[110]. Bei hoher Ionenstärke kann dies bevorzugt eintreten. Daher wurden optimierte Konzentrationen des Peptids von 0,100 bis 0,250 mg/mL und ein optimierter Puffer mit dem Zusatz von organischem Lösungsmittel eingesetzt. Bei jedem Versuch der Dendronisierung ließ sich trotzdem schon nach wenigen Minuten ein Niederschlag erkennen. Dieser wurde nicht untersucht, sondern es wurden immer nur Proben aus der Lösung genommen. Für die spätere Aufreinigung mit der HPLC-Methode (siehe unten) wurde der Niederschlag vor der Chromatographie abzentrifugiert. Gerade PAMAM-dendronisiertes Somatostatin sollte aber besser löslich sein, da zusätzliche Aminogruppen bei einem pH-Wert von 6,2 protoniert vorliegen und somit die Wasserlöslichkeit erhöhen. Es ist dennoch bekannt, dass dendronisierte Materialien zur Ausbildung von Überstrukturen neigen^[108, 109], wenn eine amphiphile Struktur vorliegt. Im Falle des dendronisierten Somatostatins kann die Struktur nur bedingt als Amphiphil angesehen werden. Die grüne (pharmakophore) Schleife (s. Abb. 62 und Abb. 63) kann als weniger polar als das ionische Dendron mit Carboxylgruppen und Aminen in direkter Nachbarschaft bezeichnet werden. Das könnte zur Überstruktur-Bildung und dadurch zu einem unlöslichen dendronisierten Produkt führen.

Für schlechte Reaktionsausbeuten können ebenso sterische wie elektrostatische Gründe in Betracht kommen. Da das G1,0-Dendron jedoch keine große Abschirmung auf den

angehängten Interkalator ausübt, wird davon ausgegangen, dass bei so kleinen Generationen keine sterischen Probleme auftreten sollten. Bei den Versuchen der G2,0-Dendronisierung (**52**) konnte kein Unterschied zum G1,0-dendronisierten Somatostatin **51** in der Intensität der MALDI-TOF-MS-Peaks festgestellt werden. Daher ist dieser Aspekt für die Generationen G1 und G2 höchstwahrscheinlich von untergeordneter Bedeutung.

Aus elektrostatischer Sicht, könnte das positiv-geladene Dendron eine Annäherung an das native Somatostatin verhindern, welches ebenfalls durch zwei lange Lysin-Seitenketten und den N-Terminus positiv geladen vorliegt. Vermutungen dieser Art könnten im Ansatz überprüft werden, indem das Boc-geschützte Dendron zum Einsatz kommt. Dies führt wegen der großen *tert.*-Butylgruppen auch zu einem zusätzlichem sterischen Anspruch der Interkalation, was den Effekt der räumlichen Abschirmung weiter untersuchen lässt. Versuche mit dem G2,0-Dendron-Boc₄ werden weiter unten beschrieben.



G1,0-PAMAM-dendronisiertes Somatostatin

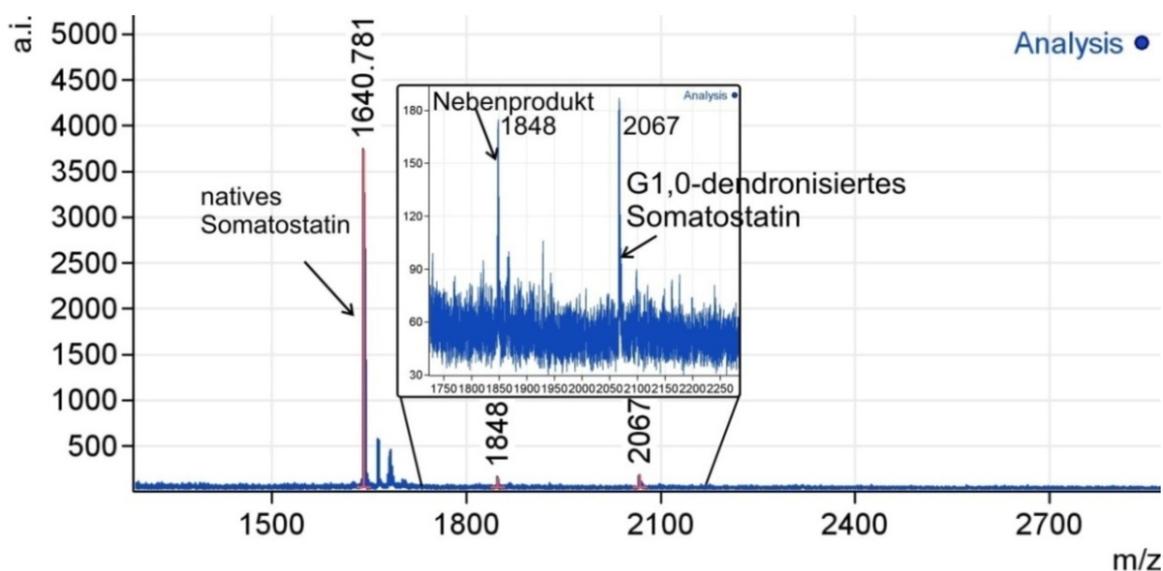
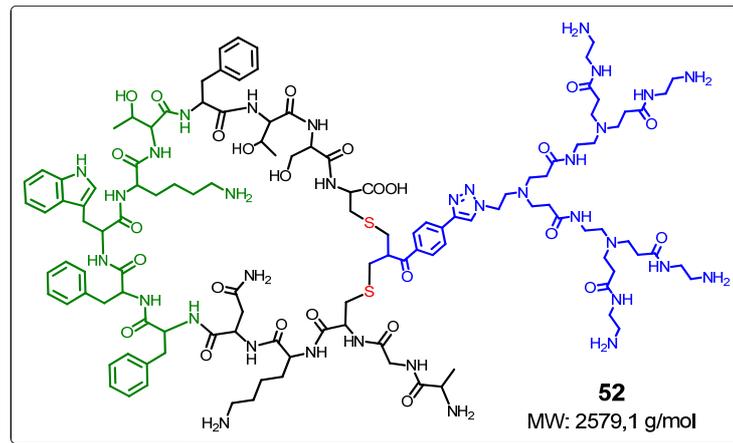


Abb. 62: MALDI-TOF-MS der Reaktionslösung des G1-dendronisierten Somatostatins

Ein weiteres Nebenprodukt der Masse 1845 g/mol tritt in beiden Fällen (G1- und G2-Dendronisierung) auf, dessen Struktur nicht identifiziert werden konnte. Es scheint sich unabhängig vom eingesetzten Dendron aus dem nativen Somatostatin unter den gegebenen Reaktionsbedingungen zu bilden. Durch die Reduktion der Disulfid-Brücke zum Sulfid entsteht eine reaktive Spezies, welche leicht Reaktionen zu Nebenprodukten eingehen könnte.



G2,0-PAMAM-dendronisiertes Somatostatin

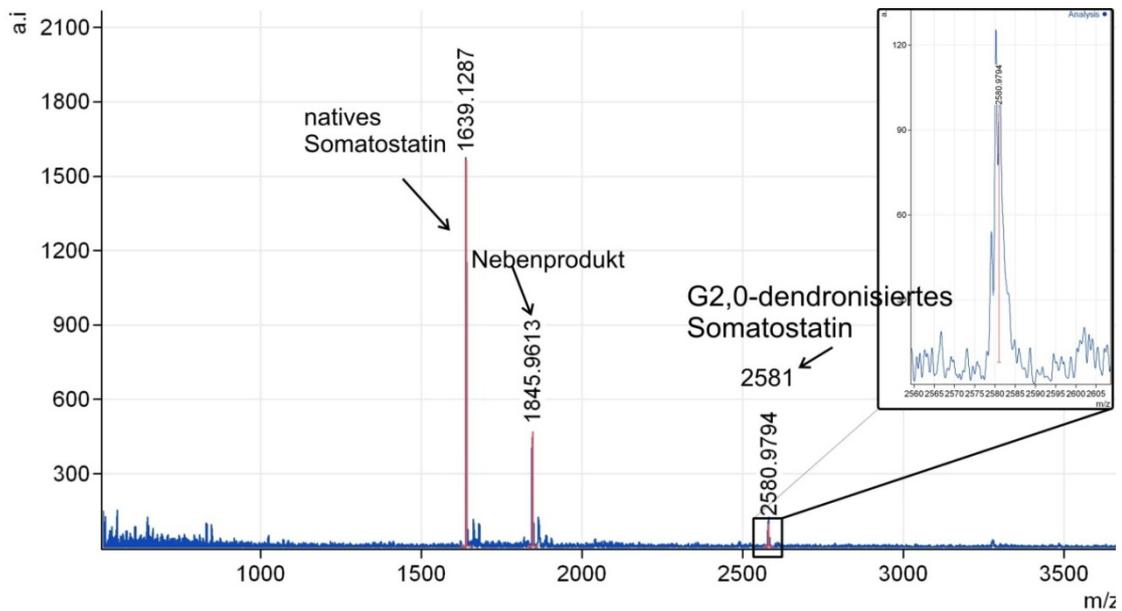


Abb. 63: MALDI-TOF-MS der Reaktionslösung des G2-dendronisierten Somatostatins

Aufreinigung des dendronisierten Somatostatins

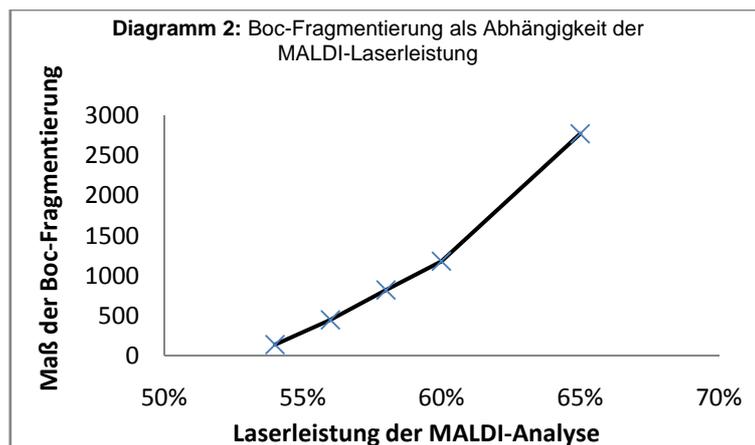
Generell stellt die Aufreinigung biologischer Stoffe wie Peptide und Proteine eine große Herausforderung dar. Im vorliegenden Fall muss die geringe Ausbeute der Reaktion zusätzlich bedacht werden, da die große Verunreinigung durch das native Somatostatin in der Reaktionslösung Aufreinigungsprobleme mit sich bringt. Die Abtrennung der sehr

Es wird vermutet, dass der Umsatz der Reaktion zu gering ist um eine detektierbare Menge dendronisiertes Somatostatin zu erhalten. Die Detektion der HPLC-Fractionen erfolgte mit einem präparativen UV-Detektor, welcher eine bestimmte Konzentration eines Chromophors benötigt um einen deutlichen Peak anzuzeigen. Die hergestellten Dendrone tragen allerdings nur einen einzigen Aromaten, welcher einen geringen Anteil am Gesamt-Molekülgerüst ausmacht. Vermutlich konnte aus diesem Grund keine Detektion der HPLC-Produktfraktion erfolgen.

Dendronisierung mit G2.0-PAMAM-(Boc)₈

Die Dendronisierung mit Amino-terminierten PAMAM-Dendronen zeigte keine guten Umsätze und eine Aufreinigung war weder mit der HPLC- oder der Äkta-SEC-Methode möglich. Daher soll in einem Experiment mit veränderter Dendron-Struktur getestet werden, ob die polaren und geladenen Amino-Endgruppen beziehungsweise der sterisch-abschirmende Faktor eine Rolle für die Interkalation in das Somatostatin-Peptid spielen. Hierzu werden die primären Amine des Monosulfon-G2.0-PAMAM **42** mit Boc-Schutzgruppen versehen und mit Somatostatin zur Reaktion gebracht. Da das G2.0-Dendron **40** (Abb. 65) bereits als Vorstufe des bisher genutzten dendritischen Interkalators zur Verfügung steht (s. Abb. 51), kann damit das Prinzip der Interkalation mit hydrophoben Endgruppen getestet werden.

Die Reaktionslösung wurde ohne weitere Aufreinigung mit dem MALDI-TOF-MS untersucht. In Abb. 66 ist das erhaltene Spektrum mit dem Produktsignal bei 2980 g/mol und dessen Isotopenaufspaltung zu sehen. Weiterhin ist unreaktiertes G2,0-PAMAM-Boc₄ **42** und Somatostatin (1638 m/z) zu erkennen. Unterhalb des Produktsignals befinden sich, in der Intensität exponentiell abfallend, mehrere Signale mit einer Massendifferenz von etwa 88 g/mol zueinander. Diese können als Fragmentierung der Boc-Gruppen angesehen werden, welche immer bei Boc-haltigen Dendronen im MALDI-TOF-MS auftreten. Die Fragmentierung ist Laser-induziert und auf die saure Matrix (Sinapinsäure) zurückzuführen. Die Abhängigkeit von der Laserleistung wurde untersucht, um die vermutete Fragmentierung zu verifizieren. Es wurden dazu fünf MALDI-TOF-Messungen mit verschiedenen Laserleistungen durchgeführt. Für die Auswertung addiert man die Summe aller Intensitäten der Fragment-Signale und bildet das Verhältnis zum Produktsignal („Maß der Fragmentierung“). Es ist in Diagramm 2 erkennbar, dass das Maß



Als Ergebnis der Dendronisierung mit einem Boc-funktionalisierten G2,0-Dendron lassen sich Schlüsse bezüglich elektrostatischen und sterischen Wechselwirkungen bezüglich der Ausbeute für die Interkalation mit Dendronen ziehen. Wenn man von ähnlichen MALDI-TOF-Flugeigenschaften der PAMAM-Boc-Dendrone sowie der PAMAM-(NH₂)-Dendrone ausgeht, kann durch diese Analyse-Methode geschlossen werden, dass verbesserte Umsätze der Boc-Dendrone gegenüber den Amino-Dendronen erzielt werden können. Das Intensitätsverhältnis der Dendron-Somatostatine zum nativen Somatostatin ist mit dem G2,0-PAMAM-Boc₄-Peptid **53** deutlich höher als das des Amin-Analogons **52** (vgl. Abb. 63 und Abb. 66). Dies stellt allerdings nur einen Hinweis dar und ist nicht als absolut quantitativ zu betrachten. Es müsste eine Isolierung der betreffenden Substanzen vorgenommen werden, um eine exakte Ausbeute berechnen zu können. Daher kann nur vermutet werden, dass die Boc-Version einen erhöhten Umsatz erbringt.

Der erhöhte sterische Anspruch des Boc-Dendrons führte zu keiner Hinderung der Interkalation in das Somatostatin-Peptid. Hieraus ist zu schließen, dass die zweite Generation des PAMAM-Dendron-Gerüsts den reaktiven Kern (bzgl. Disulfid-Interkalation) sterisch noch nicht abschirmt.

Weiterhin kann geschlossen werden, dass hydrophobe Endgruppen die Reaktion mit dem Somatostatin-Peptid nicht verhindern. Es wird vermutet, dass die positiv-geladenen Aminogruppen des ungeschützten Dendrons wegen elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem Somatostatin sogar die Reaktion verlangsamen könnten. Genau an der Schleifenseite der Disulfidbrücke liegen der N-Terminus und ein Lysin-Rest, welche ebenfalls positiv geladen sind und zu einer elektrostatischen Abstoßung des Dendrons führen könnten. Das Boc-geschützte Dendron dagegen trägt keine Ladung in den Dendrimer-Ästen und könnte somit bevorzugt eine Interkalation eingehen.

Weiterhin ist kritisch zu bewerten, dass bei der Boc-haltigen Interkalation DMF statt Acetonitril als organischer Zusatz genutzt wurde. Im Acetonitril-PBS-Puffer-Gemisch konnte das G_{2,0}-PAMAM-Boc₄ nicht gelöst werden. Diese Interkalation musste in 48% DMF/PBS-Puffer durchgeführt werden, was einen direkten Vergleich der Reaktivität beider Edukte verzerrt.

Es wurden in unserer Gruppe bereits Versuche zur Interkalation mit niedermolekularen Linkern der allgemeinen Struktur **25** durchgeführt ^[111]. Die erhaltenen Ergebnisse zur Disulfid-Funktionalisierung haben in den bisherigen Studien stets befriedigende Ausbeuten geliefert und es ist literaturbekannt, dass die Interkalation an biologische Stoffe mit Disulfidbrücken annähernd quantitativ abläuft ^[86-88]. Die vorliegenden Reaktionen zur „grafting onto“-Dendronisierung konnten diese Ausbeuten nicht annähernd erreichen. Der Vergleich des dendritischen Interkalators mit linearen Interkalatoren ähnlicher Masse zeigt viel schlechtere Umsätze, was unter anderem an den nicht optimierten Bedingungen der Interkalationsreaktion liegt. Es wurden nur wenige unterschiedliche Bedingungen wie z.B. unterschiedliche Lösungsmittel getestet und es waren keine signifikanten Verbesserungen erkennbar. Es ist zu erwähnen, dass die Charakterisierung ausschließlich mit der MALDI-TOF-Massenspektroskopie erfolgte. Sollte sich das dendronisierte Produkt für eine Charakterisierung mittels MALDI-TOF-MS nicht eignen, so könnte keine quantitative Aussage über den Umsatz getroffen werden. Dies ist als systematische Fehlerquelle der Ergebnisse zu beachten.

In zukünftigen Experimenten sollen sehr kleine Mengen des dendronisierten Somatostatins isoliert werden, die für eine zelluläre Charakterisierung ausreichen.

3.4.3 Dendronisierung kurzkettiger, linearer Peptide: RGDC-Dendrone

Wegen den geringen Ausbeuten der Somatostatin-Dendronisierung und der erschwerten Aufreinigung sollte das Reaktions-Prinzip der Monosulfon-Dendrone an weiteren Peptid-Strukturen gezeigt werden. Somatostatin erlaubt als zyklisches Peptid eine zweifache Michael-Addition an den Disulfid-Linker. Zunächst addiert es sich an das vorhandene Michael-System (Abb. 19 B) und muss nach erfolgter Eliminierung und Bildung eines zweiten Michael-Systems wieder intramolekular angreifen. Diese Abfolge könnte durch den sterischen Anspruch der Dendrone gestört sein und es soll mit kurzkettigen Peptiden überprüft werden, ob eine bessere Anknüpfung von Sulfiden möglich ist. Man wählt dazu

ein Cystein-haltiges Peptid, welches keine besonderen reaktiven Seitenketten neben dem Thiol trägt.

Es wurde die Aminosäuresequenz RGDC **54** gewählt, welche aus den vier L-Aminosäuren Arginin, Glycin, Asparaginsäure und Cystein besteht. Sie erfüllt die oben genannten Eigenschaften und hat weiterhin eine biologische Funktion, auf welche hier nur kurz hingewiesen werden soll.

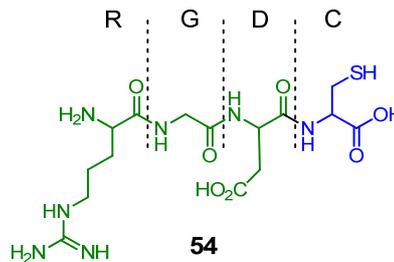


Abb. 67: RGDC-Sequenz (RGD: grün, Cystein: blau)

Die RGD-Sequenz (ohne Cystein) kommt besonders in Proteinen der Extrazellulären Matrix vor. Durch eine selektive Erkennung von bestimmten Rezeptoren (den *Integrinen*) an der Zelloberfläche werden RGD-haltige Proteine an die Zelle gebunden. Diese Zelladhäsion bildet unter anderem das Bindegewebe zwischen Zellen aus und sorgt für die Vernetzung zwischen ihnen. In entzündetem Gewebe oder Tumorgewebe ist die Dichte der Integrine auf der Zelloberfläche erhöht, wodurch die RGD-Sequenz eine adressierende Gruppe für pharmazeutische Anwendung darstellt (Zell-Targeting). Die Anheftung der RGD-Sequenz an Wirkstoff tragende Dendrimere konnte bereits in zahlreichen Beispielen gezeigt werden ^[125, 126, 128].

Durch die Erweiterung der RGD-Sequenz um ein Cystein soll die zweifache Anbindung an die synthetisierten Dendrone gezeigt werden. Da es sich um ein monofunktionelles Sulfid handelt, können theoretisch zwei Equivalente RGDC an ein Dendron geknüpft werden (s. Abb. 68). Mit der Motivation die höhere Rezeptordichte kranker Zellen zu adressieren führt eine Multivalenz der „Targeting“-Gruppe zur besseren Akkumulation des Dendrimerkonjugats im Tumorgewebe. Für die potentielle Anwendung als Wirkstoff-Transporter ist das PAMAM-Dendron dadurch in der Lage sich gezielt im Körper aufzukonzentrieren.

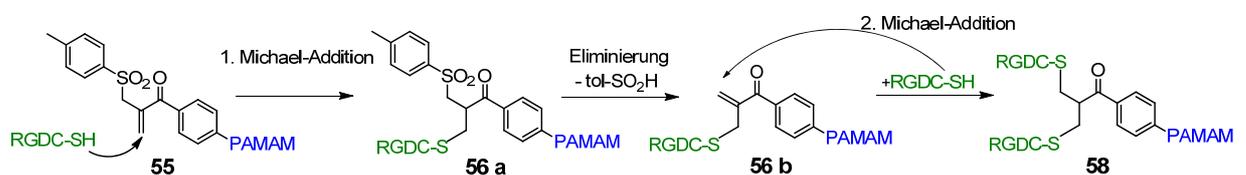


Abb. 68: Mechanismus der zweifachen RGDC-Anbindung an das PAMAM-Dendron

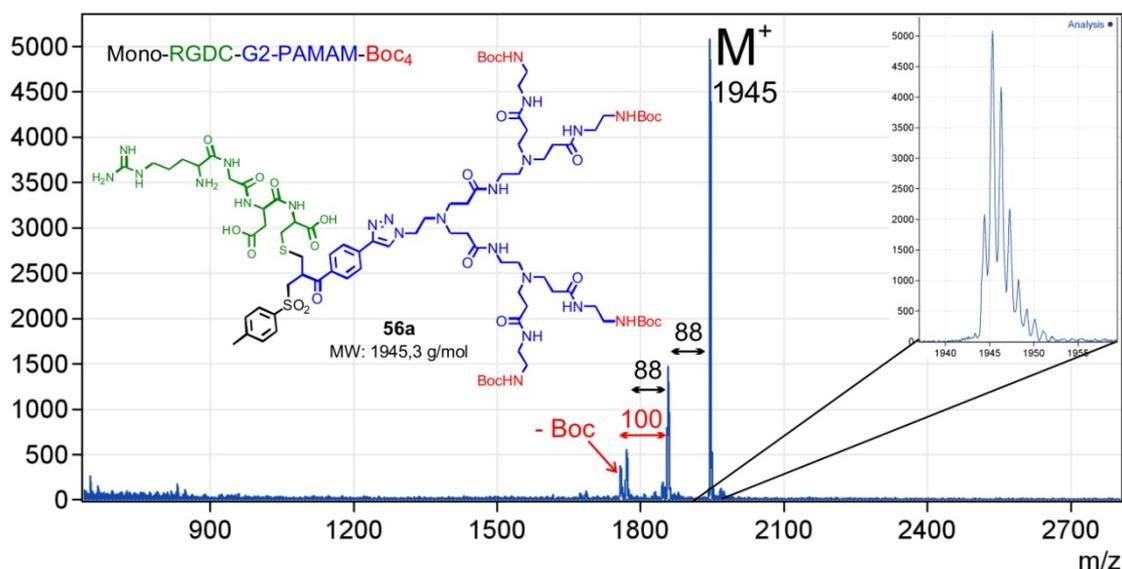


Abb. 70: MALDI-TOF-MS des Hauptpeaks aus der HPLC

wurde nicht detektiert:

Bis-RGDC-G2-PAMAM-Boc₄

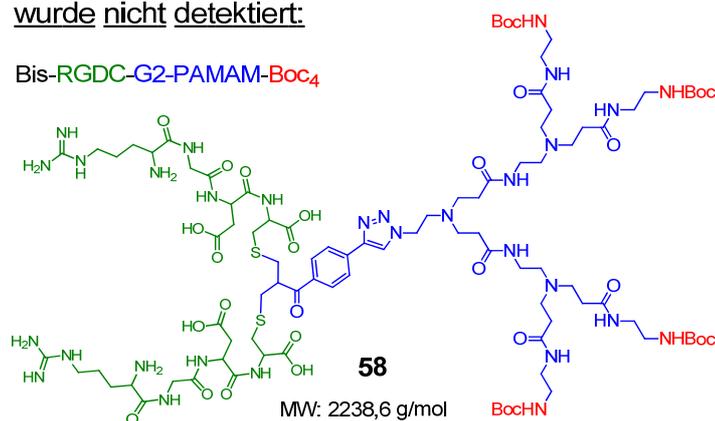


Abb. 71: Zweifach RGDC-substituiertes Dendron, welches nicht als Reaktionsprodukt festgestellt werden konnte

Die Ergebnisse zeigen, dass die einfache Michael-Addition an das Dendron sehr gut abläuft, allerdings die Eliminierung der Sulfanilsäure gehemmt ist. Obwohl genügend Äquivalente (4-facher Überschuss) an RGDC-Peptid dem Dendron zugesetzt wurden, konnte keine zweite Michael-Addition stattfinden, da die Reaktionsbedingungen keine Eliminierung der Abgangsgruppe für die Bildung eines zweiten Michael-Systems zulassen. Entscheidende Faktoren für einen guten Abgang der Sulfanilsäure spielen hierbei die Polarität des Lösungsmittels, der pH-Wert und die Reaktionszeit. Es wurde in einer Mischung aus DMF:MeCN:PBS-Puffer (=2:1:1) gearbeitet. Für die Eliminierung der Sulfanilsäure ist zwar ein basisches Medium erforderlich, jedoch entspricht der pH-Wert des Puffers von 6,2 den Empfehlungen der Literatur^[87] für ähnliche Additionen an den verwendeten Linker.

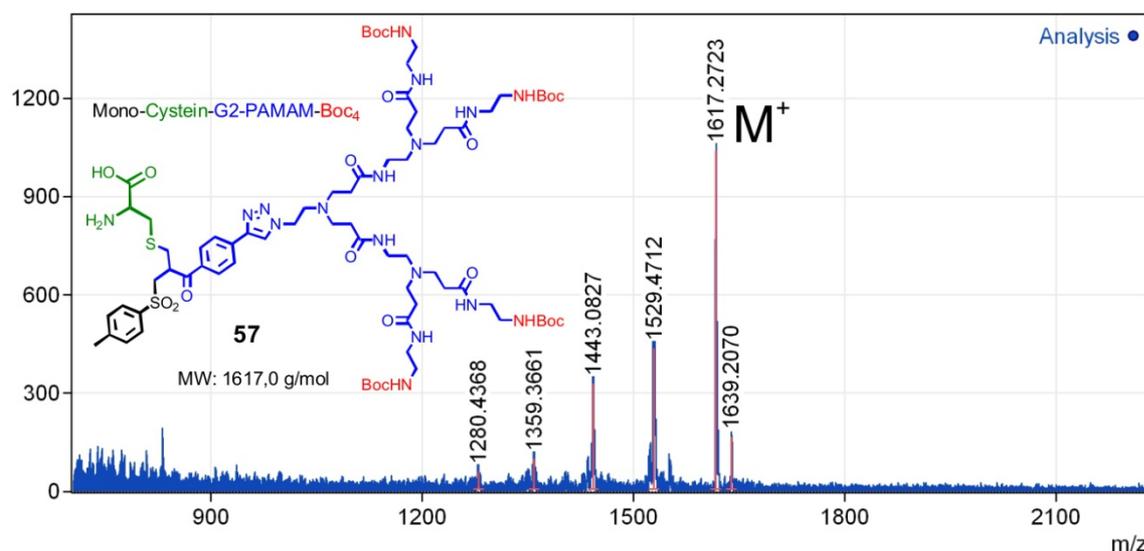


Abb. 72: MALDI-TOF-MS des isolierten Mono-Cystein-Dendrons

Als Verunreinigung wurde aus dem HPLC-Chromatogramm eine Fraktion mit Cystein-funktionalisiertem Dendron **57** isoliert. Das MALDI-TOF-Spektrum ist in Abb. 72 zu sehen. Vermutlich war freies Cystein als Verunreinigung im gekauften RGDC-Peptid vorhanden. Dies führte zur Addukt-Bildung und das entstehende Nebenprodukt konnte isoliert werden. Die MALDI-Laser-Fragmentierung der Boc-Gruppen zeigt die Anwesenheit des Dendrons in der vermessenen Fraktion. Auch hier konnte nur das Mono-Addukt festgestellt werden, was zusätzlich auf die gehemmte Eliminierung unter den gegebenen Reaktionsbedingungen hinweist.

Im Vergleich zur Somatostatin-Dendronisierung konnte erstmals ein reines dendronisiertes Peptid erhalten werden. Es wurde aber bei der Untersuchung der Somatostatin-Reaktionen immer eine Eliminierung der Sulfanilsäure beobachtet, sodass das zweite Michael-System gemäß MALDI-TOF-Massenspektroskopie für eine weitere Addition zur Verfügung stand. In den RGDC-Experimenten wurde kein Signal der eliminierten Form oder ein zweifaches Michael-Additionsprodukt gefunden. Dies lässt den Schluss zu, dass die Reaktionsbedingungen (40% MeCN oder DMF in pH 6,2 Puffer) der Somatostatin-Dendronisierungen gut auf den Abgang der Sulfanilsäure abgestimmt waren. Der hohe Anteil an organischem Lösungsmittel (75% MeCN und DMF in Puffer) könnte bei der RGDC-Dendronisierung die Eliminierung verhindert haben.

Es konnte in den Funktionalisierungsexperimenten an zwei verschiedenen Beispielen, dem Somatostatin-Peptid und der RGDC-Peptid-Sequenz, die einfache Dendronisierung gezeigt

werden. Einerseits ist die Interkalation in die Disulfidbrücke unter Erhaltung der Schleifenstruktur am Beispiel des Somatostatins gelungen und andererseits ermöglichte die Anbindung einer einzelnen RGDC-Sequenz die gerichtete Thiol-Funktionalisierung. Diese Ergebnisse demonstrieren die breiten Anwendungsmöglichkeiten und den flexiblen Einsatz der in dieser Arbeit hergestellten dendritischen Linker-Moleküle. Eine neue Methode zur Adressierung von Thiol-Funktionen in Peptiden wird am Beispiel des RGDC-Peptids gezeigt, was eine Alternative zu der bisher bekannten Maleimid-Chemie darstellt.

4. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde über die Herstellung neuartiger PAMAM-Dendrone mit bifunktionellen Eigenschaften berichtet. Diese maßgeschneiderten dendritischen Systeme können durch die Einführung eines spezifischen Linkers im Dendron-Kern für die ortsgerichtete Peptidfunktionalisierung genutzt werden. Daraus entstanden neue biohybride Materialien, welche multiple funktionelle Gruppen tragen und für die weitere chemische Modifikation eine universelle Plattform darstellen. Die Erhaltung der räumlichen Peptid-Struktur sowie eine präzise Monodispersität geben den hergestellten Konjugaten hohes Potential für die Weiterentwicklung zum Einsatz neuer multivalenter Therapeutika und Imaging-Reagenzien.

Basierend auf dem PAMAM-Gerüst konnten die ersten drei Generationen eines dendritischen Peptid-Linkers hergestellt werden. In der Dendron-Peripherie wurden primäre Amine oder *tert*-Butyl-Carbamat-Gruppen angebracht, während der Kern mit einem Michael-System für die Peptid-Kupplung an Disulfidbrücken oder Thiolen ausgestattet ist. In Kupplungs-Experimenten wurde die Dendronisierung am zyklischen Somatostatin-Peptid und am offenkettigen RGDC-Peptid gezeigt. Die kovalente Anknüpfung der Dendrone an zyklische Peptide verläuft über den Einschub einer Propylen-Einheit via doppelter Michael-Addition in die Disulfid-Gruppe und bildet eine chemisch stabile Verbrückung. Bei azyklischen Peptiden erfolgt die Dendronisierung über die Michael-Addition einer Thiolgruppe. Die Reaktionsbedingungen konnten so eingestellt werden, dass sogar nur die einfache Anknüpfung eines RGDC's erzielt wurde, dessen Isolierung gelang. Dies eröffnet neue Möglichkeiten zur kombinierten Funktionalisierung des Dendrons an der Kernfunktion. Es kann nach der Isolierung des RGDC-Dendrons durch die richtige Einstellung der Reaktionsbedingungen die Eliminierung der Sulfanilsäure erzwungen werden und dann durch Michael-Addition ein weiteres Peptid mit unterschiedlicher Funktion eingeführt werden.

Für die ersten beiden Generationen konnte jeweils die Dendronisierung des Somatostatins mit verschiedenen Peripherie-Gruppen (Amine oder *tert*-Butyl) erfolgreich demonstriert werden (Abb. 73). Ebenso gelang die einfache Addition des RGDC-Peptids an ein G2-PAMAM-Dendron. Bei letzterer Umsetzung wurde das einfache RGDC-Dendron vollständig isoliert, während die Somatostatin-Dendrone nicht vom unfunktionalisierten

Peptid getrennt werden konnten. Die Peptid-Konjugate wurden durch MALDI-TOF-Massenspektroskopie charakterisiert, was auch die Untersuchung der Somatostatin-Mischfraktionen erlaubte. Es wurde eindeutig die Anwesenheit des funktionalisierten Somatostatin bestätigt.

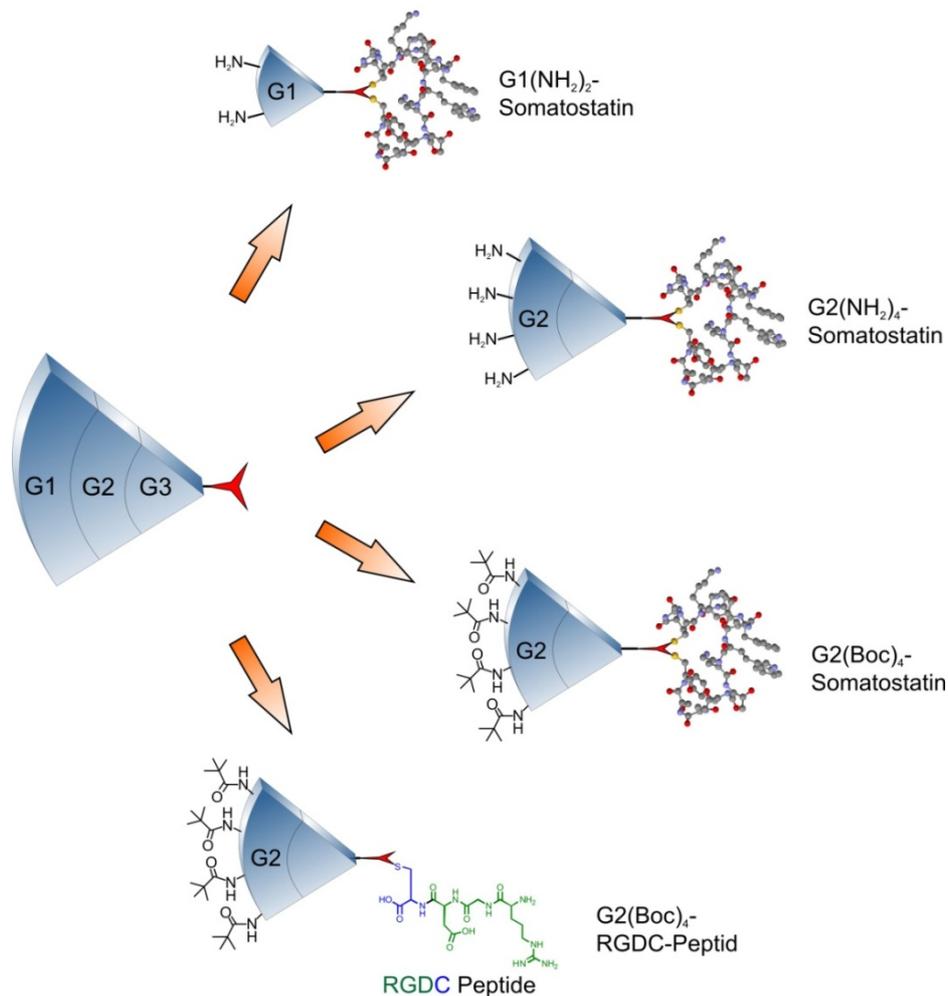


Abb. 73: Schema über die erfolgreich dendronisierten Peptide

Die Synthese des dendritischen Linkers gelang insgesamt konvergent. Das Dendron und der Linker wurden in einer parallelen Route synthetisiert und beide konnten in einem letzten Schritt durch moderne metallkatalysierte Kupplungsreaktionen oder Click-Reaktion zusammengeführt werden (siehe Hauptzweige in Abb. 74). Das reaktive Linker-Dendron konnte dann an das Somatostatin oder das RGDC-Peptid gekuppelt werden und stellt somit eine neue Art der posttranslationalen Peptidmodifikation mit dendritischen Bausteinen dar.

Durch das Baukastenprinzip für den Aufbau der hybriden Biomaterialien wird eine flexible und neuartige Methode vorgestellt, welche große Variationen der dendritischen Strukturen zur Funktionalisierung von Peptiden mit Disulfiden oder Thiolgruppen zulässt. Es können

die einzelnen Generationen, sowie verschiedene Endgruppen unabhängig voneinander als dendritischer Interkalator an Peptide gebunden werden und dadurch zum Aufbau von kombinatorischen Bibliotheken für die optimierte Wirkstoffsuche dienen.

Eine besonders elegante Feinoptimierung der Pharmakokinetik gelingt durch die Konjugation verschieden großer Dendron-Generationen. Hierbei muss ein Mittelweg zwischen sterischer Abschirmung gegen den metabolischen Abbau und der Hemmung der physiologischen Aktivität der Peptide erreicht werden, da diese beiden Effekte mit größerer Dendron-Generation gegenläufig eintreten. Die Effizienz der entwickelten Syntheserouten liegt in der einfachen Bereitstellung jeder Dendron-Zwischenstufen für die Peptid-Dendronisierung weshalb unterschiedliche Generationen als Peptid-Konjugat im direkten Vergleich getestet werden könnten.

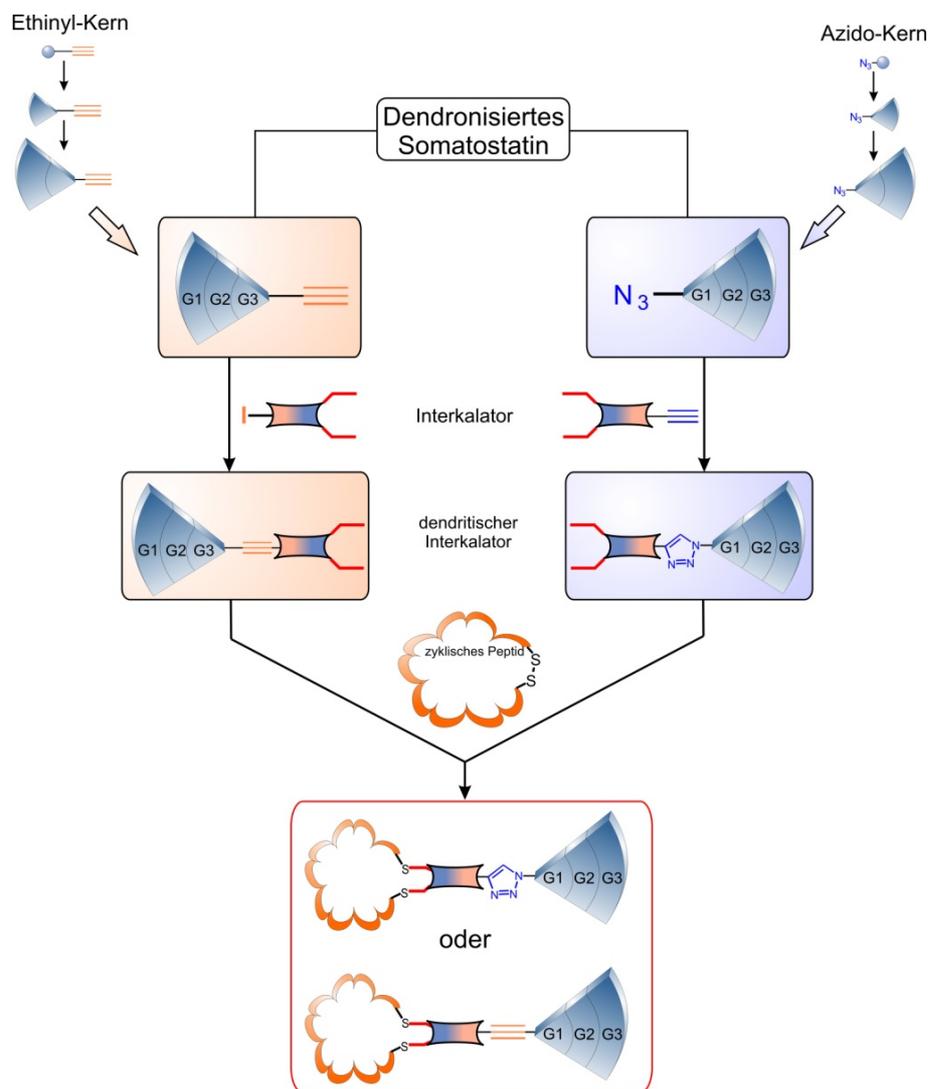


Abb. 74: Syntheschema der dendronisierten, zyklischen Peptide

Zukünftig sollen sehr kleine Mengen der G1- bis G3-dendronisierten Somatostatine synthetisiert und isoliert werden. Durch eine biologische Charakterisierung kann mit den erhaltenen Biohybriden gezeigt werden, ob das dendronisierte Somatostatin seine Aktivität beibehalten oder verbessert hat. Dies wird durch Zellstudien nach Inkubation mit den Somatostatin-Derivaten anhand der Caspase-Aktivität abgeleitet, welche repräsentativ für den eingeleiteten Zelltod ist ^[98, 106, 107]. Die daraus erhaltenen toxikologischen Ergebnisse können auch Rückschlüsse auf die Zellaufnahme zulassen und ermöglichen eine Abschätzung der Rezeptoraffinität. Bei statistischer Anfärbung der Peptid-Dendrone mittels Fluoreszenz-Farbstoff kann die Zellaufnahme auch durch konfokale Mikroskopie verfolgt und lokalisiert werden. Vergleiche der einzelnen Dendron-Generationen untereinander sollen Tendenzen erkennbar machen mit welcher Größe man optimierte Stabilität erreicht, ohne gleichzeitigen Verlust an Aktivität zu erhalten.

Die erhaltenen biohybriden Konjugate sind als Basis für die Entwicklung neuer zytostatischer Therapeutika zu sehen. Die exakte Formulierung durch die monodisperse Molekularstruktur, welche ein zelladressierendes Peptid enthält und viele funktionelle Gruppen für die Anbindung von Zytostatika bietet, stellt eine moderne Plattform für molekulare Wirkstofftransporter dar. Die Entwicklung eines dendritischen Biokonjugates eröffnet zudem neue Möglichkeiten für die Kombinationstherapie. Dabei enthalten monomolekulare Dendrimer-Transporter zwei verschiedene Wirkstoffe, welche zeitgleich freigesetzt werden können. Somatostatin nimmt im vorgestellten System sowohl die Rolle einer zelladressierenden Gruppe sowie die eines Wirkstoffs ein. Pankreaszellen können durch die hohe Dichte an Somatostatin-Rezeptoren zielgerichtet therapiert werden, während ebenfalls durch Aufkonzentration in der Zelle die Aktivität der Caspasen erhöht wird, was zum kontrollierten Zelltod (Apoptose) führt. Bei weiterer Anbindung von zytostatischen Wirkstoffen könnte dies die Anwendung in der modernen Behandlung von Bauchspeicheldrüsenkrebs finden.

Eine weitere Besonderheit von dendronisierten Materialien liegt in der Ausbildung von Überstrukturen. Bevorzugt lagert sich das voluminöse Dendron in zylindrischer oder helikaler Reihe am äußeren Mantel an und lässt seine funktionalen Kerne aggregieren ^[108, 109]. Somatostatin ist für die Bildung von helikalen Nano-Fibrillen bekannt ^[110] und könnte in der dendronisierten Variante neues Verständnis für die Überstruktur-Bildung bringen.

Die Dendronisierung bioaktiver Stoffe zeigt weitreichende Anwendungen und ein großes Potential für die Entwicklungen einer neuen molekularen Krebs-Therapie. Zukünftige

Studien sollen grundlegende Fragen und ein detailliertes Verständnis zur Wirkung hybridisierter Peptide liefern. Die vorgestellten Methoden der effizienten Peptid-Dendronisierung leisten hierzu einen fortschrittlichen Beitrag mit konkreten Beispielen am Somatostatin- und RGDC-Peptid für die Grundlage neuer biohybrider Materialien.

5. Experimenteller Teil

5.1 Instrumentelle Analytik

Hochaufgelöste ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie

- Bruker AC 300
- Bruker AMX 500
- Bruker Avance 700 Ultrashield™

Sofern nicht anders angegeben wurden alle NMR-Spektren bei Raumtemperatur gemessen.

Massenspektrometrie

- FD: VG Instruments ZAB 2-SE-FPD
- MALDI-TOF: Bruker Reflex II

UV-VIS-Spektroskopie

- Perkin-Elmer Lambda 15-Spektrometer (Quarzglasküvetten der Firma Hellma mit der Schichtdicke von 1 cm)

HPLC-System

- JASCO HPLC 2000, Flussraten: 10 mL/min mit linearem Gradienten des Puffers B (20%, 3 Min, 20-70%, 21 Min, 70-100%, 0.5 Min und 100%, 9.5 Min) in Puffer A (Puffer A: 0.1% TFA in H_2O und Puffer B: 0.1% TFA in 95% CH_3CN), RESOURCE RPC 3ml Säule von GE Healthcare.

5.2 Allgemeine experimentelle Bedingungen

Lösungsmittel

Die Solventien wurden in den Reinheitsgraden zur Analyse (p.A.) bzw. "Chromasolv" verwendet.

Dünnschichtchromatographie

Zur analytischen Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien 60 F254 der Fa. E. Merck verwendet. Die Detektion der Chromatographiezonen erfolgte durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm sowie durch Eigenfluoreszenz bei 366 nm. Weiterhin wurde mit Iod oder ethanolischer KMnO_4 -Lösung angefärbt. Bei Farbgebung mit Ninhydrin-Lösung in Ethanol wurde zusätzlich mit einem Heissluftfön erhitzt.

Präparative Säulenchromatographie

Als stationäre Phase wurde Flash-Kieselgel der Korngröße 0,040 - 0,063 mm (Blitz) benutzt. Als Eluentien dienten analysenreine Solventien. Die Mischungsverhältnisse der Lösungsmittel sind für die jeweilige Chromatographie im Text angegeben.

Schutzgas

Als Inertgas wurde Argon (Fa. Linde) verwendet.

Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Sigma-Aldrich sowie VWR bezogen und, sofern nicht explizit angegeben, ohne weitere Reinigung verwendet.

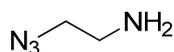
Abkürzungen zur Beschreibung der IR-Banden IR: Bandenstärke: vs: sehr stark, s: stark, m: mittel, w: schwach; Bandenbreite: ohne Kennzeichnung: $\sim 10 \text{ cm}^{-1}$, B: $\sim 50 \text{ cm}^{-1}$, VB: $\sim 100 \text{ cm}^{-1}$.

5.3 Hergestellte Substanzen

5.3.1 Azido-Dendrone

Die Synthese der Azido-Dendrone G0,5 bis G2,5 basiert bis auf den Kernbaustein auf den Vorschriften von Lee *et al.* ^[45]. Die Arbeitsvorschriften der dritten Generation und Einführung sowie Entfernung der Boc-Schutzgruppen wurden im Zuge der vorliegenden Arbeit entwickelt.

1. 2-Azido-ethylamin (2)



Literatur: T. Mayer, M. E. Maier, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 4711–4720.

2-Bromoethylaminhydrobromid (6,161 g, 30 mmol, 1eq.) werden zu einer Lösung aus Natriumazid (6,20 g, 95 mmol, 3,2eq.) in 26 mL destilliertem Wasser gegeben und auf 87 °C im Ölbad unter Rühren mit Rückflusskühler erhitzt. Nach 21 Stunden wird das Ölbad entfernt und unter Kühlung mit einem Eisbad und leichtem Rühren werden 7,99 g Kaliumhydroxid (142 mmol, 4,7eq.) zur Reaktionslösung in drei Portionen zugegeben. Nach viermaliger Extraktion mit je 35 mL Diethylether werden die vereinigten organischen Phasen mit MgSO₄ getrocknet und filtriert. Bei 34 °C Badtemperatur und 760 mbar wird mit dem Rotationsverdampfer eingeengt bis man 7,26 g einer farblosen etherischen Lösung erhält. Das Produkt darf wegen des hohen Stickstoffgehaltes keinesfalls isoliert werden. Explosionsgefahr! Die Ausbeute kann mittels NMR-Integralen berechnet werden, indem man den Massengehalt des Diethylethers berücksichtigt.

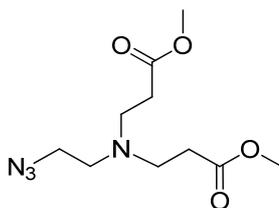
Ausbeute: 2,359 g (27,4 mmol) 2-Azido-ethylamin in 4,9 g Diethylether gelöst, 91% der Theorie (Literatur: 82%).

¹H-NMR (300 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 1.44 (s, 2 H, NH₂), 2.86–2.90 (m, 2 H, CH₂N₃), 3.36 (t, 2 H, CH₂NH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 55.26 (s), 41.87 (s).

FT-IR 3380 (VB), 3290, 2935, 2865, 2097 (vs), 1594, 1448, 1280 cm⁻¹.

2. Azido-G0,5-PAMAM-Dendron (3)



In 6 mL Methanol werden 1,681 g (19,5 mmol, 3,7eq.) Methylacrylat gelöst und im Eisbad gekühlt. Getrennt davon werden 1,569 g (455 mg reines Azid (2), 5,28 mmol, 1eq.) einer 29%-igen etherischen 2-Azido-ethylamin-Lösung in 4 mL Methanol gelöst und ebenfalls eiskühlt. Die Hälfte der Azid-Lösung wird langsam in die eiskalte Methylacrylat-Lösung getropft und für 1 h gerührt und weiter im Eisbad gekühlt. Dann wird die andere Hälfte der Azid-Lösung langsam nachgetropft und das Eisbad entfernt, sodass die Reaktionslösung langsam Raumtemperatur annimmt und für ca. 20 Stunden rührt. Nach Einengen am Rotationsverdampfer bei 40 °C erhält man 1,3 g eines öligen, gelben Rohproduktes, welches säulenchromatographisch gereinigt wird (Gradient 65% → 40% hex/EtOAc). Man erhält nach Entfernung des Lösungsmittels 454 mg (1,76 mmol, 33% d. Th.) eines farblosen Öls.

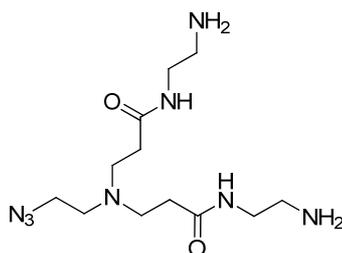
R_f 0,68 (EtOAc:hex 1:1).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.27 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.82 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H), 2.66 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.48 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 172.92 (s), 53.91 (s), 51.80 (s), 49.77 (s), 49.28 (s), 32.74 (s).

FD/MS (m/z): 257,3 g/mol - berechnet: 258,3 g/mol für C₁₀H₁₈N₄O₄.

3. Azido-G1,0-PAMAM-Dendron (4)



In einem 100 mL-Rundkolben mit Magnetrührer werden 17 mL (15,3 g, 255 mmol, 31eq.) Ethylendiamin in 2 mL Methanol gelöst und unter Rühren im Eisbad gekühlt. Der Kolben wird mit einem Septum verschlossen und für 2 min. mit Argon gespült. Mit einer Spritze werden langsam 2,125 g (8,23 mmol, 1 eq.) Azido-G0,5-PAMAM-Dendron (3), gelöst in 4 mL Methanol, unter starkem Rühren zugetropft und das Eisbad nach Beendigung der Zugabe entfernt. Nach 72 Stunden Rühren bei Raumtemperatur verdünnt man die Reaktionslösung mit 20 mL eines Lösungsmittelgemisches aus MeOH:Toluol (1:9) und engt bei 40 °C am Rotationsverdampfer ein, so dass das überschüssige Ethylendiamin azeotrop entfernt wird. Diesen Vorgang wiederholt man weitere viermal und entfernt zuletzt sukzessive Toluol durch Zugabe von Methanol und azeotroper Destillation bei 40 °C mit Unterdruck. Nach Trocknung am Hochvakuum für 20 Stunden erhält man 2,59 g (8,23 mmol, quant. Ausbeute, verunreinigt mit etwas MeOH) eines gelblichen, hochviskosen Öls.

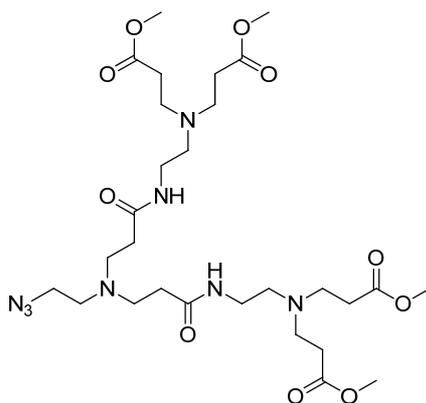
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.20 (s, 2H, NH), 3.44 – 3.34 (m, 2H, N₃CH₂), 3.30 (dd, J = 11.7, 5.8 Hz, 4H, CH₂NHCO), 2.92 – 2.81 (m, 4H, CH₂CO), 2.81 – 2.71 (m, 4H, CH₂-NH₂), 2.67 – 2.57 (d, 2H, N₃CH₂-CH₂-N), 2.39 (dd, J = 7.6, 4.4 Hz, 4H, N-CH₂-CH₂CO).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 172.42 (s), 53.38 (s), 50.52 (s), 49.31 (s), 42.06 (s), 41.35 (s), 34.41 (s).

FD/MS (m/z): 314,3 g/mol - berechnet: 314,4 g/mol für C₁₂H₂₆N₈O₂.

FT-IR 596, 962, 1036, 1132, 1192, 1284, 1354, 1437, 1547 (s), 1643 (s), 2098 (vs), 2821, 2929, 3066, 3286 (B) cm⁻¹.

4. Azido-G1,5-PAMAM-Dendron (5)



In einem trockenen, mit Argon gespülten, 25 mL-Rundkolben werden 3 mL (2,85 g, 33,1 mmol, 33eq.) Methylacrylat in 1,5 mL trockenem Methanol gelöst. Getrennt davon werden 315 mg (1,00 mmol, 1eq.) Azido-G1,0-PAMAM-Dendron (4) in 2 mL Methanol gelöst und mit einer Spritze zur Methylacrylat-Lösung im Argon-Gegenstrom langsam zugetropft. Die Spritze wird nochmal mit 0,5 mL Methanol nachgespült und das Reaktionsgefäß mit einem Septum unter Argon verschlossen. Man rührt bei Raumtemperatur für 5,5 Stunden und engt dann die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer bei 40 °C ein und erhält 602 mg eines gelben Öls als Rohprodukt. Mithilfe der Säulenchromatographie wird das Produkt gereinigt (Gradient 7,5% → 15% Methanol/Ethylacetat) und man erhält nach Trocknung am Hochvakuum 264 mg (0,40 mmol, 40% d. Th.) eines farblosen Öls.

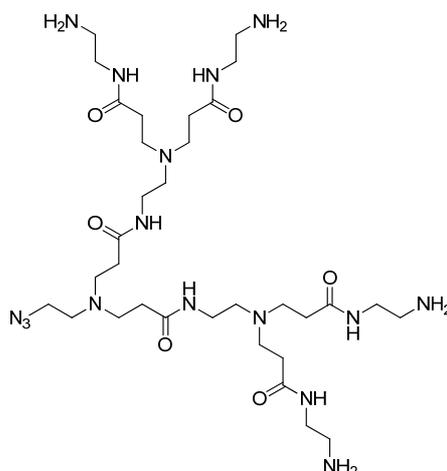
R_f 0,62 (MeOH/EtOAc 1:4).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 6.93 (s, 2H), 3.69 (s, 12H), 3.32 (dt, J = 11.4, 5.7 Hz, 6H), 2.85 (t, J = 6.8 Hz, 4H), 2.77 (t, J = 6.6 Hz, 8H), 2.70 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.55 (t, J = 5.9 Hz, 4H), 2.49 – 2.35 (m, 12H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 173.05 (s), 171.90 (s), 53.09 (s), 52.97 (s), 51.66 (s), 50.04 (s), 49.26 (s), 49.20 – 49.07 (m), 37.12 (s), 33.93 (s), 32.75 (s).

FT-IR 517, 841, 1045, 1174, 1194, 1259, 1360, 1437, 1529, 1649 (s), 1732 (vs), 2098 (s), 2820, 2952, 3316 (VB) cm⁻¹.

5. Azido-G2,0-PAMAM-Dendron (6)



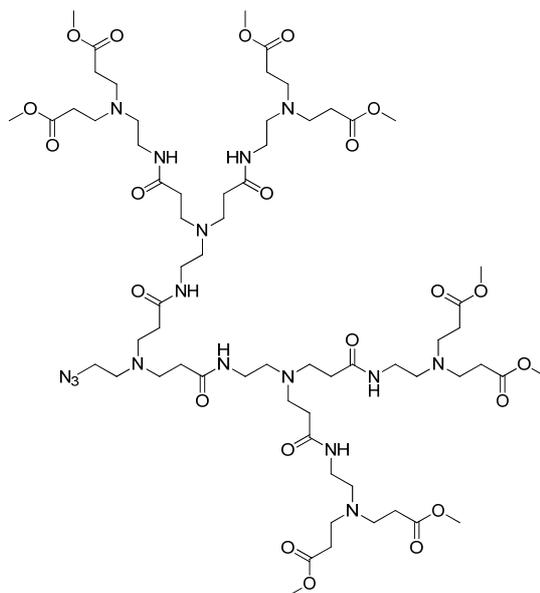
In einem 100 mL-Rundkolben mit Magnetrührer werden 10 mL (9,5 g, 158 mmol, 110eq.) Ethylendiamin in 1,4 mL Methanol gelöst und unter Rühren im Eisbad gekühlt. Der Kolben wird mit einem Septum verschlossen und für 2 min mit Argon gespült. Mit einer Spritze werden langsam 0,94 g (1,43 mmol, 1 eq.) Azido-G1,5-PAMAM-Dendron (5), gelöst in 1 mL Methanol, unter starkem Rühren zugetropft und das Eisbad nach Beendigung der Zugabe entfernt und weitere 0,6 mL Methanol zugegeben. Nach 5 Tagen Reaktionszeit bei Raumtemperatur verdünnt man die Reaktionslösung mit 20 mL eines Lösungsmittelgemisches aus Methanol:Toluol (1:9) und engt bei 40 °C am Rotationsverdampfer ein, so dass das überschüssige Ethylendiamin azeotrop entfernt wird. Diesen Vorgang wiederholt man weitere fünfmal und entfernt zuletzt sukzessive Toluol durch Zugabe von Methanol und azeotroper Destillation bei 40 °C mit Unterdruck. Nach Trocknung am Hochvakuum für 45 Stunden erhält man 1,120 g (1,43 mmol, quant. Ausbeute, verunreinigt mit etwas MeOH) eines orange-gelben, hochviskosen Öls.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.84 (s, 2H), 7.56 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.27 (m, 14H), 2.82 (t, $J = 5.8$ Hz, 8H), 2.79 – 2.66 (m, 12H), 2.62 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.52 (t, $J = 5.9$ Hz, 4H), 2.34 (dd, $J = 9.6, 6.1$ Hz, 12H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 173.0 (s), 172.0 (s), 54.12 (s), 53.24 (s), 52.0 (s), 50.72 (s), 50.11 (s), 42.08 (s), 41.47 (s), 38.05 (s), 34.7 (s), 34.22 (s).

FT-IR 733, 1044, 1298 (B), 1427, 1462, 1560 (s), 1639 (vs), 2100, 2828, 2334, 2362, 2927, 3075 (B), 3292 cm^{-1} .

6. Azido-G2,5-PAMAM-Dendron (7)



In einem Rundkolben mit Septum und Magnetrührer werden 2,5 mL (2,375 g, 27,5 mmol, 120eq.) Methylacrylat in 1,5 mL Methanol gelöst und in einem Eisbad gekühlt. Dazu wird eine Lösung aus 155 mg (0,20 mmol, 1eq.) Azido-G2,0-PAMAM-Dendron (**6**) in 2 mL Methanol langsam zugetropft. Das Reaktionsgefäß wird kurz mit Argon gespült und das Eisbad lässt man langsam auftauen, sodass die Reaktionslösung Raumtemperatur annimmt. Nach 9 Stunden Reaktionszeit entfernt man die flüchtigen Komponenten am Rotationsverdampfer bei 40 °C mit Unterdruck und trocknet das Rohprodukt über Nacht am Hochvakuum. Nach einer säulenchromatographischen Trennung (Gradient 15% → 20% Methanol/DCM auf Silikagel) erhält man 86 mg (59 μmol, 30% d. Th.) eines hellgelben, viskosen Öls.

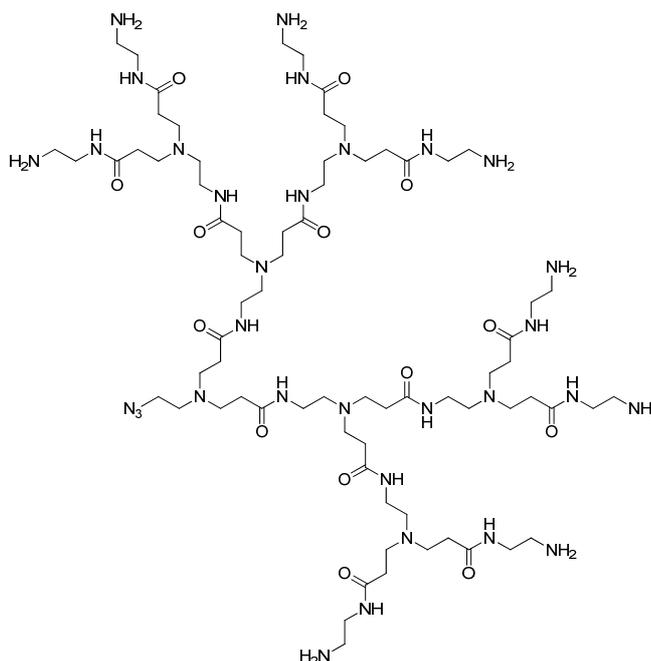
R_f 0,6 (18% MeOH in DCM).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.71 (s, 2H, $\text{NHCO}_{\text{inner}}$), 7.07 (s, 4H, $\text{NHCO}_{\text{outer}}$), 3.66 (s, 24H, OCH_3), 3.28 (m, 14H, $\text{CH}_2\text{N}_3 + \text{CH}_2\text{NHCO}$), 2.82 (t, $J = 6.6$ Hz, 8H, $\text{CH}_2\text{CONH}_{\text{outer}}$), 2.74 (m, 18H, $\text{N}_3\text{-CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Me}$), 2.71 – 2.64 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CONH}_{\text{inner}}$), 2.54 (m, 12H, $\text{N-CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}_{\text{inner+outer}}$), 2.43 (m, 28H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Me}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_{\text{inner+outer}}$).

„*inner*“ = Dendron-Innensphäre (G1.0), „*outer*“ = Dendron-Außensphäre

FT-IR 538, 667, 731 (s), 845, 918, 1043, 1149 (s), 1178, 1198, 1255, 1365, 1437, 1539, 1645 (s), 1728 (vs), 2100, 2334, 2360 (s), 2821, 2952, 3267 (VB) cm^{-1} .

7. Azido-G3,0-PAMAM-Dendron (8)



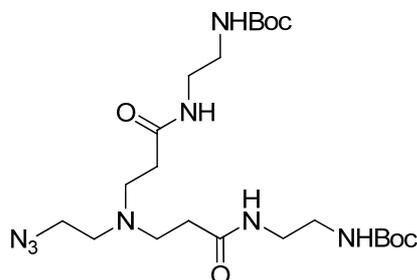
In einem 50 mL Rundkolben werden 2 mL (1,8 g/mol, 30 mmol, 612 eq.) Ethylendiamin in 0,5 mL Methanol im Eisbad unter mäßigem Rühren gekühlt. Dazu wird eine Lösung aus Azido-G2,5-PAMAM-Dendron (7) in 1,5 mL Methanol mit Hilfe einer Spritze zugetropft und die Spritze nochmal mit 0,5 mL Methanol nachgespült. Man lässt das Eisbad innerhalb von zwei Stunden Raumtemperatur annehmen. Nach 5 Tagen Reaktionszeit verdünnt man die Reaktionslösung mit 20 mL eines Lösungsmittelgemisches aus Methanol:Toluol (1:9) und engt bei 40 °C am Rotationsverdampfer ein, so dass das überschüssige Ethylendiamin azeotrop entfernt wird. Diesen Vorgang wiederholt man weitere viermal und entfernt zuletzt Toluol durch Zugabe von Methanol und azeotroper Destillation bei 40 °C mit Unterdruck. Nach Trocknung am Hochvakuum für 18 Stunden erhält man 90 mg (quant. Ausbeute, verunreinigt mit etwas MeOH) eines orange-braunen, gummiartigen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, MeOD): δ (ppm) = 3.44 – 3.19 (m), 3.14 – 3.01 (m), 2.86 (m), 2.74 – 2.67 (m), 2.69 – 2.54 (m), 2.42 (m), 2.26 – 2.18 (m).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, MeOD): δ (ppm) = 175.70 – 174.32 (t, 14C, C=O), 79.50 (s, 1C, N_3CH_2), 53.46 (d, 6C, $\text{CH}_2\text{NH}_{\text{amid}}$), 51.14 (s, 14C, CH_2CO), 41.78 (s, 14C), 38.68 (d, 8C, CH_2NH_2), 34.78 (s, 14C).

FT-IR 667, 820, 877, 1047, 1151, 1315 (s), 1382, 1479 (s), 1564 (vs), 1639 (vs), 2098, 2362, 2851 (B), 2925, 3062, 3352 (s, VB) cm^{-1} .

8. Azido-G1,0-PAMAM-Boc₂-Dendron (36)



136 mg (0,43 mmol, 1eq.) Azido-G1,0-PAMAM-Dendron (**4**) werden in 3,2 mL Dichlormethan in einem Rundkolben mit Magnetrührer gelöst. Man gibt 312 mg (1,29 mmol, 3eq.) Di-*tert*-butyldicarbonat hinzu und kühlt die Reaktionslösung im Eisbad. Nach Zugabe von 357 μ L (489 mg, 4,83 mmol, 11 eq.) Triethylamin wird für 2,5 Stunden gerührt, während man das Eisbad langsam Raumtemperatur annehmen lässt. Die Reaktionslösung wird dann am Rotationsverdampfer eingeeengt und für 18 Stunden am Hochvakuum getrocknet. Man erhält 262 mg eines Öls als Rohprodukt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Silicagel, 15% MeOH/Ethylacetat) liegen 172 mg (0,334 mmol, 78%) eines farblosen Feststoffes vor.

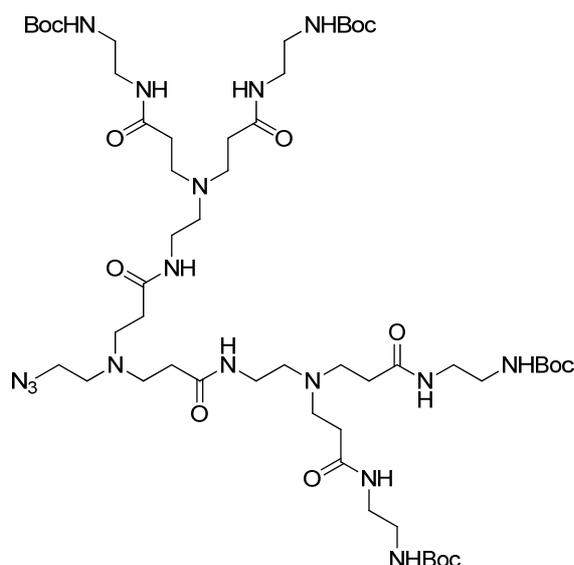
R_f 0,6 (15% MeOH in EtOAc).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.17 (s, 2H, NH_{amid}), 5.25 (s, 2H, NH_{carbamat}), 3.43 – 3.31 (m, 6H, CH₂N₃, CH₂NH_{amid}), 3.31 – 3.18 (m, 4H, CH₂NH_{carbamat}), 2.74 (t, J = 6.0 Hz, 4H, CH₂CO), 2.61 (t, J = 5.7 Hz, 2H, N₃CH₂CH₂N), 2.36 (t, J = 5.9 Hz, 4H, NCH₂CH₂CO), 1.43 (s, 18H, -CH₃).

FD/MS (m/z): 516,1 g/mol - berechnet: M+H⁺ 515,6 g/mol für C₂₂H₄₃N₈O₆.

FT-IR 534 (B), 634, 781, 868, 978, 1038, 1167 (s), 1236, 1277, 1365, 1446, 1527 (vs), 1645, (vs), 1685 (vs), 2102, 2829, 2937 (B), 2978 (B), 3068, 3317, 3357 cm⁻¹.

9. Azido-G2,0-PAMAM-Boc₄-Dendron (37)



In einem Rundkolben mit Magnetrührer werden 102 mg (0,132 mmol, 1 eq.) Azido-G2,0-PAMAM-Dendron (**6**) in 1 mL Dichlormethan und 0,3 mL Methanol gelöst und im Eisbad gekühlt. Zu dieser Lösung werden nacheinander 166 mg (0,76 mmol, 5,8eq.) Di-*tert*-butyldicarbonat und 183 μ L (134 mg, 1,32 mmol, 10 eq.) Triethylamin zugegeben. Das Reaktionsgefäß wird mit einem Septum verschlossen und das Eisbad nach einer Stunde entfernt. Man rührt für weitere 40 Stunden bei Raumtemperatur und bricht die Reaktion durch Entfernen der flüchtigen Reaktionskomponenten bei 40 °C mit Unterdruck ab. Nach Aufreinigung durch Säulenchromatographie (Silicagel, Gradient 17% \rightarrow 20% Methanol/Dichlormethan) erhält man 97 mg (83 μ mol, 63%) eines farblosen Feststoffes.

R_f 0,22 (18% MeOH in DCM).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.57 (s, 2H), 7.43 (s, 4H), 5.66 (s, 4H), 3.30 (m, 26H, N_3CH_2 , $\text{CH}_2\text{NH}_{\text{amid}}$, CH_2CO), 2.76 (m, 8H), 2.65 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 2.55 (t, 4H, $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 2.38 (m, 12H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 1.45 (s, 36H, $-\text{CH}_3$).

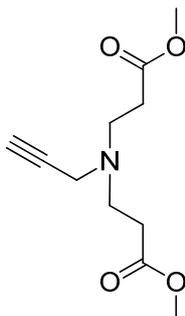
FD/MS (m/z): 1196,6 g/mol - berechnet: $\text{M}+\text{Na}^+$ 1194,4 g/mol für $\text{C}_{52}\text{H}_{98}\text{N}_{16}\text{O}_{14}$.

FT-IR 647, 782, 861, 977, 1038, 1164 (vs), 1248, 1268, 1365, 1391, 1454, 1526 (s, B), 1644 (vs), 1687 (s), 2101, 2850, 2929, 2975, 3072, 3282 (VB) cm^{-1} .

5.3.2 Ethinyl-Dendrone

Literatur: Modifizierte Synthesen nach J. W. Lee, B.-K. Kim, H. J. Kim, S. C. Han, W. S. Shin, S.-H. Jin, *Macromol.* **2006**, *39*, 2418-2422.

10. Ethinyl-G0,5-PAMAM-Dendron (15.1)

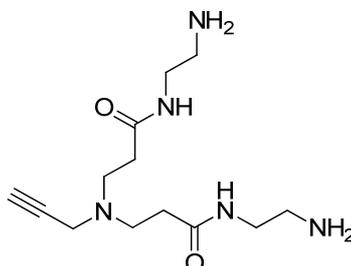


Eine Lösung aus 2,0 g (36,3 mmol, 1eq.) Propargylamin in 3 mL Methanol wurde zu 20 mL (19 g, 220 mmol, 6,1eq.) Methylacrylat, welches vorher im Eisbad gekühlt und mit Argon gespült wurde, langsam zugetropft. Nach 20 Stunden Reaktionszeit wurde die Lösung am Rotationsverdampfer bei 40 °C und Unterdruck eingengt. Man erhält 5,67 g eines gelben Öls als Rohprodukt. Nach Aufreinigung durch Säulenchromatographie (Silicagel, Gradient 40% → 65% Ethylacetat in Hexan) können 2,07 g (8,96 mmol, 26%) eines hellgelben Öls isoliert werden. Als Nebenprodukt wurde hauptsächlich monofunktionalisierte Michael-Addukt erhalten ($R_f = 0,38$, EtOAc/hex 1:1).

R_f 0,69 (EtOAc/hex 1:1).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.66 (s, 6H, $-\text{OCH}_3$), 3.41 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, $\text{HCC-CH}_2\text{-N}$), 2.83 (t, $J = 7.1$ Hz, 4H, CH_2CO), 2.46 (t, $J = 7.1$ Hz, 4H, $\text{CO CH}_2\text{CH}_2\text{-N}$), 2.19 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, HCC-CH_2).

11. Ethinyl-G1,0-PAMAM-Dendron (16)



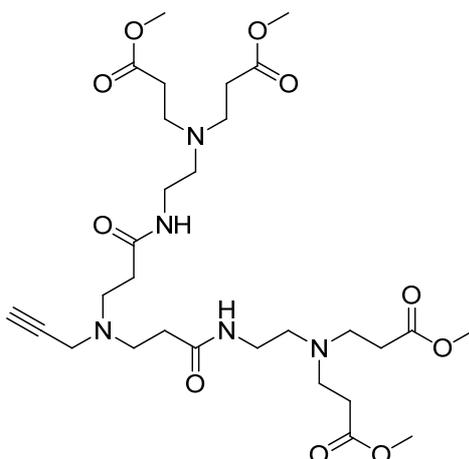
In einem 100 mL-Rundkolben mit Magnetrührer werden 6 mL (5,4 g, 90 mmol, 20eq.) Ethylendiamin in 0,9 mL Methanol gelöst und unter Rühren im Eisbad gekühlt. Der Kolben wird mit einem Septum verschlossen. Mit einer Spritze werden langsam 0,998 g (4,4 mmol, 1 eq.) Ethinyl-G0,5-PAMAM-Dendron (**15.1**), gelöst in 1 mL Methanol, unter starkem Rühren zugetropft. Man entfernt das Eisbad nach 1,5 Stunden Reaktionszeit und lässt weitere 40 Stunden bei Raumtemperatur rühren. Dann verdünnt man die Reaktionslösung mit 30 mL eines Lösungsmittelgemisches aus Methanol/Toluol (1:9) und engt bei 40 °C am Rotationsverdampfer ein, sodass das überschüssige Ethylendiamin azeotrop entfernt wird. Diesen Vorgang wiederholt man weitere viermal und entfernt zuletzt sukzessive das Toluol durch Zugabe von Methanol und azeotroper Destillation bei 40 °C mit Unterdruck. Nach Trocknung am Hochvakuum für 23 Stunden erhält man 1,29 g (4,4 mmol, quant. Ausbeute, verunreinigt mit etwas MeOH) eines gelben viskosen Öls.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.22 (s, 2H, NH_{amid}), 3.41 (d, J = 2.3 Hz, 2H, HCC-CH₂-N), 3.28 (dt, J = 11.6, 5.7 Hz, 4H, CH₂-NHCO), 2.82 (m, 8H, CH₂-NH₂, CH₂-CONH), 2.37 (m, 4H, CH₂-N), 2.21 (t, J = 2.3 Hz, 1H, HCC-CH₂), 1.55 (s, 4H, -NH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 172.31 (s), 77.63 (s), 73.64 (s), 49.53 (s), 42.02 (s), 41.62 (s), 41.43 (s), 34.05 (s).

FT-IR 536, 582, 667 (B), 935, 1032, 1122, 1190, 1244, 1360, 1433, 1547, 1641 (vs), 2837, 2929, 3066, 3282 (VB) cm⁻¹.

12. Ethinyl-G1,5-PAMAM-Dendron (16.1)



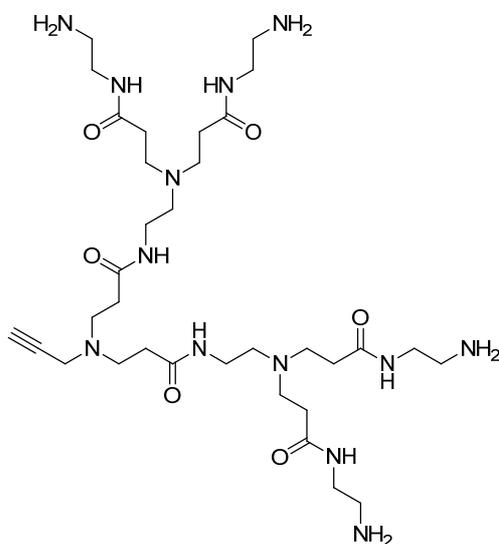
Es werden 351 mg (4,08 mmol, 12eq.) Methylacrylat in einem Rundkolben mit Magnetrührer im Eisbad gekühlt und mit Argon gespült. Dazu tropft man langsam eine Lösung von 101 mg (0,40 mmol, 1eq.) Ethinyl-G1,0-PAMAM-Dendron (**16**) in 0,3 mL Methanol im Argon-Gegenstrom zu und lässt das Eisbad Raumtemperatur annehmen. Nach 53 Stunden Reaktionszeit wurde die Lösung am Rotationsverdampfer bei 40 °C und unter Unterdruck eingengt. Nach Aufreinigung durch Säulenchromatographie (Silicagel, 15% Methanol in Ethylacetat) erhält man 145 mg (0,231 mmol, 68%) eines hellgelben Öls.

R_f 0,59 (MeOH/EtOAc 1:4).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.10 (s, 2H, NH), 3.67 (s, 12H, -OMe), 3.46 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H, HCC- CH_2 -N), 3.29 (dt, $J = 11,5, 5,6$ Hz, 4H, CH_2 -NHCO), 2.85 (t, $J = 6,6$ Hz, 4H, CH_2 CONH), 2.76 (t, $J = 6,7$ Hz, 8H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Me}$), 2.54 (t, $J = 5,9$ Hz, 4H, N CH_2 - CH_2 -NHCO), 2.41 (m, 12H), 2.19 (t, 1H, $J = 2,4$ Hz, HCC CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 173.21 (s), 172.03 (s), 77.46 (s), 77.37 (s), 73.51 (s), 53.16 (s), 51.80 (s), 49.56 (s), 49.44 (s), 37.24 (s), 34.04 (s), 32.89 (s).

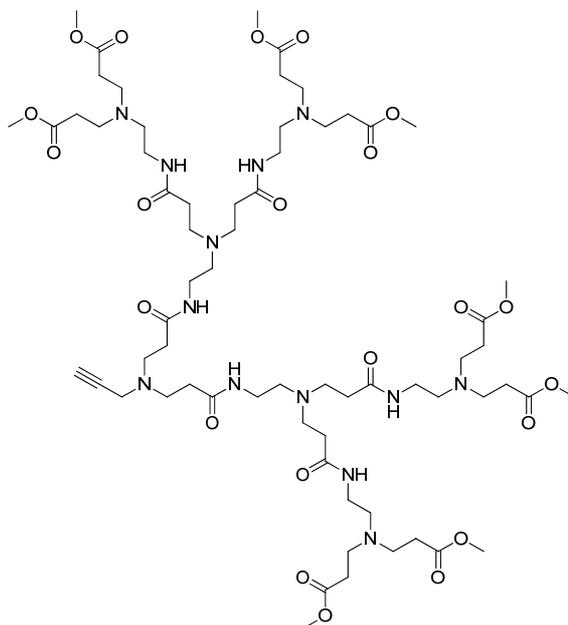
FD/MS (m/z): 628,4 g/mol - berechnet: $\text{M}+\text{H}^+$ 628,7 g/mol für M: $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_{10}$.

13. Ethinyl-G2,0-PAMAM-Dendron (17)

Eine Lösung aus 603 mg (0,961 mmol, 1eq.) Ethinyl-G1,5-PAMAM-Dendron (**16.1**) in 0,7 mL Methanol werden zu einer eiskalten Lösung aus 2,4 mL (2,31 g, 38 mmol, 40 eq.) Ethylendiamin in 0,3 mL Methanol im Argon-Gegenstrom zugetropft und dabei gerührt. Das Eisbad nimmt innerhalb von 1,5 Stunden Raumtemperatur an. Nach 72 Stunden Reaktionszeit verdünnt man mit 5 mL Methanol und engt die Reaktionslösung bei 40 °C und bei Unterdruck ein. Dann verdünnt man die Reaktionslösung mit 30 mL eines Lösungsmittelgemisches aus Methanol/Toluol (1:9) und engt bei 40 °C am Rotationsverdampfer ein, so dass das überschüssige Ethylendiamin azeotrop entfernt wird. Diesen Vorgang wiederholt man weitere fünfmal und entfernt zuletzt Toluol durch Zugabe von Methanol und azeotroper Destillation bei 40 °C mit Unterdruck. Nach Trocknung am Hochvakuum für 20 Stunden erhält man 737 mg (0,96 mmol, quant. Ausbeute, verunreinigt mit etwas MeOH) eines gelben hochviskosen Öls. Man bewahrt das Produkt unter Argon bei -18 °C auf.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.88 (t, 2H), 7.54 (t, 4H), 3.43 (d, $J = 2.2$ Hz, 2H), 3.27 (m, 12H), 2.81 (m, 12H), 2.73 (t, 8H), 2.51 (t, $J = 5.8$ Hz, 4H), 2.35 (m, 12H), 2.21 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H), 1.64 (s, 8H).

14. Ethinyl-G2,5-PAMAM-Dendron (17.1)



Eine Lösung aus 453 mg (0,612 mmol, 1 eq.) Ethinyl-G2,0-PAMAM-Dendron (**17**) in 2 mL Methanol wird in eine Mischung aus 3 mL (2,85 g, 33,1 mmol, 54 eq.) Methylacrylat und 1 mL Methanol unter Eiskühlung und starkem Rühren zugetropft. Man lässt das Eisbad innerhalb von 2 Stunden Raumtemperatur annehmen und rührt für weitere 18 Stunden. Nach Einengen bei 40 °C und vermindertem Druck liegen 825 mg eines gelben Rohproduktes vor, welches säulenchromatographisch aufgereinigt wird (Silicagel, Gradient 15% → 22% Methanol/Dichlormethan). Nach Trocknung am Hochvakuum erhält man 501 mg (351 μmol, 57%) eines hellgelben viskosen Öls.

R_f 0,63 (18% MeOH in DCM).

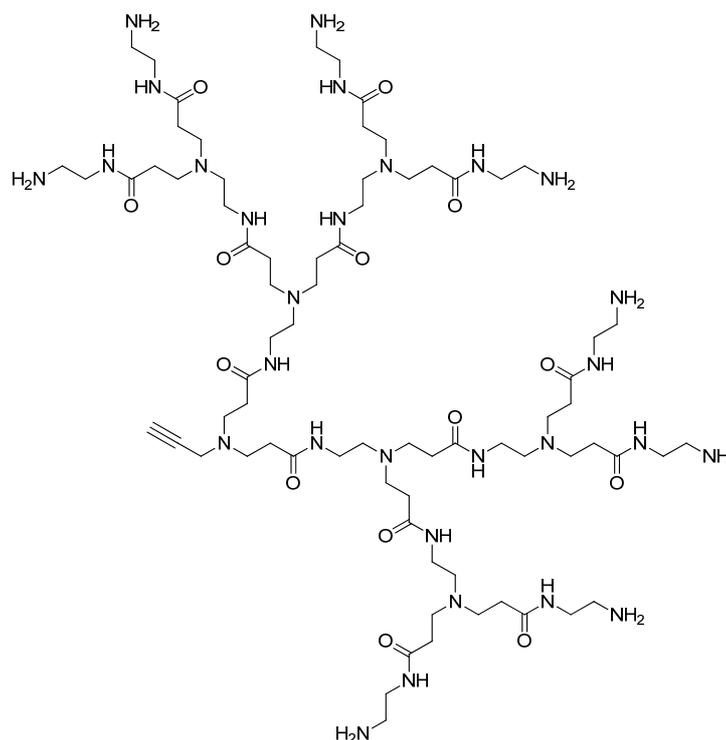
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.70 (s, 2H), 7.01 (s, 4H), 3.65 (s, 24H), 3.47 (d, $J = 2.2$ Hz, 2H), 3.25 (m, 12H), 2.76 (m, 28H), 2.60 (broad s, 4H), 2.52 (t, 8H), 2.38 (m, 28H), 2.26 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 173.56 (s), 172.46 (s), 73.73 (s), 53.49 (s), 52.04 (s), 50.58 (s), 50.01 (s), 49.84 (s), 37.71 (s), 34.41 (s), 33.25 (s).

FD/MS (m/z): 1429,7 g/mol - berechnet: $\text{M}+\text{H}^+$ 1429,7g/mol für M: $\text{C}_{65}\text{H}_{113}\text{N}_{13}\text{O}_{22}$.

MALDI-TOF (m/z): 1428 g/mol - berechnet: M^+ 1428,7g/mol für M: $\text{C}_{65}\text{H}_{113}\text{N}_{13}\text{O}_{22}$.

15. Ethinyl-G3,0-PAMAM-Dendron (18)

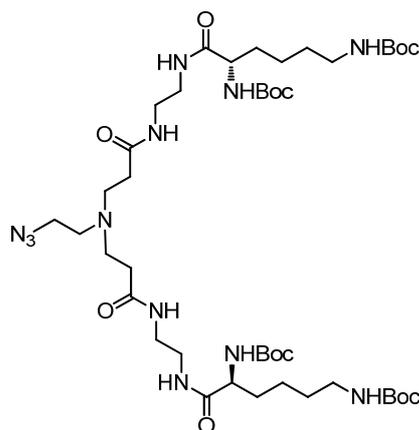


In einem 10 mL-Rundkolben mit Magnetrührer werden 2,5 mL (2,38 g, 40 mmol, 274eq.) Ethylendiamin in 0,4 mL Methanol gelöst und unter Rühren im Eisbad gekühlt. Der Kolben wird mit einem Septum verschlossen. Mit einer Spritze werden langsam 0,209 g (0,146 mmol, 1 eq.) Ethinyl-G2,5-PAMAM-Dendron (**17.1**), gelöst in 2,5 mL Methanol, unter starkem Rühren zugetropft. Nach 1,5 Stunden Reaktionszeit ist die Reaktionslösung orange gefärbt und man entfernt das Eisbad. Es wird weitere 40 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann die Reaktionslösung mit 15 mL eines Lösungsmittelgemisches aus Methanol/Toluol (1:9) verdünnt. Man engt bei 40 °C am Rotationsverdampfer ein, so dass das überschüssige Ethylendiamin azeotrop entfernt wird. Diesen Vorgang wiederholt man weitere viermal und entfernt zuletzt sukzessive das Toluol durch Zugabe von Methanol und azeotroper Destillation bei 40 °C mit Unterdruck. Nach Trocknung am Hochvakuum für 23 Stunden erhält man 251 mg (146 mmol, quant. Ausbeute, verunreinigt mit etwas MeOH) eines gelben, hochviskosen Öls.

¹H-NMR (700 MHz, MeOD): δ (ppm) = 3.48 (s, 2H), 3.26 (m, 28H), 2.80 (m, 28H), 2.74 (m, 16H), 2.59 (m, 2H), 2.38 (m, 28H), 2.21 (t, 1H).

¹³C-NMR (176 MHz, MeOD): δ (ppm) = 175.20 (s), 174.78 (s), 174.42 (s), 78.46 (s), 53.46 (d, J = 11.6 Hz), 51.13 (s), 50.73 (s), 49.85 (s), 42.84 (s), 42.23 (s), 42.01 (s), 38.62 (s), 35.01 (s), 34.80 (s).

16. Lysin Dendron: Azido-G1,0-PAMAM-(L-LysinNH_{Boc})NH_{Boc})₂ (23)



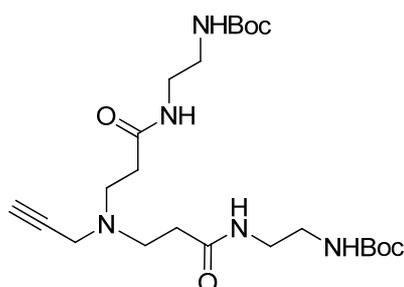
Es werden 218,6 mg (0,696 mmol, 1eq.) Azido-G1,0-PAMAM-Dendron (4) in 2 mL Dimethylformamid gelöst und der Kolben mit Argon gespült. Dazu werden im Argon-Gegenstrom 813 mg (1,738 mmol, 2,5eq.) N₂,N₆-Bis-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysine-(4-nitrophenyl)ester („*BocLys(Boc)ONp*“), gelöst in 1,0 mL DMF, zugegeben. Es tritt eine leichte Gelbfärbung auf. Man gibt 106 μ L (77,4 mg, 0,76 mmol, 1,1eq.) Triethylamin zu und beobachtet eine verstärkte Gelbfärbung. Nach 18 Stunden Rühren unter Argon gibt man 271 μ L (218 mg, 2,48 mmol, 3,57eq.) N,N-Dimethylethylendiamin (CAS 108-00-9) hinzu, um das unreaktierte Lysin zu deaktivieren und wasserlöslich zu machen. Nach drei Stunden Reaktionszeit wird mit 160 mL Ethylacetat verdünnt und die Reaktionslösung in einen Scheidetrichter überführt. Man wäscht nacheinander mit Natriumhydrogencarbonat (1 M, 3x 70 mL), halbgesättigter Kaliumcarbonat-Lösung (4x 70 mL), destilliertem Wasser (100 mL) und Natriumchlorid-Lösung (100 mL). Nach Trocknung unter MgSO₄ wird filtriert und im Vakuum eingengt. Nach Trocknung im Hochvakuum für zwei Stunden erhält man 481 mg (0,495 mmol, 72% Ausbeute).

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.47 (s, 2H, NHCO), 7.30 (s, 2H, NHCO), 5.58 (broad s, 2H, NH_{Boc}), 4.83 (broad s, NH_{Boc}, 2H), 4.09 (m, broad s, 2H, alphaCH), 3.37 (m, 10H, CH₂-N₃, CH₂-NHCO), 3.14 – 2.99 (m, 4H, CH₂-NH_{Boc}), 2.90 – 2.53 (m, 4H, CH₂-CON), 2.37 (t, J = 5.9 Hz, 4H, CH₂-N), 1.74 (broad s, 2H, Lys-Seitenkette), 1,63(broad s, 2H, Lys-Seitenk.), 1,50 (q, 4H, Lys-Seitenk.), 1.42 (d, 22H, Boc).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 173.43 (s), 172.99 (s), 156.23 (s), 155.96 (s), 79.82 (s), 79.04 (s), 70.54 (s), 54.66 (s), 49.15 (s), 40.02 (s), 39.97 – 39.88 (m), 38.93 (s), 34.03 (s), 32.43 (s), 29.58 (s), 28.41 (d), 22.71 (s).

MALDI-TOF (m/z): 971,3 g/mol und Abbauprodukte mit $-(n88)$ g/mol ($n = 1, 2$) - berechnet: M^+ : 971,2 g/mol für M: $C_{44}H_{82}N_{12}O_{12}$. Jeweils auch die Peaks für das Kalium- und Natriumsalz (+ 39 bzw. +23 g/mol)

17. Ethinyl-G1,0-PAMAM-Boc₂-Dendron (43)



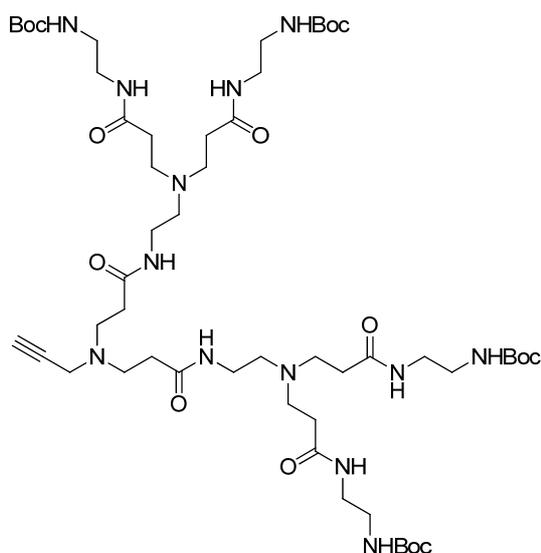
100 mg (0,353 mmol, 1eq.) Ethinyl-G1,0-PAMAM-Dendron (**16**) werden in 2 mL Dichlormethan und 0,5 mL Methanol in einem Rundkolben mit Magnetrührer gelöst. Man gibt 230 mg (1,06 mmol, 3eq.) Di-*tert*-butyldicarbonat hinzu und kühlt die Reaktionslösung im Eisbad. Nach Zugabe von 294 μ L (214 mg, 2,11 mmol, 6eq.) Triethylamin wird für 18 Stunden gerührt, während man das Eisbad langsam Raumtemperatur annehmen lässt. Die Reaktionslösung wird dann am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck und 40 °C eingengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Silicagel, Gradient 12% \rightarrow 17% MeOH in DCM) erhält man 123 mg (0,254 mmol, 72%) eines farblosen Feststoffes.

R_f 0,69 (10% MeOH in DCM).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 5.36 (s, 2H), 3.41 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H), 3.39 – 3.30 (m, 4H), 3.24 (m, 4H), 2.81 (t, $J = 5.9$ Hz, 4H), 2.35 (t, $J = 5.9$ Hz, 4H), 2.21 (t, $J = 2,3$ Hz, 1H), 1.43 (s, 18H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 172.67 (s), 156.84 (s), 79.48 (s), 77.27 (s), 73.77 (s), 49.38 (s), 40.98 (s), 40.30 (s), 40.04 (s), 33.67 (s), 28.42 (s).

FD/MS (m/z): 484,7 g/mol - berechnet: $M+H^+$ 484,6 g/mol für $C_{23}H_{41}N_5O_6$.

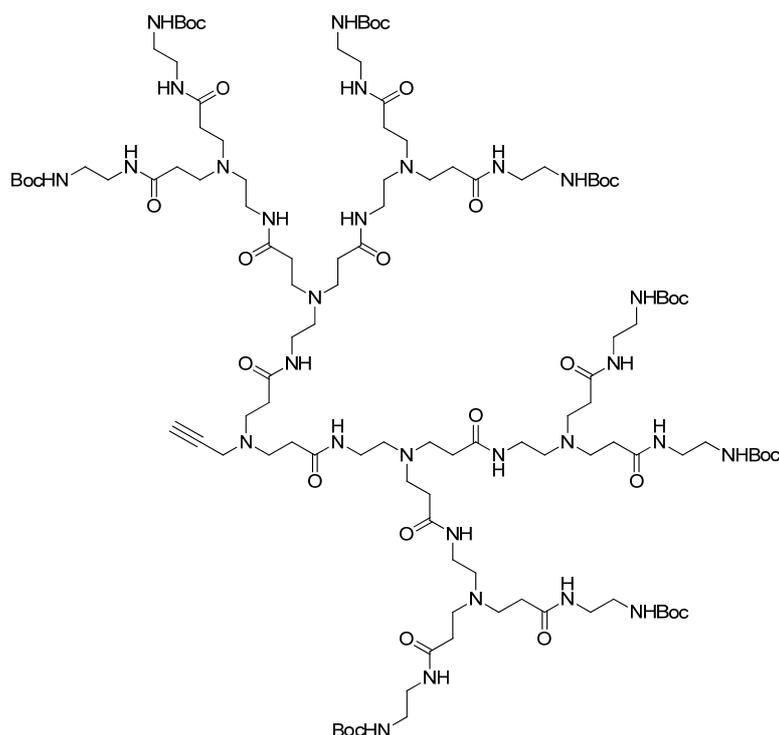
18. Ethinyl-G2,0-PAMAM-Boc₄-Dendron (43.1)

Es werden 284 mg (0,384 mmol, 1 eq.) Ethinyl-G2,0-PAMAM-Dendron (**17**) in 2 mL eines Lösungsmittelgemisches aus Dichlormethan/Methanol (7:3) gelöst und im Eisbad gekühlt. Zu dieser Lösung werden nacheinander 472 mg (2,162 mmol, 5,6eq.) Di-*tert*-butyldicarbonat und 544 μ L (397 mg, 3,93 mmol, 10,2eq.) Triethylamin zugegeben. Das Reaktionsgefäß wird mit einem Septum verschlossen und das Eisbad nach einer Stunde entfernt. Man rührt für weitere 70 Stunden bei Raumtemperatur und bricht die Reaktion durch Entfernen der flüchtigen Reaktionskomponenten bei 40 °C mit vermindertem Druck ab. Nach Aufreinigung durch Säulenchromatographie (Silicagel, Gradient 15% \rightarrow 22% Methanol/Dichlormethan) erhält man 216 mg (0,189 mmol, 67%) eines farblosen Feststoffes.

R_f 0,25 (20% MeOH in DCM).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.63 (s, 2H, NH_{inner}), 7.41 (s, 4H, NH_{outer}), 5.72 (s, 4H, NH_{Boc}), 3.44 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H), 3.36 – 3.12 (m, 20H, CH_2NH), 2.78 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CO}_{\text{inner}}$), 2.71 (t, $J = 5.8$ Hz, 8H, $\text{CH}_2\text{CO}_{\text{outer}}$), 2.52 (t, $J = 5.8$ Hz, 4H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2$), 2.33 (t, $J = 5.8$ Hz, 12H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.27 (s, 1H), 1.41 (s, 36H, $-\text{CH}_3$).

FD/MS (m/z): 1142,4 g/mol, 1164,5 g/mol, 1181,6 g/mol - berechnet: $\text{M}+\text{H}^+$ 1141,4 g/mol, $\text{M}+\text{Na}^+$ 1163,4 g/mol, $\text{M}+\text{K}^+$ 1179,5 g/mol für M: $\text{C}_{53}\text{H}_{97}\text{N}_{13}\text{O}_{14}$.

19. Ethinyl-G3,0-PAMAM-Boc₈-Dendron (43.2)

In einem 10 mL-Rundkolben mit Magnetrührer wurden 65 mg (39 μ mol, 1 eq.) Ethinyl-G3,0-PAMAM-Dendron (**18**) in 0,5 mL Methanol und 0,5 mL Dichlormethan gelöst. Es werden nacheinander 180 mg (82 μ mol, 20 eq.) Di-*tert*-butyldicarbonat und 81 μ L (60 mg, 0,59 mmol, 15 eq.) Triethylamin zugegen und an der Luft für 22 Stunden gerührt. Man engt bei 40 °C und vermindertem Druck ein und reinigt säulenchromatographisch auf (Silicagel, 4% Wasser, 16% Dichlormethan in Methanol). Als Produkt erhält man 14 mg (6 μ mol, 14%) eines hellgelben Feststoffes.

MALDI-TOF (m/z): 2454 g/mol und Abbauprodukte mit -(n88) g/mol (n = 1, 2, 3, 4) - berechnet: M⁺: 2454 g/mol für M: C₁₁₃H₂₀₉N₂₉O₃₀.

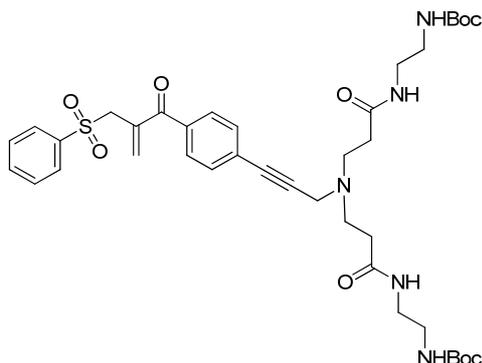
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.95 (s, 2H, NH_{G1}), 7.58 (broad, 6H, NH_{G2+G3}), 5.85 (broad s, 4H, NH_{Boc}), 3.45 (s, 1H, CH₂CCH), 3.40 – 3.24 (m, 44H), 2.90 – 2.63 (m, 28H), 2.53 (s, 12H), 2.36 (m, 28H), 2.24 (s, 2H, CH₂CCH), 1.42 (s, 81H, CH_{3,Boc}).

5.3.3 Monosulfon-Peptid-Linker

Die Vorschriften dieser Synthesen wurde durch Anne Pfisterer entwickelt und sind Teil Ihrer Doktorarbeit. Die Disulfid-Linker **28** und **29** wurden im Rahmen dieser Arbeit nach dem angegeben Synthesepan aus Kapitel 3.2 ausgehend vom 4-Iodacetophenon **30** nachsynthetisiert. Die Ergebnisse (Ausbeuten und Charakterisierungen) stimmen mit denen von Anne Pfisterer (Weil, Müllen *et al.*)^[111] überein.

5.3.4 Dendritische Monosulfon-Interkalatoren

20. Monosulfon-Linker-ethinyl-G1,0-PAMAM-Boc₂-Dendron (46)



In einem ausgeheizten, mit Argon befüllten Schlenkcolben werden 99 mg (205 μmol , 1eq.) Ethinyl-G1,0-PAMAM-Boc₂-Dendron (**43**) und 1,6 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst. Dazu gibt man nacheinander 94 mg (221 μmol , 1,07eq.) Iod-Monosulfon (**28**), 9 mg (23,6 μmol , 0,1 eq.) Kupfer(II)-iodid und 0,4 ml Triethylamin. Die Reaktionslösung wird in flüssigem Stickstoff abgekühlt, am Hochvakuum entgast und wieder unter einer Argonatmosphäre wieder aufgetaut. Man wiederholt diesen Vorgang weitere zweimal. Im Argongegenstrom werden 11 mg (15,6 μmol , 0,07eq.) Bis-(triphenylphosphin)palladium-(II)-chlorid zugegen und zweimal unter Stickstoffkühlung evakuiert. Dann wird unter Argonatmosphäre gerührt und man beobachtet nach etwa 15 Minuten einen Farbwechsel von orange bis dunkel-braun. Nach 12 Stunden Reaktionszeit wird mit 12mL Dichlormethan verdünnt und man wäscht mit Natriumhydrogencarbonat (1 M, 3 x 12 mL), Wasser (1 x 20 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x 10 mL). Es wird über MgSO₄

getrocknet, filtriert und bei 40 °C mit vermindertem Druck eingengt. Eine säulenchromatographische Aufreinigung (Silicagel, Gradient 5% → 10% Methanol in Dichlormethan) ergibt 100 mg (128 µmol, 63%) eines hellgelben Feststoffes.

R_f 0,57 (8% MeOH in DCM).

high-res ESI/MS (m/z): 782,3772 g/mol (100%), 783,3849 g/mol (37%), 784,3876 g/mol (11%) – berechnet: $M+H^+$: 782,3799 g/mol (100%), 783,3832 g/mol (43%), 784,3866 (9%) für M: $C_{40}H_{55}N_5O_9S$.

MALDI-TOF (m/z): 783 g/mol, 821 g/mol – berechnet: $M+H^+$: 783 g/mol, $M+K^+$ 821 g/mol für M: $C_{40}H_{55}N_5O_9S$.

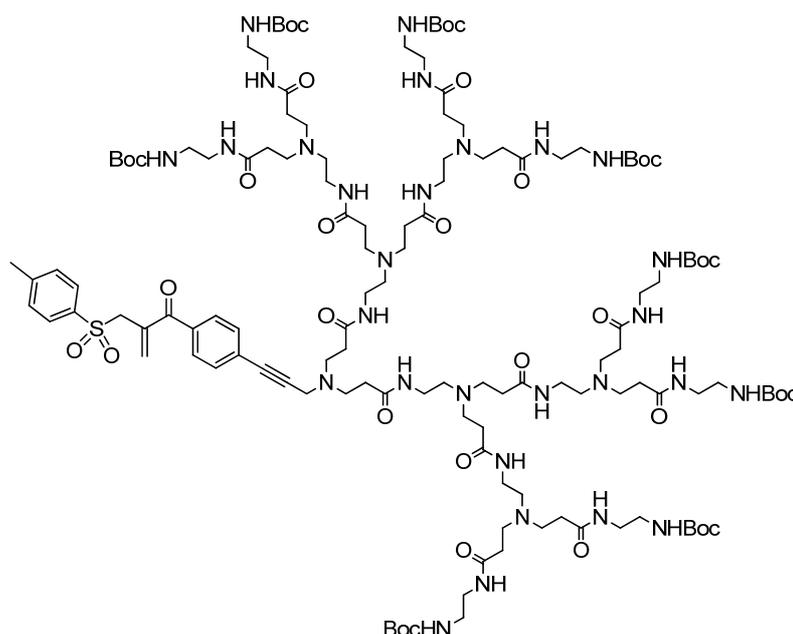
FD/MS (m/z): 782,2 g/mol - berechnet: M 782,0 g/mol, für M: $C_{40}H_{55}N_5O_9S$.

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.77 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.63 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.45 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.30 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.23 (s, 1H, H_{olefin}), 5.97 (s, 1H, H_{olefin}), 5.38 (t, 2H, $NHCOO$), 4.32 (s, 2H, SO_2CH_2), 3.65 (s, 2H, $CC-CH_2N$), 3.44 – 3.31 (m, 4H, CH_2NH_{amid}), 3.26 (m, 4H, CH_2CO), 2.88 (t, $J = 5.8$ Hz, 4H, $CH_2NH_{carbamat}$), 2.45 – 2.33 (m, 8H, $Ph-CH_3$, $(CH_2)_2NCH_2$), 1.43 (s, 18H, CH_3_{Boc}).

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 193.98 (s), 172.67 (s), 156.88 (s), 145.06 (s), 135.94 (s), 135.74 (s), 135.54 (s), 133.69 (s), 131.58 (s), 130.17 (s), 129.87 (s), 129.65 (s), 128.32 (s), 127.26 (s), 79.50 (s), 57.91 (s), 49.73 (s), 49.59 (s), 40.30 (s), 40.11 (s), 33.81 (s), 28.43 (s, CH_3_{Boc}), 23.50 (s), 21.65 (s).

FT-IR 520 (vs), 667, 708, 796, 843, 955, 987, 1151, 1250, 1315, 1365, 1454, 1522, 1658, 2335, 2362, 2931, 2978, 3080, 3315 (B) cm^{-1} .

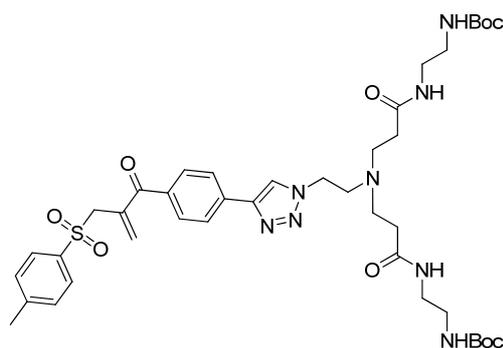
22. Monosulfon-Linker-ethinyl-G3,0-PAMAM-Boc₈-Dendron (48)



In einem ausgeheizten, mit Argon befüllten Schlenkcolben werden 71 mg (162 μmol , 3eq.) Iod-Monosulfon **28** und 4 mg (9,8 μmol , 0,2 eq.) Kupfer(I)-iodid eingewogen und drei Mal evakuiert und mit Argon geflutet. Getrennt davon werden 131 mg (53,4 μmol , 1eq.) Ethinyl-G3,0-PAMAM-Boc₂-Dendron (**43.2**) in 2 mL trockenem Tetrahydrofuran, 1 mL Dichlormethan und 0,6 mL Triethylamin gelöst. Die Lösung injiziert man im Argon-Gegenstrom in den Schlenkcolben und kühlt mit flüssigem Stickstoff ab. Am Hochvakuum wird das Reaktionsgefäß entgast und wieder unter einer Argonatmosphäre aufgetaut. Man wiederholt diesen Vorgang zwei weitere male. Im Argongegenstrom werden 4 mg (6 μmol , 0,11eq.) Bis-(triphenylphosphin)palladium-(II)-chlorid zugegen und zweimal unter Stickstoffkühlung evakuiert. Dann wird unter Argonatmosphäre gerührt und man beobachtet nach etwa 18 Stunden einen Farbwechsel von orange bis dunkel-braun. Nach 26 Stunden Reaktionszeit wird mit 40 mL Dichlormethan verdünnt und man wäscht mit Salzsäure (1 M, 3 x 50 mL), Wasser (1 x 20 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x 20 mL). Es wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und bei 40 °C mit vermindertem Druck eingengt. Man erhält 161 mg eines braunen Feststoffes als Rohprodukt, welcher nicht weiter aufgereinigt wurde. Daher wurde keine Ausbeute berechnet.

R_f ~0,05 (60% MeOH, 2% Wasser in DCM).

MALDI-TOF (m/z): 2282 g/mol, 2754 g/mol, 2734 g/mol, 2646 g/mol, 2562 g/mol, 2474 g/mol – berechnet: M+Cu⁺: 2816 g/mol, M⁺ 2752 g/mol für M: C₁₃₀H₂₂₃N₂₉O₃₃S.

23. Monosulfon-Linker-azido-G1,0-PAMAM-Boc₂-Dendron (39)

In einem Schlenkkolben werden 20 mg (39 μmol , 1eq.) Azido-G1,0-PAMAM-Boc₂-Dendron (36) in 0,4 mL Acetonitril gelöst, mit flüssigem Stickstoff gefroren und evakuiert. Im Argongegenstrom werden nacheinander 13,9 mg (43 μmol , 1,1eq.) Ethinyl-Monosulfon (29), 0,1 mL Dichlormethan, 1,36 μL (1,25 mg, 11,7 μmol , 0,3eq.) 2,6-Lutidin und eine Mikrospatelspitze (ca. 1mg, 0,06 eq.) Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat zugegeben. Man erhitzt unter Rühren für eine Stunde im Ölbad auf 70 °C und engt dann die Reaktionslösung bei 40 °C und vermindertem Druck ein. Nach Aufreinigung durch Säulenchromatographie (Silicagel, 15% Methanol in Ethylacetat) erhält man 29 mg (34 μmol , 88%) eines farblosen Feststoffes.

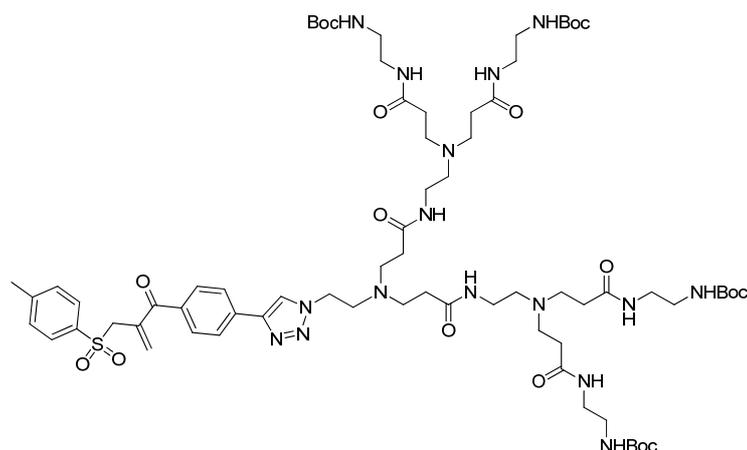
R_f 0,45 (15% MeOH in EtOAc)

FD/MS (m/z): 840,7 g/mol, 862,8 g/mol - berechnet: M+H⁺ 840,0 g/mol, M+Na⁺ 862,0 g/mol für M: C₄₁H₅₈N₈O₉S.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.07 (s, 1H, H_{triazol}), 7.91 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.83 – 7.72 (m, 4H), 7.32 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.60 (s, 2H, NH_{amid}), 6.22 (s, 1H, H_{olefin}), 6.03 (s, 1H, H_{olefin}), 5.26 (s, 2H, NHCO_{2,carbam}), 4.53 – 4.40 (t, 2H, triazol-CH₂), 4.34 (s, 2H, CH₂-SO₂), 3.08 (d, J = 6.7 Hz, 8H, CH₂NH_{amid}, CH₂NHCO_{2,carbam}), 3.01 – 2.89 (t, 2H, triazol-CH₂CH₂-N), 2.79 – 2.65 (t, 4H, CH₂CO), 2.40 (s, 3H, Ph-CH₃), 2.30 – 2.15 (m, 4H, N(CH₂)₂), 1.40 (s, 18H, CH₃,Boc).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 194.0 (s), 145.1 (s), 135.9 (t), 134.8 (s), 133.4 (s), 130.5 (s), 129.9 (s), 128.3 (s), 125.1 (s), 79.5 (s), 77.2 (s, teilweise von CDCl₃ verdeckt), 58.1 (s), 53.8 (s), 50.0 (s), 48.4 (s), 40.4 (s), 39.5 (s), 34.2 (s), 28.3 (s), 21.5 (s).

24. Monosulfon-Linker-azido-G2,0-PAMAM-Boc₄-Dendron (40)



In einem Schlenkcolben mit Magnetrührer werden 142 mg (121 μ mol, 1eq.) Azido-G2,0-PAMAM-Boc₄-Dendron (**37**) und 44 mg (136 μ mol, 1,1 eq.) Ethinyl-Monosulfon (**29**) in 3 mL Acetonitril und 1,5 mL Dichlormethan gelöst. Es werden 5 μ L (4,3 mg, 36 μ mol, 0,3 eq.) 2,6-Lutidin zugegeben und bei Raumtemperatur dreimal entgast (bis zum Sieden der Lösemittel) und mit Argon geflutet. Im Argongegenstrom werden 4,2 mg (11 μ mol, 0,09 eq.) Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat zugegeben und das Reaktionsgefäß verschlossen. Man beobachtet eine Grünfärbung bereits nach 10 min Reaktionszeit. Es wird im Ölbad für 60 min auf 70 °C erhitzt und dann lässt man weitere 10 Stunden bei Raumtemperatur rühren. Nach Beendigung der Reaktion wird mit 30 mL Dichlormethan verdünnt und mit NaHCO₃ (0,7 M, 3 x 10 mL), Wasser (1 x 20 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x 20 mL) gewaschen. Man trocknet über MgSO₄, filtriert den Feststoff ab und entfernt die Lösungsmittel bei 40 °C und vermindertem Druck. Nach einer Säulenchromatographie (Silicagel, Gradient 13% → 23% MeOH in DCM) erhält man 102 mg (68 μ mol, 56%) eines farblosen Feststoffes.

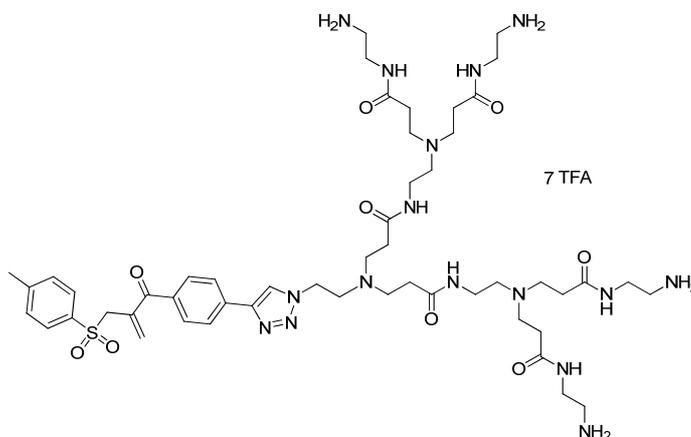
R_f 0,21 (18% MeOH in DCM).

high-res ESI/MS (m/z): 1517,8171 g/mol (100%), 1518,8258 g/mol (90%), 1519,8469 g/mol (31%), 1520,8556 – berechnet: M+Na⁺: 1517,8166 g/mol (100%), 1518,8200 g/mol (76%), 1519,8233 (29%), 1520,8267 (7%) für M: C₄₀H₅₅N₅O₉S.

MALDI-TOF (m/z): 1497 g/mol, 1535 g/mol – berechnet: M+H⁺: 1496 g/mol, M+K⁺ 1534 g/mol für M: C₄₀H₅₅N₅O₉S.

FD/MS	(m/z): 1518,6 g/mol - berechnet: $M+Na^+$ 1518 g/mol, für M: $C_{40}H_{55}N_5O_9S$.
1H -NMR	(300 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.38 (s, 1H, H_{triazol}), 7.98 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.79 (m, 4H), 7.47 (broad, 6H, NH_{amid}), 7.39 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.08 (s, 1H, H_{olefin}), 5.99 (s, 1H, H_{olefin}), 5.71 (s, 4H, NH_{Boc}), 4.52 (s, 2H, Triazol- CH_2), 4.34 (s, 2H, CH_2SO_2), 3.26 (m, 12H, CH_2NH_{amid}), 3.18 (d, $J = 4.7$ Hz, 10H, CH_2NH_{carbamat} , Triazol- CH_2CH_2N), 2.96 (s, 4H, $NHCH_2CH_2N$), 2.75 (s, 12H, CH_2CO), 2.44 (s, 3H, Ph- CH_3), 2.36 (s, 8H, $NCH_2CH_2CO_{\text{outer}}$), 2.27 (s, 4H, $NCH_2CH_2CO_{\text{inner}}$), 1.40 (s, 36H, $-CH_3_{\text{Boc}}$).
FT-IR	544, 667, 710 (s), 796, 860, 955 (s), 1039, 1167 (vs), 1250, 1365, 1454, 1525 (s), 1645 (vs), 1685, 2330, 2362, 2827, 2978, 3084, 3300 (VB) cm^{-1} .

25. Monosulfon-Linker-azido-G2,0-PAMAM-Dendron-TFA-Salz (42)



Zu 27 mg (18 μmol , 1eq.) gibt man 1 mL einer Mischung aus Trifluoressigsäure (0,5 mL, 0,74 g) und Dichlormethan (1:1). Man rührt für 2 Stunden bei Raumtemperatur und entfernt danach bei 40 °C und vermindertem Druck die flüchtigen Komponenten. Man erhält 44 mg (quant. Ausbeute) eines farblosen Feststoffes welcher in Methanol und Wasser, aber nicht in Dichlormethan löslich ist.

1H -NMR	(300 MHz, MeOD): δ (ppm) = 8.67 (s, 1H, H_{triazol}), 8.04 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.86 (m, 4H), 7.48 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.09 (s, 1H, H_{olefin}), 6.00 (s, 1H, H_{olefin}), 5.05 (NHCO), 4.50 (s, 2H, SO_2CH_2), 3.96 (NHCO), 3.59 (s, 8H),
------------	---

3.49 (t, $J = 5.9$ Hz, 16H), 3.36 (4H), 3.09 (t, $J = 5.8$ Hz, 8H), 2.91 – 2.67 (m, 12H), 2.47 (s, 3H, Ph- CH_3).

MALDI-TOF (m/z): 1095 g/mol, 1117 g/mol – berechnet: M^+ : 1095 g/mol, $M+Na^+$ 1118 g/mol für M: $C_{51}H_{82}N_{16}O_9S$.

5.3.5 Peptid-Modifikationen

26. Allgemeine Vorschrift zur Dendronisierung von 14-Somatostatin

Somatostatin (1eq.) und Tris(carboxyethyl)phosphin (TCEP) (2eq.) werden einer Mischung aus Acetonitril (oder DMF) und wässrigem PBS-Puffer (pH 6,2, 0,05 M) (2:3) gelöst. Dazu gibt man das Monosulfon-Dendron (1eq.) und inkubiert für mindestens 24 Stunden. Es können hierbei direkt Proben für die massenspektroskopische Untersuchung entnommen werden. Nach Detektion eines Produkt-Signals wird die Reaktionslösung am Gefriertrockner eingengt und man erhält einen farblosen Feststoff, welcher hauptsächlich aus Salzen der Pufferlösung besteht. Für die Aufreinigung durch HPLC löst man den Feststoff in 2 mL MeCN:Wasser (1:4) und zentrifugiert ungelöste Reste ab. Der Überstand wird auf die HPLC-Säule aufgetragen und nach der oben beschriebenen Methode eluiert.

27. Allgemeine Vorschrift zur Dendronisierung der RGDC-Peptid-Sequenz

Das RGDC-TFA-Salz (4eq.) und das Monosulfon-Dendron (1eq.) werden einer Mischung aus DMF, Acetonitril und wässrigem PBS-Puffer (pH 6,2, 0,05 M) (8:1:1) gelöst. Man inkubiert für mindestens 24 Stunden. Die Reaktionslösung wird am Gefriertrockner eingengt und man erhält einen farblosen Feststoff, welcher hauptsächlich aus Salzen der Pufferlösung besteht. Für die Aufreinigung durch HPLC löst man den Feststoff in 2 mL MeCN:Wasser (1:4) und zentrifugiert ungelöste Reste ab. Der Überstand wird auf die HPLC-Säule aufgetragen und nach der oben beschriebenen Methode eluiert.

6. Literatur

- [1] H. Staudinger, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1920**, *53*, 1073 – 1085.
- [2] P. J. Flory, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 2718.
- [3] A. C. Grimsdale, K. Müllen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5592 – 5629.
- [4] F. Vögtle, G. Richardt, N. Werner, *Dendritische Moleküle*, 1. Auflage; B.G. Teubner Verlag / GWV Fachverlage GmbH, Wiesbaden; Juni 2007.
- [5] R. Esfand, D. A. Tomalia, *Drug Disc. Today* **2001**, *8*, 427-436.
- [6] A. W. Bosman, H. M. Janssen, E. W. Meijer, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1665-1688.
- [7] D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, *Macromolecules* **1986**, *19*, 2466-2468.
- [8] E. Buhleier, W. Wehner, F. Vögtle, *Synthesis* **1978**, 155-158.
- [9] G. R. Newkome, Z.-Q. Yao, G. R. Baker, V. K. Gupta, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2003-2004.
- [10] R. G. Denkewalter, J. F. Kolc, W. J. Lukasavage, in *U.S. Pat. 4. 360.646*, **1979**, R. G. Denkewalter, J. F. Kolc, W. J. Lukasavage, in *U.S. Pat. 4.289.872*, **1981**; Denkewalter, J. F. Kolc, W. J. Lukasavage, in *U.S. Pat. 4.410.688*, **1983**.
- [11] C. Hawker, J. M. J. Fréchet, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 1010-1013.
- [12] D. A. Tomalia *et al.*, *Polymer J.* **1985**, *17*, 117-132.
- [13] Firma: Dendritech, Inc., 3110 Schuette Drive Midland, MI 48642, Internetseite: dendritech.com, Vertrieb durch Sigma-Aldrich, z. B. PAMAM-G10 Katalognummer: 536776.
- [14] T. M. Miller, T. X. Neenan, *Chem. Mater.* **1990**, *2*, 346-349.
- [15] F. Morgenroth, A. J. Berresheim, M. Wagner, K. Müllen, *Chem. Commun.* **1998**, 1139 – 1140.
- [16] D. Liu, S. De Feyter, M. Cotlet, A. Stefan, U.-M. Wiesler, A. Herrmann, D. Grebel-Köhler, J. Qu, K. Müllen, F. C. De Schryver, *Macromol.* **2003**, *36*, 5918 - 5925.
- [17] T. Weil, E. Reuther, K. Müllen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1900-1904.

- [18] M. S. Rajadurai, Z. B. Shifrina, N. V. Kuchkina, A. L. Rusanov, K. Müllen, *Russian Chemical Reviews* **2007**, *76*, 767-783.
- [19] A. Pron, M. Baumgarten, K. Müllen, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4236-4239.
- [20] S. Rosenfeldt, N. Dingenouts, M. Ballauff, N. Werner, V. Vögtle, P. Lindner, *Macromolecules* **2002**, *35*, 8098-8105.
- [21] S. Hervet, G. de Gennes, *J. Phys. Lett. (Paris)* **1983**, *44*, L351-L360.
- [22] S. Rosenfeldt, N. Dingenouts, D. Pötschke, M. Ballauff, A. J. Berresheim, K. Müllen, P. Lindner, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 111-114; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 109-112.
- [23] R. L. Lescanec, M. Muthukumar, *Macromolecules* **1990**, *23*, 2280-2288.
- [24] D. J. Cram, J. M. Cram, *Container Molecules and Their Guests* (Hrsg. F. Stoddart), Monographs in Supramolecular Chemistry, Royal Society of Chemistry, Cambridge **1994**.
- [25] M. W. P. L. Baars, R. Kleppinger, M. H. J. Koch, S.-L. Yeu, E. W. Meijer, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1341-1344; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1285-1288.
- [26] A. Dirksen, U. Hahn, F. Schwanke, M. Nieger, J. N. H. Reek, F. Vögtle, L. De Cola, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2036-2047.
- [27] S. Hecht, J. M. J. Fréchet, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 76-94; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 74-91.
- [28] M. Maus, R. De, M. Lor, T. Weil, U.-M. Wiesler, A. Herrmann, J. Hofkens, T. Vosch, K. Müllen, F. C. De Schryver; *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7668-7676.
- [29] R. Gronheid, J. Hofkens, F. Köhn, T. Weil, E. Reuther, K. Müllen, F. C. De Schryver, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2418-2419.
- [30] P. E. Froehling, *Dyes and Pigments* **2001**, *48*, 187-195.
- [31] L. Röglin, E. H. M. Lempens, E. W. Meijer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 102-112.
- [32] M. B. Steffensen, E. E. Simanek, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5178.
- [33] G. J. Kallos, D. A. Tomalia, D. M. Hedstrand, *J. Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1991**, *5*, 383-386.
- [34] J. W. Leon, J.M.J. Fréchet, *Polym. Bull.* **1995**, *35*, 449-455.

- [35] K. W. Pollak, E. M. Sanford, J. M. J. Fréchet, *J. Mater. Chem.* **1998**, *8*, 519-527.
- [36] C. J. Hawker, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7638.
- [37] J. M. J. Fréchet, C. J. Hawker, L. Wooley, *J. Macromol. Sc. Part A: Pure Appl. Chem.* **1994**, *A31*, 1627-1645.
- [38] R. Spindler, J. M. J. Fréchet, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, 913-918.
- [39] R. Klopsch, P. Franke, A. D. Schlüter, *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 1330-1334.
- [40] K. L. Wooley, C. Hawker, J. M. J. Fréchet, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 123-126.
- [41] K. E. Uhrich, S. Boegemann, J. M. J. Fréchet, S. R. Turner, *Polym. Bull.* **1991**, *25*, 551-558.
- [42] E. Constable, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1997**, 1073-1080.
- [43] C. B. Gorman, *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 295-309.
- [44] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056-2075.
- [45] J. W. Lee *et al.*, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 9193-9200.
- [46] J. W. Lee *et al.*, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4988-4991.
- [47] D. A. Tomalia, J. M. J. Fréchet, *J. Polym. Sc. Part A: Polym. Chem.* **2002**, *40*, 2719-2728.
- [48] **Übersicht:** D. A. Tomalia, A. Naylor, W. A. Goddard III, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 119-157; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, *29*, 138-175.
- [49] C. C. Lee, J. A. McKay, J. M. J. Fréchet, F. Szoka, *Nat. Biotech.* **2005**, *23*, 1517-1526.
- [50] J. W. Lee, B.-K. Kim, H. J. Kim, S. C. Han, W. S. Shin, S.-H. Jin, *Macromol.* **2006**, *39*, 2418-2422.
- [51] D. A. Tomalia, H. Baker, J. R. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, *Polym. J.* **1985**, *17*, 117-132.
- [52] J. W. Lee *et al.*, *J. Polym. Sc. Part A: Polym. Chem.* **2008**, *46*, 1083-1097.
- [53] H. Ringsdorf, *J. Polym. Sci. Polym. Symp.* **1975**, *51*, 135 - 153.
- [54] R. Haag, F. Kratz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1198 - 1215.
- [55] M. Nishikawa, Y. Takakura, M. Hashida, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1996**, *21*, 135-155.

- [56] N. Malik, E. G. Evagorou, R. Duncan, *Anticancer Drugs* **1999**, *10*, 767–776.
- [57] J. F. Kukowska-Latallo *et al.*, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 5317–5324.
- [58] J. Drobnik, F. Rypacek, *Adv. Polym. Sci.* **1984**, *57*, 1–50.
- [59] S. S. Nigavekar *et al.*, *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 476.
- [60] L. D. Margerum *et al.*, *J. Alloys Compd.* **1997**, *249*, 185–190.
- [61] J. C. Roberts, M. K. Bhalgat, R. T. Zera, *J. Biomed. Mater. Res.* **1996**, *30*, 53–65.
- [62] N. Malik *et al.*, *J. Control. Release* **2000**, *65*, 133–148.
- [63] E. R. Gillie, E. Dy, J. M. J. Fréchet, F. C. Szoka, *Mol. Pharm.* **2005**, *2*, 129–138.
- [64] S. H. Medina, M. E. H. El-Sayed, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 3141–3157.
- [65] D. G. v. d. Poll, H. M. Kieler-Ferguson, W. C. Floyd, S. J. Guillaudeu, K. Jerger, F. C. Szoka, J. M. J. Fréchet, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 764–773.
- [66] R. Duncan, L. Izzo, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 2215.
- [67] S. Hong *et al.*, *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15*, 774–782.
- [68] J. H. S. Kuo, M. S. Jan, H. W. Chiu, *J. Pharm. Pharmacol.* **2005**, *57*, 489–495.
- [69] M. El-Sayed, M. Ginski, C. Rhodes, H. Ghandehari, *J. Control. Rel.* **2002**, *81*, 355.
- [70] P. Singh, U. Gupta, A. Asthana, N. K. Jain, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2239–2252.
- [71] J. J. Khandare, S. Jayant, A. Singh, P. Chandna, Y. Wang, N. Vorsa, T. Minko, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 1464–1472.
- [72] C. Kojima, K. Kono, K. Maruyama, T. Takagishi, *Bioconjug. Chem.* **2000**, *11*, 910–917.
- [73] H. D. King *et al.*, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4336–4343.
- [74] H. R. Ihre, O. L. P. De Jesús, F. C. Szoka, J. M. J. Fréchet, *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 443–452.
- [75] Y. H. Choe *et al.*, *J. Control. Release* **2002**, *79*, 55–70.
- [76] G. Pasut, S. Scaramuzza, O. Schiavon, R. Mendichi, F. M. Veronese, *J. Bioact. Compat. Polym.* **2005**, *20*, 213–230.
- [77] R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Disc.* **2003**, *2*, 347–360.

- [78] R. Duncan, *Nat. Rev. Canc.*, **2006**, *6*, 688-701.
- [79] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, *Academic Press*, San Diego, 1996.
- [80] J. M. Harris, R. B. Chess, *Nat. Rev. Drug Disc.* **2003**, *2*, 214.
- [81] G. W. M. Vandermeulen, H. A. Klok, *Macromol. Bioscience* **2004**, *4*, 383.
- [82] A. Abuchowski, T. Vanes, N. C. Palczuk, F. F. Davis, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 3578.
- [83] V. Gaberc-Porekar, I. Zore, B. Podobnik & V. Menart, *Curr. Opin. Drug Disc. Devel.* **2008**, *11*, 242-250.
- [84] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U. S. Schubert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6288 – 6308.
- [85] M. A. Gauthier, H. A. Klok, *Chem. Comm.* **2008**, 2591.
- [86] S. Brocchini *et al.*, *Bioconj. Chem.* **2007**, *18*, 61-76.
- [87] S. Brocchini *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 312-313.
- [88] M. Zloh, S. Shaunak, S. Balan, S. Brocchini, *Nature Protocols* 2007, *2*, 1070-1083.
- [89] F. F. Schumacher, M. Nobles, C. P. Ryan, M. E. B. Smith, A. Tinker, S. Caddick, J. R. Baker, *Bioconj. Chem.* **2011**, ASAP.
- [90] Baker *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1960–1965.
- [91] E. H. M. Lempens, M. Merckx, M. Tirrell, E. W. Meijer, *Bioconj. Chem.* **2011**, ASAP.
- [92] Kochendoerfer *et al.*, *Science* **2003**, *299*, 884-887.
- [93] Kostiainen *et al.*, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 6912-6918.
- [94] M. A. Kostiainen, J. Kotimaa, M.-L. Laukkanen, G. M. Pavan, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 6912 – 6918.
- [95] F. M. Veronese, P. Caliceti, O. Schiavon, *J. Bioact. Compat. Polym.* **1997**, *12*, 196–207.
- [96] F. M. Veronese, C. Monfardini, P. Caliceti, O. Schiavon, M. D. Scrawen, D. Beer, *J. Controlled Release* **1996**, *40*, 199–209.
- [97] F. Wurm, J. Klos, H. J. Räder, H. Frey, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7955.

- [98] Y.C. Patel, M.T. Greenwood, R. Panettb, L. Demchyshyn, H. Niznik, C.B. Srikant, *Life Scienc.* **1995**, *57*, 1249-1265.
- [99] Y. C. Patel, *Frontiers in Neuroendocrinology* **1999**, *20*, 157–198.
- [100] B. M. Evers, D. Parekh, C. Townsend, J. C. Thompson, *Ann. Surg.* **1991**, *213*, 190-198.
- [101] I. S. Gottesman, L. J. Mandarino, J. E. Gerich, *Special Topics in Endocrinology and Metabolism* vol. 4 (Ed. Cohen, M., Foa, P.), S. 177–243, Alan R. Liss, New York, **1982**.
- [102] Y. C. Patel, T. Wheatley, *Endocrinology* **1983**, *112*, 220–225.
- [103] W. Bauer *et al.*, *Life Sci.* **1982**, *31*, 1134–1140.
- [104] S. Reichlin, Somatostatin. *N. Engl. J. Med.* **1983**, *309*, 1495–1501.
- [105] S. Reichlin, Somatostatin (2ter Teil), *N. Engl. J. Med.* **1983**, *309*, 1556–1563.
- [106] D. Liu *et al.* *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 9244–9250.
- [107] R. Teijeiro *et al.* *Cell. Physiol. Biochem.* **2002**, *12*, 31–38.
- [108] M. A. Zhuravel, N. E. Davis, S. T. Nguyen, I. Koltover, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9883.
- [109] S. M. Grayson, J. M. J. Fréchet, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3819-3867.
- [110] W. v. Grondelle, C. Valéri, *J. Struct. Biol.*, **2007**, *160*, 211-223.
- [111] A. Pfisterer, K. Eisele, X. Chen, M. Wagner, K. Müllen, T. Weil, **2011**, submitted.
- [112] Unveröffentlichte Ergebnisse der Dissertationsarbeit von A. Pfisterer, MPI für Polymerforschung, Mainz.
- [113] J. W. Lee *et al.*, *Bioconj. Chem.* **2007**, *18*, 579-584.
- [114] T. Mayer, M. E. Maier, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 4711–4720.
- [115] G. T. Anderson, J. R. Henry, S. M. Weinreb, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6946.
- [116] J. S. Yadav, B. V. S. Reddy, V. Geetha, *Synlett* **2002**, 513.
- [117] D. S. Reddy, W. R. Judd, J. Aubé, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3899–3902.
- [118] J. H. Boyer, R. Moriarty, B. de Darwent, P. A. S. Smith, *Chem. Eng. News* **1964**, *42*, 6.

- [119] Mulliken-Elektro negativitäten: Cl (8,3 eV), Br (7,5 eV), N₃ (7,7 eV), aus:
I. C. Tornieporth-Oetting, T. M. Klapötke, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 511 – 520.
- [120] E. Lieber, C. N. R. Rao, T. S. Chao, C. W. W. Hoffman, *Anal. Chem.* **1957**, *29*, 916–918.
- [121] K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 4467-4470.
- [122] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853-2855.
- [123] V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 51–68.
- [124] U. T. Rüegg, J. Rudinger, *Methods in Enzymology* **1977**, *47*, 111-116.
- [125] J. R. Baker Jr. *et al.*, *Chem. Comm.* **2005**, *46*, 5739-5741.
- [126] J. R. Baker Jr. *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **2009**, *20*, 1853–1859.
- [127] T. C. K. Heiden, E. Dengler, W. J. Kao, W. Heideman, R. E. Peterson, *Toxicology and Applied Pharmacology* **2007**, *225*, 70–79.

Danksagung

Ich danke meiner Projektleiterin Prof. Dr. Tanja Weil für die große Diskussionsbereitschaft sowie für Ihre kreativen Ratschläge. Sie betreute diese Arbeit mit großem Interesse zum Detail und stand auch aus der Ferne stets für hervorragende Diskussionen bereit. Für die Einladungen zu Ihrer Arbeitsgruppe an der Universität Ulm und die vielen Möglichkeiten mein Thema dort vorzutragen zu dürfen gilt Ihr ein herzliches Dankeschön.

Bei Anne Pfisterer bedanke ich mich für die unzähligen Diskussionen, für ihren wissenschaftlichen Rat sowie für ihre große Mühe meine Arbeit voranzutreiben und fortwährend kritisch zu beleuchten. Als direkte Betreuung meiner Arbeit gab sie mir Einführungen in sämtliche analytische Gerätschaften des Instituts und brachte mir das biochemische experimentelle Arbeiten an Peptiden bei. Ebenso stellte sie mir ihre eigenen Ergebnisse und Erfahrung als Basis meiner Arbeit zur Verfügung, wofür ich ihr einen besonderen Dank ausspreche. Unsere Zusammenarbeit hat stets gefruchtet.

Bei meinem Kooperationspartner Ng Yuen Wah David der Universität Ulm möchte ich mich für die Hilfe bei der Synthesepaltung sowie für seine Anregungen und Vorschläge für die Lösung der vielseitigen Problemstellungen während der Arbeit bedanken.

Neben Anne Pfisterer danke ich auch Thomas Schuster für die dauernde unterhaltsame Atmosphäre in unserem Labor 0.411. Sein stetes Interesse an meiner Arbeit und die daraus entstandenen Diskussionen sorgten immer für frische Motivation. Für die Messungen zahlreicher MALDI-TOF-Massenspektren und seinem Ehrgeiz für meine Zielstrukturen gilt ihm ein herzliches Dankeschönen.

Für die außerordentlich nette Atmosphäre im Büro 0.404 bedanke ich mich bei Khalid Chiad, Lukas Zöphel, Nguyen Tam, Anne Pfisterer und Ralf Moritz. Ihre Hilfe und Diskussionsbereitschaft hat immer für ein gutes Arbeitsklima gesorgt. Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle die fruchtbaren Gespräche mit Lukas Zöphel, der mich neben allen großartigen Unterhaltungen immer lehrreich an den Themen seiner Arbeit teilhaben lies.

Zuletzt geht mein Dank an die gesamte Arbeitsgruppe von Prof. Müllen für die Mithilfe zur Erstellung dieser Arbeit, den wissenschaftlichen Austausch, die zahlreichen Mittagessen und alle gemeinsamen Freizeitaktivitäten die für ein hervorragendes Arbeitsklima sorgten.