

Ein weit verzweigtes Transportsystem

Radiomarkierte intelligente Nanomoleküle für die Krebstherapie

Holger Stephan¹, Hartmut Spies¹, Bernd Johannsen¹,
Karsten Gloe², Uwe Hahn³ und Fritz Vögtle³

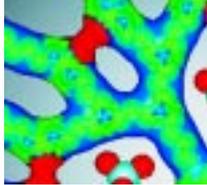
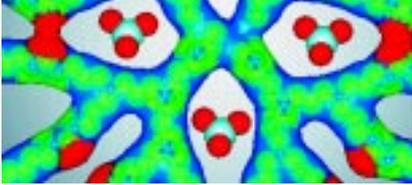
¹Institut für Bioanorganische und Radiopharmazeutische Chemie

²Institut für Anorganische Chemie, Technische Universität Dresden

³Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Universität Bonn

Weltweit werden jährlich zehn Millionen Neuerkrankungen an Krebs diagnostiziert, und diese Zahl wird sich in den nächsten zwanzig Jahren noch verdoppeln [1]. Noch immer sind die Therapieerfolge bei einigen aggressiven Tumoren oder generell im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit sehr begrenzt. Eine der großen Herausforderungen an die Medizin im 21. Jahrhundert besteht daher in der weiteren Vervollkommnung der Krebstherapie. Die Behandlung von Krebs erfolgt in der Regel durch einen chirurgischen Eingriff, durch externe Strahlentherapie oder Chemotherapie. Doch es gibt auch andere Möglichkeiten. Bei bestimmten Tumoren ist beispielsweise

se eine so genannte Radionuklidtherapie besonders wirksam. Bekanntestes Beispiel dafür ist die Behandlung von Schilddrüsenkarzinomen mit Iodid-131. Da sich Iod vor allem in der Schilddrüse anreichert, kann die Strahlung des Radionuklids dort direkt auf den Tumor einwirken. Ein weiteres viel versprechendes Konzept bei der Krebsbehandlung ist die Radioimmunotherapie. Hierbei werden Radionuklide an tumorsuchende Antikörper oder Fragmente von Antikörpern gekoppelt. Mit den Antikörpern gelangen die Radionuklide zum Tumor, wo die radioaktive Strahlung ihre zellzerstörende Wirkung entfalten kann. Gesundes Gewebe wird dabei weitgehend geschont.



Syntheschema zur Herstellung von Kaskadenmolekülen: Durch Umsetzung einer Verbindung mit zwei reaktiven Endgruppen (Diamin) mit einem ungesättigten Nitril gelangt man zu einem Molekül mit vier reaktiven Nitrilgruppen, aus dem durch einen nachfolgenden Reduktionsschritt die entsprechende Verbindung mit vier reaktiven Aminogruppen entsteht. Durch Wiederholung (repetitive Strategie) der Syntheschritte ist es möglich, Moleküle mit der jeweils doppelten Anzahl an reaktiven Endgruppen zu erzielen. So erzeugt man Generation für Generation (1. Generation: vier Endgruppen, 2. Generation: acht Endgruppen, 3. Generation: sechzehn Endgruppen...). Zunächst wurde für diese Verbindungsklasse der Begriff Kaskadenmoleküle eingeführt.

Dendrimermolekül der 5. Generation: Ein Dendrimer mit Polyamin-Grundgerüst. Es ist auf dem divergenten Syntheseweg zugänglich und weist 64 reaktive Aminogruppen an der Peripherie auf. Solche Moleküle werden bereits im Kilogramm-Maßstab hergestellt und sind auch mit Hydroxyl- oder Carbonsäuregruppen auf der Oberfläche käuflich.

Dendronmolekül der 3. Generation: Auf dem konvergenten Syntheseweg gelangt man zu Dendrons mit einer Polyetheraryl-Struktur, die beispielsweise bei der Entwicklung von künstlichen Enzymsystemen eine Rolle spielen [3].

In dem Zusammenhang gewinnt in jüngster Zeit eine neue Klasse chemischer Verbindungen an Bedeutung, die so genannten Dendrimere. Begonnen hat die Dendrimerchemie mit der Beschreibung von Kaskadenmolekülen – stark verzweigte baumartige Moleküle – im Jahre 1978 [2]. Eine zunächst verhaltene, aber nunmehr stürmische Entwicklung eines neuen Arbeitsgebietes war die Folge. Aus der Molekülarchitektur hat man die heute gebräuchliche Bezeichnung Dendrimer (griechisch: dendron = der Baum, meros = der Teil) für diese Stoffklasse abgeleitet.

Die Idee, Moleküle mit perfekter Verzweigung und einer bestimmten Anzahl funktioneller Gruppen aufzubauen, haben verschiedene Forschergruppen mit dem Ziel aufgegriffen, neue Materialeigenschaften zu erzeugen und damit vielfältige Anwendungsgebiete zu erschließen. In der Zwischenzeit haben sich sowohl die Synthesekunst als auch die Charakterisierungsmethoden verbessert, sodass Wissenschaftler zielgerichtet Struktur und Funktion solcher Moleküle einstellen können.

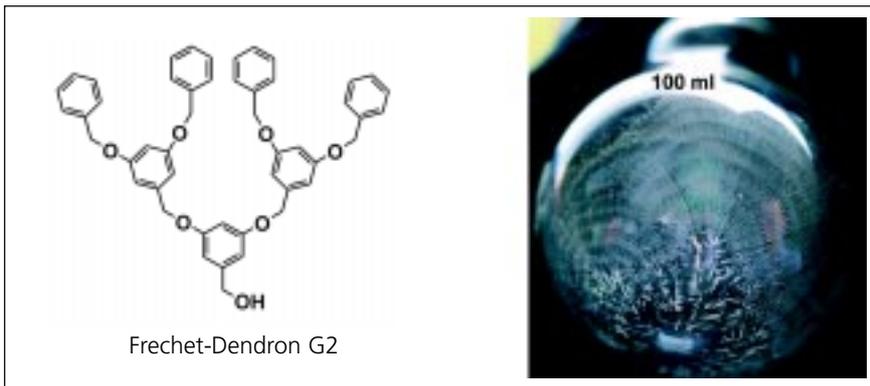
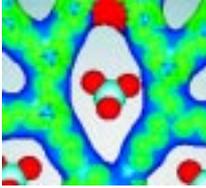
Für die Synthese der Dendrimer gibt es zwei verschiedene Konzepte. Zum einen geht man von einem Kernmolekül aus und ordnet darum herum von innen nach

außen Verzweigungseinheit für Verzweigungseinheit an (divergenter Weg). Auf diese Weise gelangt man beispielsweise zu Molekülen mit einem Polyamin-Grundgerüst. Eine weitere Möglichkeit, perfekt verzweigte Moleküle zu entwickeln, ergibt sich daraus, einzelne Äste (Dendrons), ausgehend von fokalen Gruppen, aufzubauen. In einem abschließenden Schritt kann man dann die Äste mit Hilfe dieser fokalen Gruppen mehrfach an einen gewünschten Kernbaustein heften (konvergenter Weg). Die erhaltenen Dendrimermoleküle weisen eine faszinierende Ästhetik auf und erinnern uns dabei an bekannte Struk-

turen aus unserem Leben – Korallen, Nervenzellen, ja sogar Bonsai sind ähnlich fein verzweigt. Mit etwas Glück erhält man sogar bei der Herstellung derartiger Moleküle im Laborkolben makroskopische Strukturen, die der Struktur auf molekularer Ebene entsprechen. Aufgrund vielfältiger Strukturvariationen, die sich sowohl für den Aufbau des Grundgerüsts als auch für die Modifizierung der Peripherie ergeben, lassen sich die Eigenschaften von Dendrimeren für die verschiedensten Anwendungsgebiete maßschneidern. Zu einem der attraktivsten Forschungsfelder gehört dabei zweifellos die Medi-



Beispiele aus dem täglichen Leben mit einer typischen Dendrimerstruktur: Nervenzelle (Foto links: Science 1999, 283, 1924); Bonsai (Mitte); Koralle (rechts).



Kristallisationsmuster, das bei der Herstellung eines so genannten *Frechet-Dendrons* der 2. Generation in einem 100-ml-Kolben entstand.

zin mit Anwendungen in Diagnostik und Therapie. Entwicklungsarbeiten zu neuen hochauflösenden Kontrastmitteln für die Abbildung von Blutgefäßen sowie zu synthetischen Impfstoffen und zu Arzneimitteltransportsystemen auf der Basis von Dendrimern sind im Gange [4]. Darüber hinaus sind Dendrimere als Enzym- und Liposomenmodelle sowie im Hinblick auf die Entwicklung synthetischer Zellen für die Molekular- und Zellbiologie interessant.

Knäuel oder Stäbchenform?

In Abhängigkeit von Art und Generation der verwendeten Verzweigungseinheiten sowie der an der Peripherie aufgepfropf-

ten Molekülteile überstreichen Dendrimere einen Größenbereich zwischen einem und zehn Nanometern (millionstel Millimeter). Niedrige Generationen haben eher eine flache seesternartige Form. Mit zunehmender Anzahl der Generation nehmen sie dann eine kugelige Gestalt an, und insbesondere in physiologischer Umgebung stabilisieren sie sich zu einem kompakten Knäuel. Der Durchmesser eines Dendrimers mit Polyamin-Grundgerüst der 4. Generation liegt in Lösung etwas unter vier Nanometer, der der 5. Generation liegt etwas darüber [5]. Dendrimere ab der 6. Generation – die mittlerweile nahezu strukturperfekt herstellbar sind – ähneln in Größe und Gestalt Biomolekülen wie globulären Pro-

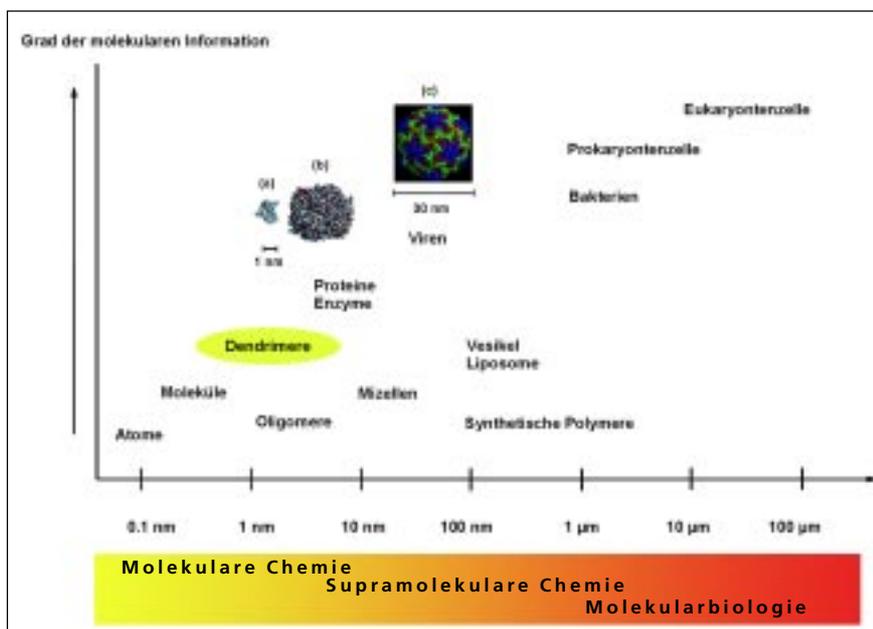
teinen und Enzymen. So erreicht man mit Dendrimern der 6. und 7. Generation die Größe und Gestalt von Hämoglobin (etwa sechs Nanometer), dem wichtigsten, mit der Atmung verbundenen Protein des Menschen.

Wir sind inzwischen auch in der Lage – durch den Einsatz von speziellen Kernmolekülen – die Gestalt der Dendrimere zu variieren. So müssen Dendrimere nicht mehr unbedingt eine kugelige Gestalt haben, sie können auch Stäbchenform aufweisen. Diese Form ist in der Natur ebenfalls weit verbreitet und tritt beispielsweise bei Bakterien oder Viren auf. Durch geschickte chemische Modifizierung an der Dendrimeroberfläche gelingt es weiterhin, einzelne Dendrimere zu stabilen Molekülverbänden zusammenzuschließen. Sie gruppieren sich unter bestimmten Bedingungen ohne äußeres Zutun, durch Selbstorganisation.

Somit können wir Strukturen erzeugen, die der Größe von Viren oder Liposomen entsprechen. Im Vergleich zu Bakterien oder einer menschlichen Zelle sind die derzeitigen Dendrimere beziehungsweise deren Molekülverbände allerdings sehr klein. Damit besitzt diese Stoffklasse ideale Größe und Eigenschaften, um sie zum Transport von Wirkstoffen in verschiedene Regionen des Körpers einzusetzen.

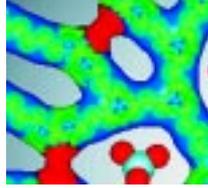
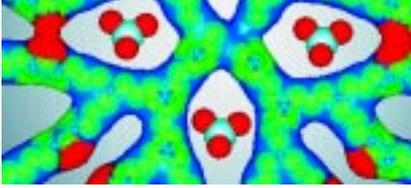
Dendrimere für die Krebstherapie?

Dendrimere mit einer positiven Oberflächenladung bilden hinreichend stabile Assoziate mit negativ geladenen Genen beziehungsweise der DNA aus. Sie können diese in eine Zelle und sogar bis in den Zellkern transportieren. Arbeiten an solchen nichtviralen Transportsystemen sollen es möglich machen, heilende Gene in kranke Zellen einzuschleusen [6]. Die Gentherapie ist ein hoffnungsvoller Ansatz, um zukünftig den Krebs zu besiegen.



Dimensionshierarchie von Atomen über Moleküle bis zu biologischen Zellen in Abhängigkeit vom Grad der molekularen Information.

(a – Polypropylenamin-Dendrimere der 3. Generation, b – Desoxyhämoglobin, c – Rhinovirus)



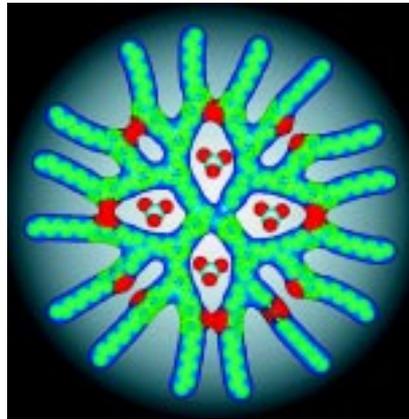
Eine weitere Möglichkeit bietet die Neutroneneinfangtherapie. Hierzu benötigt man Clustermoleküle, die eine möglichst große Anzahl von Isotopen mit einem hohen Einfangquerschnitt für thermische Neutronen aufweisen. Dazu gehören beispielsweise Bor-10 und Gadolinium-157. Heute sind Dendrimere bekannt, die 80 Bor- beziehungsweise über 250 Gadoliniumatome pro Molekül aufnehmen können [7, 8]. Nach einer Deponierung im Tumorgewebe müssen die Verbindungen mit einem externen Neutronenstrahl aktiviert werden. Erst dann erzeugen sie eine für das kranke Gewebe letale Strahlungsenergie.

Wir verfolgen einen anderen Weg, und zwar wollen wir eine hohe zelltoxische Strahlung direkt vor Ort bringen. Um das zu erreichen, packen wir radioaktive Moleküle fest in Dendrimere ein. Gleichzeitig modifizieren wir die Dendrimeroberfläche so, dass sie sich spezifisch in einem Tumorgewebe anreichert. Für eine derartige Anwendung sind hochwirksame Radionuklide notwendig, die beim Zerfall Partikel aussenden und Halbwertszeiten im Bereich einiger Stunden bis wenige Tage aufweisen. Es soll also genügend Zeit für die Herstellung der Verbindungen zur Verfügung stehen. Um die Strahlenbelastung zu minimieren, müssen auf der anderen Seite die Radionuklide in relativ kurzer Zeit in stabile Folgeprodukte übergehen.

Wir haben die Radioisotope Kupfer-64 und Rhenium-188 mit Halbwertszeiten von etwa dreizehn beziehungsweise sieben Stunden ausgewählt. Neben der gewünschten Partikelstrahlung (Beta-Strahlung) senden diese Isotope gleichzeitig Gammastrahlung aus, die es mit Hilfe einer speziellen Kamera erlaubt, die Verteilung der Radioaktivität zu erfassen und bildlich darzustellen. Darüber hinaus sind die Isotope leicht verfügbar. Kupfer-64 können wir im instituts-eigenen Zyclotron herstellen. Für die Gewinnung von Rhenium-188 nutzen wir einen geeigneten Generator, der auch in Kliniken aufgestellt werden kann. Die unterschiedliche Eindringtiefe der Strahlung in das Gewebe – etwa 0,2 Millimeter für Kupfer-64 und 11 Millimeter für Rhenium-188 – gestattet eine breite Anwendung für Tumore verschiedener Größe.

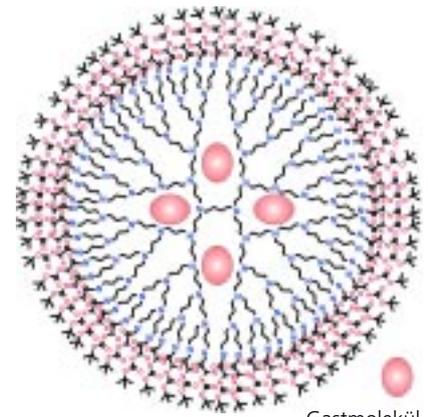
Maßgeschneidertes Nichts

Da Dendrimere definierte Hohlräume ausbilden, bieten sie die Möglichkeit, radioaktive Gastmoleküle einzulagern. Diese Eigenschaft haben wir uns zunutze gemacht und unter anderem harnstoffhaltige Dendrimere mit einem Polyamin-Grundgerüst entwickelt und eingesetzt. Die Verbindungen sind unter physiologischen Bedingungen im Inneren positiv geladen und können demzufolge negativ geladene Moleküle aufnehmen. So ist es möglich, das therapeutisch relevante Radionuklid Rhenium-188 in seiner stabilsten Form als Anion zu binden.



Computermodell eines harnstoffhaltigen Dendrimers der 3. Generation mit vier eingeschlossenen Perrhenat-Anionen.

Bei unseren Experimenten haben wir mit der Erhöhung der Generation verschiedene Abhängigkeiten festgestellt: Ein Dendrimer der 3. Generation kann bis zu vier Perrhenat-Anionen im Hohlraum aufnehmen. Untersuchungen an einem Dendrimer der 4. Generation haben gezeigt, dass bis zu acht Anionen im Hohlraum angeordnet sind. – Je höher die Generation, um so mehr Anionen können die Dendrimere aufnehmen; gleichzeitig steigt auch die Bindungsstärke. Im Tierversuch konnten wir nachweisen, dass der Organismus harnstoffhaltige Dendrimere gut verträgt und die Verbindungen eine günstige Bioverteilung aufweisen. Jedoch sind die elektrostatischen Wechselwirkungen noch zu schwach, um im Körper die radioaktiven Gastmoleküle am Dendrimer hinreichend stabil



Gastmolekül

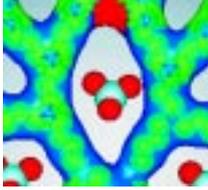
Dendritische Box mit eingeschlossenen Gastmolekülen.

zu binden. Hierzu ist ein weiterer Schritt notwendig.

Eine holländische Forschergruppe hat so genannte dendritische Boxen entwickelt, die beispielsweise Farbstoffmoleküle fest im Inneren des Dendrimers einschließen [9]. Dazu werden die negativ geladenen Farbstoffmoleküle durch das positiv geladene Polyamingerüst des Dendrimers gebunden. Anschließend pflöpfen die Wissenschaftler an der Peripherie des Dendrimers kovalent besonders voluminöse Aminosäurebausteine auf. Der Einschluss ist so stabil, dass erst nach Kochen in Salzsäure und dem damit verbundenen Abbau der Pflöpfe die Farbstoffmoleküle freigesetzt werden können. Dendritische Boxen dieser Struktur sind allerdings aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht für einen Einsatz unter physiologischen Bedingungen geeignet. Wir wollen nun versuchen, dendritische Boxen mit bioverträglichen Pflöpfen zu entwickeln, die radioaktive Gastmoleküle stabil einschließen und gleichzeitig einen zielgerichteten Transport in vivo ermöglichen.

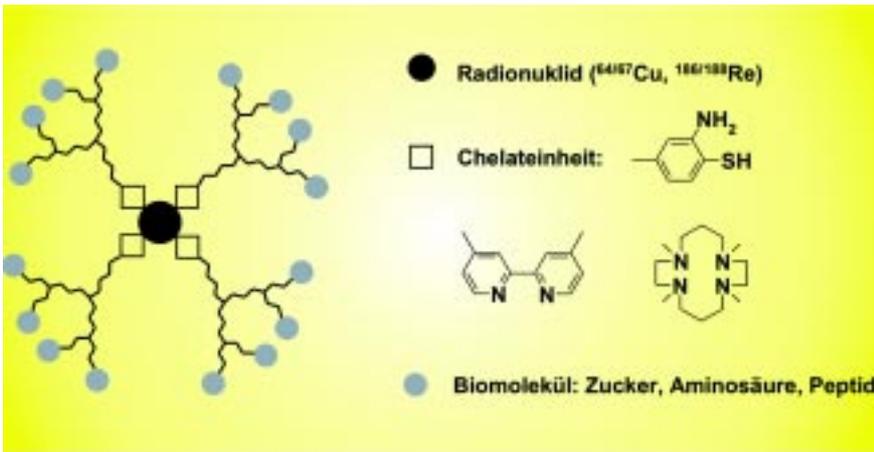
Umhüllte radioaktive Metalle

In biologischen Systemen binden metallhaltige Proteine das Metall durch eine komplexierende Einheit in ihrem Zentrum, außen herum sind Aminosäureketten angeordnet. Beispielsweise wird das Eisen im Hämoglobin durch einen Porphyrin-Ring komplexiert und ist von mehreren hundert Aminosäuren von der Umgebung abgeschirmt.

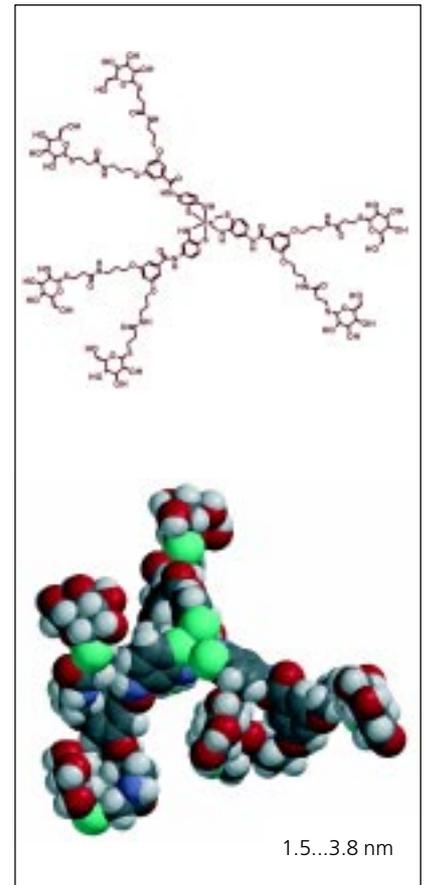


Die Nachahmung dieses häufig genutzten Konzepts erscheint besonders aussichtsreich im Hinblick auf ein festes Verpacken von radioaktiven Metallen. Daher wollen wir in analoger Weise die radioaktiven Isotope Kupfer-64 und Rhenium-188 mit Hilfe starker Chelatbildner fest binden und um dieses Kernmolekül Verzweigungseinheiten plazieren, die an der Oberfläche Biomoleküle wie Zucker, Aminosäuren und Peptide enthalten. Die Biomoleküle sollen eine Anreicherung im Tumorgewebe bewirken. Gegenwärtig arbeiten wir an rheniumhaltigen Dendrimeren mit sechs Glucosemolekülen an der Peripherie.

Die Herstellung weiterer Metallodendrimerer und die Charakterisierung ihres Verhaltens im sowie außerhalb des Körpers ist eine anspruchsvolle Aufgabe, die uns in den folgenden Jahren beschäftigen wird. Dazu ist die Zusammenarbeit von Experten aus unterschiedlichen Fachdisziplinen wie der klassischen Chemie, der supramolekularen Chemie (Chemie von Molekülverbänden auf der Basis von nichtkovalenten intermolekularen Wechselwirkungen) und der Molekularbiologie unerlässlich. Eine enge Kooperation des FZ Rossendorf mit der TU Dresden, der Universität Bonn, der TU Bergakademie Freiberg und dem Institut für Polymerforschung Dresden soll zum Gelingen dieses Vorhabens beitragen.



Konzeption für die Entwicklung nanoskopischer Dendrimerer mit eingekapselten Radionukliden für die Radioimmuntherapie.



Rheniumhaltiges Dendrimer der 1. Generation mit sechs Glucosemolekülen an der Peripherie.

Die Arbeiten werden vom Sächsischen Ministerium für Wissenschaft und Kunst gefördert.

Literatur

- [1] S. Plesničar, A. Plesničar: Cancer: A Reality in the Emerging World, *Semin. Oncol.* 2001, 28, 210-216.
- [2] E. Buhleier, W. Wehner, F. Vögtle: „Cascade“- and „Nonskid-Chain-like“ Synthesis of Molecular Cavity Topologies, *Synthesis* 1978, 155-158.
- [3] S. Hecht, J. M. J. Frechet: Dendritische Einkapselung von aktiven Zentren, *Angew. Chem.* 2001, 113, 76-94.
- [4] vgl. M. Fischer, F. Vögtle: Dendrimerer: vom Design zur Anwendung – ein Fortschrittsbericht, *Angew. Chem.* 1999, 111, 934-955; K. Inoue: Functional dendrimers, hyperbranched and star polymers, *Progr. Polym. Sci.* 2000, 25, 453-571.
- [5] D. Pötschke, M. Ballauf, P. Lindner, M. Fischer, F. Vögtle: Analysis of the Structure of Dendrimerer in Solution by Small-Angle Neutron Scattering using Contrast Variation, *J. Appl. Cryst.* 2000, 33, 605-608.
- [6] M. Weber: Neue Techniken zum Gentransfer in Eukaryontenzellen, *Nachr. Chem.* 2000, 48, 18-23.
- [7] B. Qualmann, M. M. Kessels, H.-J. Musiol, W. D. Sierralta, P. W. Jungblut, L. Moroder: Synthese Bor-reicher Lysindendrimerer zur Proteinmarkierung in der Elektronenmikroskopie, *Angew. Chem.* 1996, 108, 970-973.
- [8] H. Kobayashi, S. Kawamoto, T. Saga, N. Sato, T. Ishimori, J. Konishi, K. Ono, K. Togashi, M. Brechbiel: Avidin-dendrimer-(1B4M-Gd)₂₅₄: A Tumor-Targeting Therapeutic Agent for Gadolinium Neutron Capture Therapy of Intraperitoneal Disseminated Tumor Which Can Be Monitored by MRI, *Bioconjugate Chem.* 2001, 12, 587-593.
- [9] J. F. G. A. Jansen, E. M. M. de Brabander-van den Berg, E. W. Meijer: Encapsulation of Guest Molecules into a Dendritic Box, *Science* 1994, 266, 1226-29.

