

Synthese und Charakterisierung radiopaker Dendrimere zur Anwendung in der Röntgendiagnostik

vorgelegt von
Diplom-Chemiker
Markus Schäfer
aus Waibstadt

Von der Fakultät II – Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Herbert Schumann
Berichter: Prof. Dr. Jürgen Springer
Berichter: Prof. Dr. Karola Rück-Braun

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 26. Juli 2002

Berlin 2003

D 83

Schäfer, Markus:

Synthese und Charakterisierung radiopaker Dendrimere zur Anwendung in der Röntgendiagnostik / Markus Schäfer. –

Als Ms. gedr.. – Berlin : dissertation.de – Verlag im Internet GmbH, 2003

Zugl.: Berlin, Tech. Univ., Diss., 2002

ISBN 3-89825-639-1

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Copyright dissertation.de – Verlag im Internet GmbH 2003

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, auf Datenträgern oder im Internet und der Übersetzung, vorbehalten.

Es wird ausschließlich chlorfrei gebleichtes
Papier (TCF) nach DIN-ISO 9706 verwendet.
Printed in Germany.

dissertation.de - Verlag im Internet GmbH
Pestalozzistraße 9
10 625 Berlin

URL: <http://www.dissertation.de>

Abstract

Schäfer, Markus

Synthese und Charakterisierung radiopaker Dendrimere zur Anwendung in der Röntgendiagnostik

Unterschiedliche wasserlösliche, als makromolekulare Röntgenkontrastmittel dienende radiopake Dendrimere wurden durch polymeranaloge Umsetzungen von Triiodaromaten mit dem Poly(propylenimin)-Dendrimer DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄ erhalten. Die für den Röntgenkontrast maßgeblichen

Triiodaromaten sind über amidische Bindungen an das dendritische Grundgerüst gekoppelt worden. Durch die Wahl der Substituenten am Triiodaromaten sind die physikochemischen Eigenschaften wie Löslichkeit, Osmolalität und Viskosität, sowie das pharmakologische Verhalten, beispielsweise die Verträglichkeit und Ausscheidbarkeit der Verbindungen, so beeinflusst worden, dass vorgegebene Kriterien des Anforderungsprofils erfüllt werden.

Die radiopaken Dendrimere wurden mit mehreren polymeranalytischen Methoden eingehend charakterisiert. Die Ergebnisse der statischen Lichtstreuung und die der Gelpermeationschromatographie ergänzen sich bei der Bestimmung der Molmasse und Molmassenverteilung. Als weitere Methode zur qualitativen Beurteilung der dendritischen Endprodukte dient die Gelelektrophorese. Die hydrodynamischen Radien der Moleküle sind durch dynamische Lichtstreuung sowie durch viskosimetrische Untersuchungen, und Anwendung des *Einsteinschen* Viskositätsgesetzes, bestimmt worden. Durch Densitometrie wurden die Molekülradien der Produkte ermittelt. Die isoelektrische Fokussierung diente der Bestimmung der isoelektrischen Punkte, die zur Beurteilung der Löslichkeit beim physiologischen pH-Wert notwendig sind.

Alle untersuchten Röntgenkontrastmittel erfüllen das physikochemische Anforderungsprofil, das bei der *Schering AG*, Berlin in langjährigen Studien erarbeitet worden ist. Darüber hinaus belegen pharmakologische Untersuchungen erstmals die vollständige Ausscheidung eines dendritischen Röntgenkontrastmittels auf Basis eines POPAM-Grundgerüsts. Ebenso werden Verträglichkeiten gefunden, die deutlich oberhalb der für einen klinischen Einsatz geforderten Grenze liegen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Jürgen Springer in der Zeit vom August 1998 bis Juni 2002 angefertigt und war Teil eines vom BMBF-geförderten Projekts der Schering AG, Berlin sowie der TU Berlin.

Herrn Prof. Werner Krause von der *Schering AG* danke ich für die interessante Themenstellung.

Für die großzügige Übernahme der akademischen Betreuung sowie die gewährte Unterstützung und Anleitung möchte ich mich besonders herzlich bei Herrn Prof. Dr. J. Springer, Institut für Chemie, Fachgebiet Makromolekulare Chemie der TU Berlin bedanken. Frau Prof. Karola Rück-Braun danke ich sehr herzlich für ihre Bereitschaft, das Koreferat zu übernehmen.

Ein besonderer Dank gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung „*Medizinische Chemie VI*“ der *Schering AG*, für die hervorragende, kollegiale Zusammenarbeit und das herausragende Arbeitsklima:

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dr. Bernd Radüchel für sein reges Interesse an der Arbeit, seine großzügige Unterstützung und für das Abfassen der Patentanmeldungen bedanken. Ein herzliches Dankeschön möchte ich auch Herrn Dr. Franz Karl Maier aussprechen. Sein stets offenes Ohr für Probleme aller Art, seine wertvollen Tipps und Ratschläge sowie seine allzeit vorhandene Diskussionsbereitschaft haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ebenso danke ich Herrn Dr. Heiko Schirmer für viele hilfreiche Diskussionen und wertvolle Anregungen.

Ein großes Dankeschön möchte ich auch Frau Yvonne Duchstein, Herr Rainer Gottberg sowie Herrn Michael Höppner aussprechen, die mir mit Rat und Tat bei der analytischen und präparativen HPLC zur Seite standen.

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle aber bei Herrn Sebastian Schulze für seine äußerst tatkräftige, hervorragende Mitarbeit bedanken, ohne die wesentliche Teile dieser Arbeit nicht realisiert worden wären. Herrn Hermann Gundel danke ich für die gute Zusammenarbeit und die vielen interessanten Diskussionen zu Themen abseits der Chemie.

Auch allen hier nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Abteilung „*Medizinische Chemie VI*“ möchte ich an dieser Stelle nochmals ausdrücklich für die wunderbare Zusammenarbeit und ihre immer vorhandene Hilfsbereitschaft danken. Ich werde die gemeinsame Zeit immer in sehr guter Erinnerung behalten.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung „*Strukturanalyse*“ für die Anfertigung von NMR-, IR- und Massenspektren jeglicher Art sowie ihre Hilfe bei analytischen Fragestellungen. Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. Heribert Miklautz sowie allen Mitarbeitern der Abteilung „*Allgemeine Physikochemie*“ herzlich dafür bedanken, dass ich innerhalb der Arbeitsgruppe viskosimetrische Messungen durchführen konnte. Mein Dank gilt auch Herrn Daniel Keller, für die Durchführung der dynamischen Lichtstreuexperimente. Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Björn Riefke, Herrn Wolf-Rüdiger Press sowie allen Mitarbeitern/Innen sehr herzlich für die Durchführung der physikochemischen und pharmakologischen Untersuchungen danken.

Ein großes Dankeschön möchte ich an dieser Stelle Herrn Dr. Mirsad Selimovic aussprechen, der mir bei polymeranalytischen Fragestellungen stets hilfreich zur Seite stand und mir die notwendigen Einweisungen zum Bedienen der Messgeräte gab. Bei Frau Dipl.-Chem. Angelika Menner bedanke ich mich sehr herzlich für die Durchführung der gelelektrophoretischen sowie einiger GPC-Untersuchungen. Frau Hannelore Oehlert danke ich für das Gießen der Gele; ohne diese wären die gelelektrophoretischen Untersuchungen nicht möglich gewesen. Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des AK Springer gilt ausdrücklich mein herzliches Dankeschön für die freundliche Aufnahme und die allzeit vorhandene Hilfsbereitschaft. Weiterhin danke ich herzlich Frau Astrid Müller, TU Berlin, für die Durchführung von DSC- bzw. IR-Messungen.

Für die kritische Durchsicht des Manuskripts möchte ich mich an dieser Stelle namentlich bei Herrn Dr. Joachim Rübner, Herrn Dr. Heiko Schirmer und Herrn Dr. Mirsad Selimovic bedanken.

Für die freundschaftliche Verbundenheit über viele gemeinsame Studienjahre, vor allem aber auch nach meinem Weggang aus Freiburg, in denen diese freundschaftlichen Banden immer bestanden haben, möchte ich Frau Dipl.-Chem. Astrid Schneider, Herrn Dipl.-Chem. Horst Brombacher, Herrn Dr. Dirk Badura sowie Herrn Dr. Ralf Appelt herzlich danken - ich bin froh und dankbar einen Teil meines beruflichen Weges gemeinsam mit Euch beschritten zu haben.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und dabei besonders meinen Eltern. Für ihre Liebe und ihr Vertrauen, das sie mir geschenkt haben und dafür, dass meine Eltern immer für mich da gewesen sind, in guten wie in schlechten Tagen, möchte ich mich an dieser Stelle von ganzem Herzen bedanken.

Ganz besonders danke ich aber meiner Frau Silke für das größte und wunderbarste Geschenk, das ein Mensch einem anderen Menschen geben kann – die Liebe!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
2	Aufgabenstellung	13
3	Theoretischer Teil	15
3.1	Niedermolekulare Kontrastmittel	15
3.1.1	Physikochemische Eigenschaften	17
3.1.2	Pharmakokinetik und Biodistribution	18
3.2	Makromolekulare Kontrastmittel	18
3.2.1	Lineare und verzweigte makromolekulare Röntgenkontrastmittel	18
3.2.2	Dendritische Röntgenkontrastmittel	19
3.2.2.1	Dendrimere	19
3.2.2.2	Anforderungsprofil an radiopake Reste	25
4	Ergebnisse und Diskussion	27
4.1	Synthesen	27
4.1.1	Synthese der radiopaken Reste	27
4.1.1.1	Synthese der acetylierten Ausgangsverbindungen 4a und 4b	30
4.1.1.2	Synthese von GRR 1 und GRR 2	31
4.1.1.3	Synthese von GRR 3 und GRR 4	34
4.1.1.4	Synthese von GRR 5 und GRR 6	36
4.1.1.5	Synthese von GRR 7	38
4.1.1.6	Synthese von Bis-(2,2-dimethyl-[1,3]dioxolan-4ylmethyl)amin (26)	39
4.1.1.7	Synthese von GRR 8	40
4.1.2	Synthese der dendritischen Röntgenkontrastmittel	41
4.1.2.1	Allgemeines Syntheschema	41
4.1.2.2	Übersicht der synthetisierten dendritischen Röntgenkontrastmittel	43
4.2	Gelpermeationschromatographie (GPC)	45
4.2.1	Theoretische Grundlagen	45
4.2.2	Größenausschlußchromatographie dendritischer Röntgenkontrastmittel	47
4.2.2.1	Analytik der eingesetzten Chargen von DAB-dendr-(NH ₂) ₆₄	52
4.2.2.2	Einfluss der Eichsubstanz auf die ermittelten Molmassen	57
4.2.2.3	Untersuchungen zur chemischen Beständigkeit bei der Hitzesterilisation	58
4.3	Statische Lichtstreuung	61

4.3.1	Theoretische Grundlagen	61
4.3.2	Bestimmung des spezifischen Brechungsindexinkrements (dn/dc).....	65
4.3.3	Statische Lichtstreuung an dendritischen Röntgenkontrastmitteln	68
4.4	Dynamische Lichtstreuung.....	74
4.4.1	Theoretische Grundlagen	74
4.4.2	Dynamische Lichtstreuung an dendritischen Röntgenkontrastmitteln.....	77
4.5	Viskosimetrie	80
4.5.1	Theoretische Grundlagen	80
4.5.2	Rotationsviskosimetrische Untersuchungen dendritischer Röntgenkontrastmittel..	87
4.5.3	Kapillarviskosimetrische Untersuchungen dendritischer Röntgenkontrastmittel	91
4.6	Densitometrie	99
4.6.1	Theoretische Grundlagen	99
4.6.2	Densitometrische Untersuchungen dendritischer Röntgenkontrastmittel	100
4.7	Elektrophoretische Methoden	105
4.7.1	Gelelektrophorese.....	105
4.7.1.1	Theoretische Grundlagen	105
4.7.1.2	Gelelektrophoretische Untersuchungen dendritischer Röntgenkontrastmittel.....	106
4.7.2	Isoelektrische Fokussierung	110
4.7.2.1	Theoretische Grundlagen	110
4.7.2.2	Isoelektrische Fokussierung dendritischer Röntgenkontrastmittel	111
4.8	Physikochemische und pharmakologische Untersuchungen.....	115
5	Experimenteller Teil.....	125
5.1	Allgemeines.....	125
5.2	Synthese der radiopaken Reste.....	127
5.3	Synthese der dendritischen Röntgenkontrastmittel	151
6	Zusammenfassung und Ausblick	159
7	Anhang	163
7.1	Liste häufig verwendeter Abkürzungen und Symbole.....	163
7.2	Erläuterung der medizinischen Fachausdrücke.....	167
7.3	Lebenslauf	172
8	Literaturverzeichnis.....	173

1 Einleitung

Die Fähigkeit hochenergetischer elektromagnetischer Strahlung unterschiedlichste Materie zu durchdringen wurde im Jahr 1885 von Wilhelm Conrad Röntgen entdeckt. Diese Entdeckung war gleichzeitig die Geburtsstunde der bildgebenden Diagnostik. Röntgenuntersuchungen sind heutzutage aus der modernen Medizin nicht mehr wegzudenken. Die Intensität von Röntgenstrahlen nimmt auf dem Weg durch das zu untersuchende Gewebe aufgrund von Absorptions- und Streuvorgängen ab. Diese Schwächung ist abhängig von der Energie der Strahlung, der durchstrahlten Schichtdicke und von der Dichte und der Ordnungszahl der in den Molekülen vorhandenen Atome^[1]. Die Knochen und die lufthaltige Lunge liefern bei der Durchleuchtung einen ausreichenden natürlichen Kontrast für die Interpretation der erhaltenen Bilder. Dagegen haben andere Organe eine sehr ähnliche chemische Zusammensetzung und damit zu geringe Absorptionsunterschiede, man bezeichnet sie daher als röntgenanonym^[2]. Schon kurze Zeit nach der Entdeckung der Röntgenstrahlung war Iod als kontrastgebende Substanz bekannt^[3]. Osborne, Sutherland, Scholl und Rowntree wandten Natriumiodid zur intravenösen Urographie an. Wegen der hohen Toxizität des freien Natriumiodids mußte das Verfahren allerdings trotz des guten Kontrasts wieder aufgegeben werden^[4]. Im Jahr 1925 synthetisierten Binz und Raeth iodierte Pyridinverbindungen^[4] deren Weiterentwicklungen als „Selectan neutral“ bzw. „Uroselectan“ in der Diagnostik des Harntraktes eingesetzt wurden. Anfang der fünfziger Jahre wurden die ersten Röntgenkontrastmittel auf Basis der Triiodbenzoesäure (Bild 1.1) eingeführt, und schon nach kurzer Zeit hatten sich diese fast vollständig in der bildgebenden Röntgendiagnostik durchgesetzt.

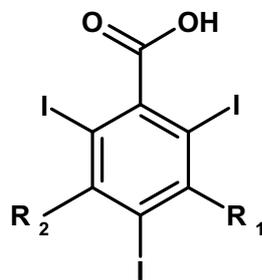


Bild 1.1: Grundstruktur von Röntgenkontrastmitteln auf Basis der Triiodbenzoesäure

Das zugrunde liegende Strukturelement verbindet eine unübertroffen feste Kohlenstoff-Iod-Bindung mit einem gleichzeitig extrem hohen Iodgehalt von 84 %. Daneben bieten die drei verbleibenden Positionen ein breites Potential, um durch die Variation der Substituenten R₁ und R₂ die physikochemischen und biologischen Eigenschaften zu beeinflussen^[2].

Die heute routinemäßig in der klinischen Praxis der Uro- oder Angiographie eingesetzten Röntgenkontrastmittel sind sehr gut wasserlösliche Verbindungen mit niedrigen osmotischen Drucken wie beispielsweise Ultravist[®], Omnipaque[®] oder Solustrast[®]^[5].

Die pharmakokinetischen Eigenschaften all dieser Kontrastmittel sind nahezu identisch^[6]. Nach der intravaskulären Injektion erfolgt eine schnelle Verteilung der Substanzen und eine abschließende renale Ausscheidung mit einer Halbwertszeit von 1-2 h. Das Verteilungsvolumen beträgt dabei ca. 0,25 l/kg Körpergewicht und korrespondiert mit dem gesamten extrazellulären Raum des Körpers^{[7], [8]}. Der Prozeß des Übertritts von Kontrastmittelmolekülen aus den Blutgefäßen in den Extrazellularraum wird als Extravasation bezeichnet. Bedingt durch seine rasche Verteilung über ein relativ großes Volumen sinkt die Konzentration eines Kontrastmittels in den Blutgefäßen bereits sehr kurz nach dessen Injektion. Das Zeitfenster für eine erfolgreiche Röntgenaufnahme ist daher schmal.

Die Endothelmembran der Blutgefäße enthält relativ große Poren mit einem Durchmesser von annähernd 12 nm. Während diese Poren folglich von kleinen Molekülen wie zum Beispiel Wasser oder auch von den oben genannten Kontrastmittelmolekülen relativ leicht passiert werden, sind sie für größere Moleküle ab einer Molmasse von ca. 20000 g/mol nahezu undurchlässig. Der Prozeß der Extravasation läßt sich durch die Erhöhung der Molmassen und Molekülradien von Kontrastmittelmolekülen unterdrücken bzw. deutlich verlangsamen^[6].

Zahlreiche lineare und verzweigte makromolekulare Substanzen wurden als Trägermaterialien für Kontrastmittel vorgeschlagen^{[9], [10], [11]}. Keine dieser Verbindungen hat jedoch Einzug in die klinische Praxis erfahren. Die Gründe dafür liegen in der Toxizität der beschriebenen Substanzen, in deren unvollständiger Ausscheidung, in den Inhomogenitäten der beschriebenen makromolekularen Kontrastmittel sowie der teilweise fehlenden Reproduzierbarkeit der Synthese^[6]. Da nach wie vor ein Bedarf an klar definierten, gut verträglichen makromolekularen Kontrastmitteln vorhanden ist, haben sich die neueren Forschungen u.a. auf dendritische Strukturen fixiert^{[6], [7]}.

Die seit rund zwei Jahrzehnten bekannten Dendrimere sind synthetische, monodisperse Makromoleküle mit einer definierten Struktur, die durch eine iterative Abfolge von

Reaktionsschritten synthetisiert werden^{[12], [13]}. Die bekanntesten Vertreter dieser neuartigen Verbindungsklasse, die PAMAM-Dendrimere^{[14], [15]} und die POPAM-Dendrimere^[16], sind bereits kommerziell erhältlich^[17]. Die große Homogenität, Globularität und molekulare Einheitlichkeit der Dendrimere sowie ihre kommerzielle Verfügbarkeit macht diese Verbindungsklasse als Trägermaterialien für makromolekulare Röntgenkontrastmittel interessant^{[6], [18]}.

In den Forschungslaboratorien der *Schering AG* Berlin wurden zahlreiche dendritische Röntgenkontrastmittel synthetisiert und bezüglich ihrer pharmakologischen Eigenschaften untersucht. Als dendritische Trägersubstanzen kamen vor allem die von Tomalia beschriebenen PAMAM-Dendrimere^{[14], [15]} der Generationen 3 und 4 mit 24 bzw. 48 Amino-Endgruppen, die von Meijer eingeführten POPAM-Dendrimere^[16] der Generationen 4 und 5 mit 32 bzw. 64 Amino-Endgruppen und die unterschiedlichsten Polylysine^[19] zum Einsatz. Die Dendrimere wurden mit verschiedenen radiopaken Resten derivatisiert und deren physikochemischen Eigenschaften wie zum Beispiel Viskosität und Osmolalität sowie das pharmakologische Verhalten studiert. Die pharmakologischen Untersuchungen dieser Substanzen zeigten deutliche Unterschiede in bezug auf die Toxizität und die Ausscheidungskinetik. Wie Studien weiter ergeben, sind nur die POPAM-Dendrimere und Polylysine als Grundgerüste für die Synthese dendritischer Röntgenkontrastmittel geeignet^[20]. In diesen Verbindungsklassen ist eine ausreichende chemische Beständigkeit vorhanden. Dies ist eine Voraussetzung für die im Produktionsprozeß und bei der Anwendung zwingend notwendige Hitzesterilisation der Produkte^[21].

2 Aufgabenstellung

Ausgehend von den zuvor genannten Befunden sollten im Rahmen dieser Arbeit Triiodaromaten durch geeignete Synthesen optimiert und mit POPAM-Dendrimeren der 5. Generation in einer polymeranalogen Umsetzung verknüpft werden. Die eingehende Charakterisierung der dendritischen Röntgenkontrastmittel sollte anschließend unter Verwendung der nachfolgenden polymeranalytischen Untersuchungsmethoden erfolgen:

- Gelpermeationschromatographie
- Dynamische und statische Lichtstreuung
- Viskosimetrie
- Densitometrie
- Gelelektrophorese
- Isoelektrische Fokussierung

Mit der Gelpermeationschromatographie können Informationen über die Molmassen der Produkte, deren Molmassenverteilungen, sowie über die molekularen Einheitlichkeiten der Dendrimere gewonnen werden. Diese Methode ist auch für eine Untersuchung hinsichtlich der chemischen Beständigkeit der Proben geeignet.

Molmassen lassen sich auch mit Hilfe der statischen Lichtstreuung erhaltenen. Die statische Lichtstreuung liefert darüber hinaus auch Informationen zu den zweiten osmotischen Virialkoeffizienten der Verbindungen. Die Kenntnis des zweiten osmotischen Virialkoeffizienten ermöglicht die Beurteilung von Wechselwirkungen der gelösten Makromoleküle untereinander und mit dem Lösemittel.

Aus dem Vergleich mit einem Proteinstandard können bei der Gelelektrophorese Aussagen über die Molmassen sowie über die Reinheit der Verbindungen getroffen werden.

Mit Hilfe der isoelektrische Fokussierung kann die Lage der isoelektrischen Punkte der dendritischen Röntgenkontrastmittel ermittelt werden. Deren Kenntnis ist im Hinblick auf die Löslichkeit der Substanzen unter physiologischen Bedingungen bedeutsam.

Die Viskosimetrie und die dynamische Lichtstreuung liefern Informationen zu den hydrodynamischen Radien bzw. hydrodynamischen Volumina der Proben.

Die Partikelgrößen können zudem aus der Densitometrie bestimmt werden. Ein Vergleich der mittels dieser verschiedenen Methoden gefundenen Daten kann Abweichungen von der zugrunde gelegten Kugelsymmetrie anzeigen.

Die Lösungsviskosität und Osmolalität eines makromolekularen Röntgenkontrastmittels haben einen bedeutenden Einfluß auf die Körperverträglichkeit der Substanz. Zur Beurteilung von Kontrastmitteln ist daher die Kenntnis dieser physikochemischen Parameter essentiell.

Die Toxizität und Ausscheidbarkeit der makromolekularen Röntgenkontrastmittel sollte abschließend im Tierexperiment studiert werden. Zusammenfassend ermöglichen alle diese Daten eine qualitative Beurteilung von makromolekularen Röntgenkontrastmitteln bezüglich ihres potentiellen Einsatzes in der klinischen Praxis.

3 Theoretischer Teil

3.1 Niedermolekulare Kontrastmittel

Kontrastmittel sind diagnostische Hilfsmittel bei bildgebenden Verfahren^[5]. Unabhängig von der Untersuchungsmethode besteht ihre Aufgabe darin, das Antwortsignal im Verhältnis zu dem nicht verstärkten Signal so zu modifizieren, dass eine höhere Empfindlichkeit und Spezifität der Methode erreicht wird. Pharmakologische Nebenwirkungen sind jedoch nicht erwünscht^[6].

Kontrastmittel werden heute in der Scintigraphie, in der Ultraschalldiagnostik, der Kernspintomographie sowie in der Röntgendiagnostik eingesetzt. So verschieden die physikalischen Grundlagen dieser bildgebenden Verfahren sind, so unterschiedlich sind auch die chemischen Eigenschaften und die Anforderungen an die jeweiligen Kontrastmittel. Die Ultraschalldiagnostik liefert beispielsweise Informationen aus dem Körperinneren entsprechend der Reflexion und Streuung von Ultraschallwellen. Mikroskopisch kleine Gasbläschen, die in porösen Materialien wie Galactose (Levovist[®]) oder in Suspensionen (Sonavist[®]) stabilisiert werden, fungieren hier als Kontrastmittel^[22].

Die Effizienz eines Kontrastmittels für die Kernspintomographie hängt dagegen von seinem Einfluß auf das magnetische Moment von Protonen in seiner unmittelbaren Umgebung ab, das Kontrastmittelmolekül selbst wird dagegen meist nicht detektiert. Als Kontrastmittel werden Chelatkomplexverbindungen von paramagnetischen Ionen wie Gadolinium(III) eingesetzt (Magnevist[®])^{[5], [23]}.

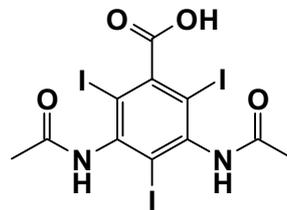
In der Scintigraphie finden radioaktiv markierte Verbindungen, sogenannte Radiopharmazeutika, als Kontrastmittel Anwendung. Der Weg einer solchen radioaktiv markierten Verbindung und ihre Anreicherung in bestimmten Geweben wird mittels einer Gamma-Kamera oder eines Tomographen detektiert (PET \equiv engl. Positron Emission Tomography oder SPECT \equiv engl. Single-Photon Emission Computed Tomography)^[6].

Röntgenkontrastmittel lassen sich grundsätzlich in zwei verschiedene Kategorien einteilen. So unterscheidet man zwischen positiven oder negativen Röntgenkontrastmitteln^[5]. Gase bzw. Gasgemische wie CO₂ oder Luft absorbieren Röntgenstrahlen weniger stark als die sie umgebenden Körperstrukturen. Daher liefern beispielsweise Thoraxaufnahmen der Lungen einen ausreichenden Kontrast. Positive Kontrastmittel enthalten Elemente mit hoher

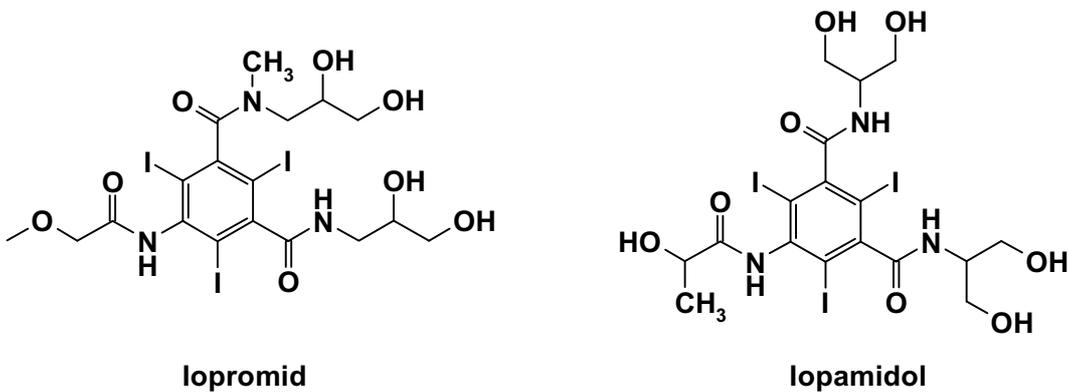
Ordnungszahl wie Barium oder Iod, und ihre Röntgenstrahlenabsorption ist größer als die des umgebenden Gewebes^[2].

Neben dem unlöslichen Bariumsulfat, das in der Magen-Darm-Diagnostik zum Einsatz kommt, werden heute die wasserlöslichen Röntgenkontrastmittel auf Basis der Triiodbenzoesäure eingesetzt (Bild 3.1).

Als erstes Triiodbenzoesäure-Derivat wurde die ionische Amidotrizesäure (z.B. Urografin[®], Angiograf[®], Bild 3.1) eingeführt. Bis in die achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts hinein war diese Verbindung das weltweit meistgebrauchte Kontrastmittel für die Urographie, Angiographie und Computertomographie^[2]. Aufgrund der für die Patienten besseren Allgemeinverträglichkeit werden heutzutage aber vornehmlich nichtionische Verbindungen wie z.B. Iopromid (Ultravist[®]) oder Iopamidol (Solutrast[®]) eingesetzt (Bild 3.1)^{[2], [5]}.



Amidotrizesäure



Iopromid

Iopamidol

Bild 3.1: Beispiele für ein ionisches bzw. zwei nichtionische Kontrastmittel

3.1.1 Physikochemische Eigenschaften

Die wichtigsten physikochemischen Kriterien für die Beurteilung eines Kontrastmittels sind seine Löslichkeit, seine Viskosität, sein osmotischer Druck, die lipophilen und hydrophilen Eigenschaften des iodhaltigen Moleküls und seine elektrische Ladung^[24].

Die Grundvoraussetzung zur Herstellung hochkonzentrierter Kontrastmittellösungen ist eine sehr gute Wasserlöslichkeit. Diese wird durch die im Molekül vorhandenen hydrophilen Gruppen wie zum Beispiel Hydroxy-, Amid- oder Methoxygruppen erzielt^[24]. Für einen ausreichenden Kontrast werden ziemlich hohe Iodkonzentrationen benötigt. Diese liegen in einem Bereich zwischen 200-400 mg I/ml. Das normalerweise injizierte Volumen einer Kontrastmittellösung beträgt daher ca. 100-150 ml^[6].

Die maximale Injektions- bzw. Infusionsgeschwindigkeit hängt von der Viskosität ab. Dies ist besonders bei der Verwendung enger Injektionsnadeln und großer Injektionsvolumina bedeutsam. Die Injektionsgeschwindigkeit kann in mg Iod pro Sekunde [mg I/s] angegeben werden^[24].

Zahlreiche Nebenwirkungen wie zum Beispiel starke Gefäßschmerzen, Endothelschädigungen, Thrombosen, Bradykardie oder Diurese, lassen sich auf einen hohen osmotischen Druck zurückführen^[24]. Gewöhnlich wird der osmotische Druck einer Kontrastmittellösung in der Pharmakologie in Milliosmol pro Kilogramm Wasser [mosm/kg Wasser] angegeben. Er ist sehr stark konzentrations- und wenig temperaturabhängig. Der osmotische Druck des Blutes beträgt 290 mosm/kg Wasser^[24]. Die heutzutage gebräuchlichen Kontrastmittel sind gegenüber dem Blut hyperton.

Aus der Verteilung eines Kontrastmittels zwischen einem mit Wasser nicht mischbaren Lösemittel (z.B. Octanol) und einem wäßrigen Puffer wird auf dessen Hydrophilie/Lipophilie geschlossen. Kontrastmittel für die Urographie, Angiographie, Computertomographie oder Myelographie sollten eine möglichst geringe Lipophilie aufweisen. Im Vergleich hierzu sind Gallenkontrastmittel oder Kontrastmittel für die Lymphographie deutlich lipophiler^[24].

3.1.2 Pharmakokinetik und Biodistribution

Kontrastmittel können auch anhand ihrer Pharmakokinetik und Biodistribution eingeteilt werden^[6]. Bezüglich der Biodistribution unterscheidet man zwischen extrazellulären und intravaskulären Kontrastmitteln. Extrazelluläre Kontrastmittel kommen beispielsweise in der Angiographie, der Urographie, der Myelographie und der gewebespezifischen Leberdarstellung zum Einsatz. Intravaskuläre Kontrastmittel sind dagegen auf den vaskulären Raum begrenzt; man spricht in diesem Zusammenhang auch von „blood-pool“-Kontrastmitteln. Die pharmakokinetischen Eigenschaften von extrazellulären Kontrastmitteln sind nahezu identisch. Nach der intravaskulären Injektion verteilen sich die Substanzen aufgrund der sogenannten Extravasation innerhalb kürzester Zeit auf den gesamten extrazellulären Raum des Körpers^[6]. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass sich bereits fünf Minuten nach der Injektion 80% eines Kontrastmittels außerhalb der Blutgefäße befanden^[25]. Um dieses pharmakokinetische Verhalten zu kompensieren, müssen die niedermolekularen, extrazellulären Kontrastmittel in hohen Dosen verabreicht werden^[10]. Bis heute sind intravaskuläre oder „blood-pool“-Kontrastmittel nur für die Ultraschalldiagnostik und die Scintigraphie verfügbar, „blood-pool“-Kontrastmittel für die Röntgendiagnostik bzw. Kernresonanztomographie sind dagegen noch immer in einem frühen Forschungsstadium^[6].

3.2 Makromolekulare Kontrastmittel

3.2.1 Lineare und verzweigte makromolekulare Röntgenkontrastmittel

Lineare und verzweigte makromolekulare Kontrastmittel sind seit vielen Jahren Gegenstand intensivster Forschungen, was durch zahlreiche Patente und Publikationen belegt wird. So beschreiben Sovak et al.^[10] die Synthese radiopaker Polymere ausgehend von Triiodaromaten, die mit Acryl- bzw. Methacrylsäure derivatisiert wurden. Mit nichtopaken Acryl- bzw. Methacrylsäurederivaten werden wasserlösliche Copolymere unterschiedlichster Molmassen erhalten.

Amphiphile Blockcopolymere aus Methoxypoly(ethylenglykol) und Poly[N-, ϵ -(Triiodbenzoyl)-L-lysin], die in wässriger Lösung Mizellen bilden, werden von Trubetskoy et al.^[26] beschrieben. Die Autoren beobachten Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 80 nm bei einem maximalen Iodgehalt von 45%.

Eine andere Möglichkeit der Synthese von makromolekularen Röntgenkontrastmitteln liegt in der Funktionalisierung käuflich erhältlicher makromolekularer Grundgerüste mit kontrastgebenden niedermolekularen Verbindungen. Doucet^[9] propfte Carboxymethylgruppen und Triiodbenzol-Derivate auf ein Dextran mit einer Molmasse von 17000 g/mol und erhielt so ein makromolekulares Röntgenkontrastmittel mit einer mittleren Molmasse von 32000 g/mol.

Obwohl lineare und verzweigte makromolekulare Kontrastmittel in zahlreichen Patenten und Publikationen beschrieben werden, konnte aufgrund der vorhandenen Toxizität, der eingeschränkten renalen Eliminierung und der oftmals fehlenden Reproduzierbarkeit der Synthese bislang keines dieser makromolekularen Kontrastmittel in der klinischen Praxis Anwendung finden. Bedingt durch diese Unzulänglichkeiten konzentrieren sich die neueren Forschungen auf hochverzweigte, makromolekulare Verbindungen – die Dendrimere^[6].

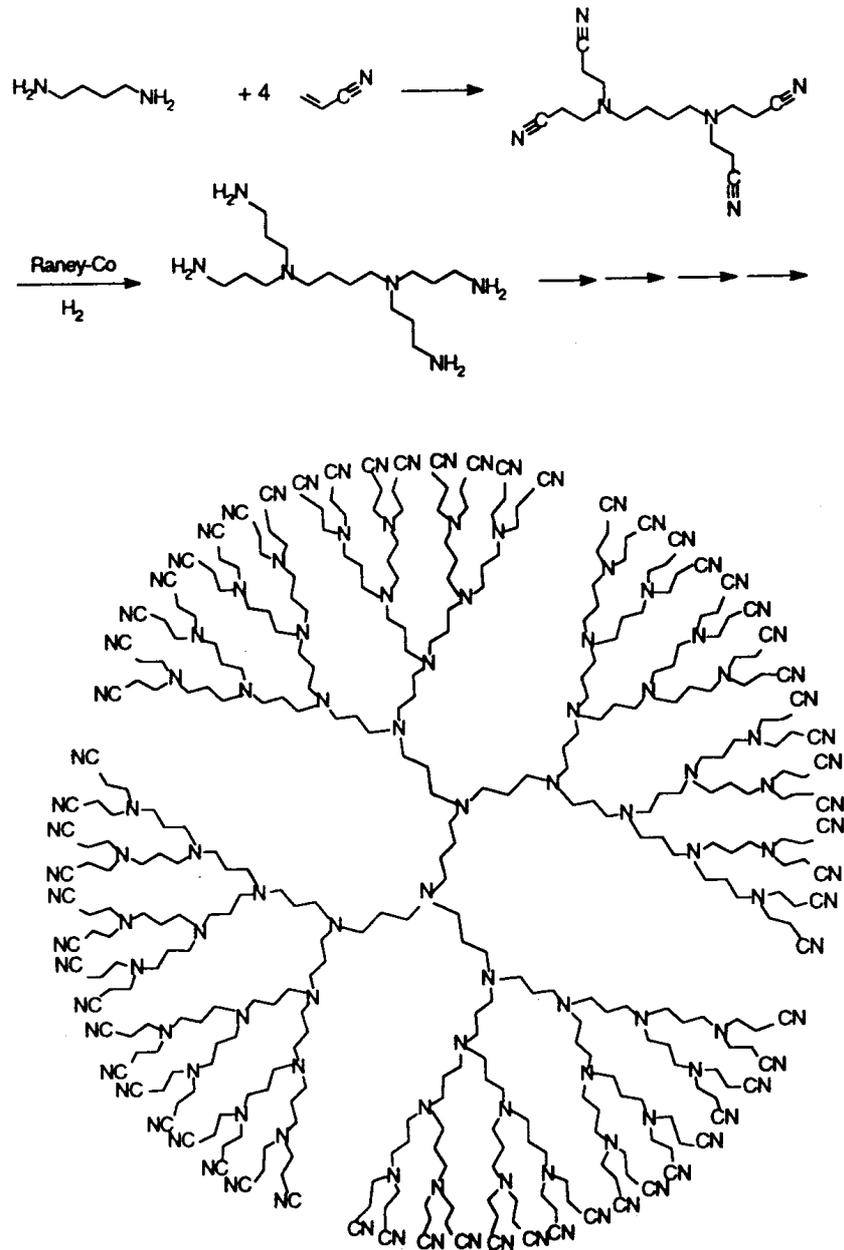
3.2.2 Dendritische Röntgenkontrastmittel

3.2.2.1 Dendrimere

Seit mittlerweile zwei Jahrzehnten sind die Dendrimere, welche ursprünglich auch als Kaskadenmoleküle oder Arborole bezeichnet wurden, bekannt^[12]. Der Begriff Dendrimer leitet sich von den griechischen Wörtern dendron = der Baum und meros = der Teil ab und gibt anschaulich den Aufbau dieser neuen Verbindungsklasse wieder^[17]. Dendrimere sind perfekte uniforme Makromoleküle mit einer regelmäßigen, hyperverzweigten dreidimensionalen Struktur. Die Synthese erfolgt in einer iterativen Abfolge von Reaktionsschritten, wobei jeder Reaktionsschritt zu einer höheren Generationszahl führt^[13]. Erstmals wurde eine solche „Kaskaden Synthese“ im Jahr 1978 von Vögtle beschrieben^[27]. Die Poly(amidoamin)-Dendrimere (PAMAM) von Tomalia^{[14], [15]} bzw. Newkome's^[28] „Arborol-Systeme“ waren die ersten vollständig charakterisierten dendritischen Moleküle.

In beiden Fällen erfolgte der Aufbau auf divergentem Weg. Ausgehend von einem multifunktionellen Kern wird schrittweise Verzweigungseinheit nach Verzweigungseinheit von innen nach außen an das Kernmolekül angebracht^[17]. Die Zahl der peripheren Gruppen wächst dabei in Abhängigkeit von der Multiplizität der Verzweigungseinheit. Unter Ausnutzung derselben divergenten Synthesestrategien wurden unabhängig voneinander im Jahre 1993 von Mülhaupt^[29] und Brabander^[16] über Poly(propylenimin)-Dendrimere (POPAM) publiziert.

Als Beispiel einer divergenten Dendrimersynthese ist in Bild 3.2 die Synthese von POPAM-Dendrimern gezeigt^[30]. Die Reaktionssequenz besteht aus einer Wiederholung von Michael-Additionen an die primären Amino-Endgruppen und sich daran anschließende, heterogen katalysierte Hydrierungen der Nitrilo-Endgruppen an einem Cobalt-Katalysator. Jede Sequenz aus Michael-Addition und katalytischer Hydrierung führt zu einer Verdoppelung der Anzahl an endständigen Aminogruppen. Als Endprodukt der Synthese ist in Bild 3.2 das mit 64 Nitrilo-Endgruppen terminierte Dendrimer der Generation 5 zu sehen.

Bild 3.2: Synthese von POPAM-Dendrimern^[30]

Eine zweite, häufig angewandte Strategie zur Herstellung von Dendrimern erfolgt schrittweise, ausgehend von den Endgruppen nach innen. Im abschließenden Schritt werden die sogenannten Dendronen mit dem Kernmolekül zum Endprodukt, dem Dendrimer, umgesetzt. Diese Verfahrensweise wird als konvergente Synthese bezeichnet und wurde erstmalig von Fréchet im Jahre 1990 eingeführt^{[31], [32]}.

Beide Synthesestrategien haben ihre Vor- und Nachteile. So können bei der divergenten Syntheseführung Probleme auftreten, falls nicht alle Endgruppen vollständig reagieren.

Solche Strukturdefekte pflanzen sich im weiteren Syntheseverlauf fort und eine chromatographische Abtrennung der Nebenprodukte ist wegen der ähnlichen physikalischen Eigenschaften nicht mehr möglich^[17]. Divergent aufgebaute Dendrimere höherer Generationen enthalten daher immer gewisse Strukturdefekte^[33].

Demgegenüber erlaubt eine konvergente Synthese die chromatographische Abtrennung von Nebenprodukten, da ein mit jedem Reaktionsschritt wachsendes Segment mit nur einer Verzweigungseinheit umgesetzt wird. Die Synthese von höheren Dendrimergenerationen wird jedoch durch die sterischen Anforderungen bei der Umsetzung mit dem Kernmolekül behindert^[17].

Generell führt die konvergente Synthesestrategie zu Dendrimeren mit einer größeren strukturellen Perfektion. Der divergente Syntheseweg ermöglicht dagegen den Zugang zu Molekülen, deren Oberfläche bei jedem Reaktionsschritt andere funktionelle Gruppen trägt, wodurch sich vielfältige Modifikationsmöglichkeiten bieten^[34].

3.2.2.1.1 *Besondere Eigenschaften der Dendrimere*

Verglichen mit anderen hyperverzweigten Polymeren oder linearen Makromolekülen haben Dendrimere eine definierte Molekülgröße und eine enge Molmassenverteilung^[35]. Dies ist eine Konsequenz aus der iterativen Abfolge von Reaktionsschritten^[13]. Gewöhnliche Polymerisationsreaktionen führen dagegen zu Makromolekülen mit einer statistischen Verteilung der Molmassen. Die Breite der Molmassenverteilung ist durch das Verhältnis der unterschiedlich gemittelten Molmassen M_w/M_n , auch als „Polydispersitätsindex“ oder „Einheitlichkeit“ bezeichnet, charakterisiert^[36]. Die Einheitlichkeit liegt bei 1,0 für uniforme Polymere, Dendrimere haben gewöhnlich Werte von 1,01^[34]. Bei „eng verteilten“ Polymeren aus sogenannten „lebenden Polymerisationsreaktionen“ findet man Einheitlichkeiten um ca. 1,04^[36]. Polymere, die durch Polykondensationsreaktionen gewonnen werden, weisen Einheitlichkeiten größer 2,0 auf. Industriell produziertes Hochdruckpolyethylen zeigt oft eine Einheitlichkeit größer als 30^[37].

Typisch für Dendrimere ist außerdem das Auftreten einer sogenannten Grenzgeneration. Der den Endgruppen zur Verfügung stehende Raum wächst in jeder Generation mit r^2 (Kugelmantel), die Zahl der Endgruppen steigt aber exponentiell an. Mit jeder Generation

steigt folglich die Besetzungsdichte der Oberfläche, wodurch oberhalb dieser Grenzgeneration keine quantitative Umsetzung der Endgruppen möglich ist^[34].

Im Gegensatz zu linearen Makromolekülen, die sich in Lösung auf Grund von Verschlaufungen gegenseitig durchdringen, verhalten sich Dendrimermoleküle in Lösung als solvatisierte Kugeln mit großer Formstabilität. Diese Eigenschaft hat eine große Konsequenz für das rheologische Verhalten der Dendrimere; es nähert sich dem von harten Kugeln^[34]. Lösungen der Dendrimere weisen daher sehr niedrige Viskositäten auf (vgl. Kapitel 4.5).

Aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften bieten Dendrimere die vielfältigsten Anwendungsmöglichkeiten. Die steigende Raumerfüllung vom Kern zur Peripherie hin führt beispielsweise zu Kavitäten im Inneren der Dendrimermoleküle. Diese Hohlräume sind zur gezielten Aufnahme von Gastmolekülen geeignet^[38, 39, 40].

Eine weitere vielversprechende Anwendungsmöglichkeit bietet die Katalyse. Durch ihre im Nanobereich befindliche Dimension und ihrer Fähigkeit molekular löslich zu sein, könnten Dendrimere die Lücke zwischen homogener und heterogener Katalyse schließen^[13]. Zahlreiche Beispiele für katalytisch aktive Dendrimere sind mittlerweile bekannt, wobei sich das katalytisch aktive Zentrum sowohl innerhalb des Dendrimers^[41, 42] als auch an dessen Peripherie^[43, 44] befinden kann.

Auch für den Einsatz im medizinischen Sektor gibt es erste Ansätze. So werden derzeit beispielsweise zahlreiche kohlenhydrathaltige Dendrimere hinsichtlich einer möglichen medizinischen Applikation untersucht^[45, 46, 47, 48]. Die besonderen Eigenschaften dendritischer Moleküle machen diese Verbindungsklasse auch als makromolekulare Kontrastmittel für die medizinische in vivo Diagnostik interessant.

3.2.2.1.2 Beispiele für dendritische Kontrastmittel

Prinzipiell lassen sich dendritische Kontrastmittel auf zwei verschiedene Arten erhalten. Zum einen können die Endgruppen eines kommerziell erhältlichen Dendrimers mit den für den Kontrast verantwortlichen Gruppen in einer polymeranalogen Umsetzung derivatisiert werden. Andererseits kann man die kontrastgebenden Gruppen schon während der iterativen Synthese in das Kontrastmittelmolekül einbauen. Im Folgenden werden Beispiele für beide Strategien genannt, allerdings überwiegen bisher Veröffentlichungen und Patente zu den polymeranalogen Umsetzungen.

So beschreibt Wiener et al.^[49, 50] ein makromolekulares Magnetresonanz-Kontrastmittel auf Basis eines POPAM-Dendrimers mit Ammonium-Kern, das mit DTPA-Derivaten konjugiert ist. Brechbiel et al.^[51] untersuchten Magnetresonanz-Kontrastmittel auf Basis von POPAM-Dendrimern mit unterschiedlichen Kernmolekülen.

Bei der *Schering AG* gelang die Synthese eines 24-Kaskadenmoleküls (Gadomer-17)^[52], das sich in ersten Untersuchungen gegenüber niedermolekularen Magnetresonanz-Kontrastmitteln als überlegen erweist^[53, 54, 55].

Eine Arbeitsgruppe der Firma *Guerbet*^[7] veröffentlichte vorklinische Ergebnisse einer für die Röntgendiagnostik als „blood-pool“-Kontrastmittel geeigneten iodierten dendritischen Verbindung mit einer Molmasse von ca. 13000 g/mol und einem Iodgehalt von etwa 35 %. In diesem Makromolekül sind die für den Kontrast verantwortlichen Triiodaromaten integraler Teil der einzelnen Generationen des Dendrimers.

Ein weiterer bei der *Schering AG* beschrittener Weg basiert auf iodhaltigen dendritischen Makromolekülen mit einem stickstoffhaltigen Kern, die durch polymeranaloge Umsetzungen mit Triiodaromaten derivatisiert werden. Als dendritische Träger werden PAMAM- und POPAM-Dendrimere sowie dendritische Polylysin-Derivate eingesetzt. Die peripheren Triiodaromaten, sind unter anderem mit aliphatischen Carboxy-, Sulfo- oder Phosphonogruppen substituiert. Über die Wahl der Seitengruppen lassen sich gezielt die pharmakologischen und physikochemischen Eigenschaften eines dendritischen Röntgenkontrastmittels beeinflussen^[56].

3.2.2.2 Anforderungsprofil an radiopake Reste

Aus dem Vergleich der bei der *Schering AG* gewonnenen physikochemischen und pharmakologischen Untersuchungsergebnisse der unterschiedlichsten dendritischen Röntgenkontrastmittel wurde ein Anforderungsprofil für neu zu synthetisierende Triiodaromaten erstellt^[57]. Die radiopaken Reste sollten sich durch eine möglichst große Anzahl an hydrophilen Seitengruppen auszeichnen. Die früher synthetisierten radiopaken Reste hatten lediglich zwei Hydroxygruppen. Die aus der polymeranalogen Umsetzung mit dem POPAM-Dendrimer der Generation 5 erhaltenen dendritischen Endprodukte haben daher bei Annahme einer vollständigen Derivatisierung maximal 128 Hydroxygruppen in der äußeren Schicht. Pharmakologische Tests ergaben, dass die renale Eliminierung dieser Dendrimere stark eingeschränkt ist^[57]. Durch eine Verdopplung der Anzahl an freien Hydroxygruppen innerhalb des Triiodaromaten könnte diese verbessert werden.

Weiterhin lassen pharmakologische Tests vermuten, dass sich die Verträglichkeit der dendritischen Röntgenkontrastmittel durch die Anwesenheit von Ethergruppen verbessert. Daher werden bei der Synthese einiger Triiodaromaten auch Ethergruppen impliziert, um diese Vermutung hinsichtlich einer Steigerung der Verträglichkeit zu verifizieren.

POPAM-Dendrimere der Generation 5 enthalten 64 primäre und 62 tertiäre Stickstoffatome. In vivo liegen die tertiären Stickstoffatome als protonierte, polykationische Ammoniumspezies vor. Als nach außen positiv geladene Polykationen hätten die radiopaken, dendritischen Endprodukte jedoch eine toxische Wirkung auf den Organismus. Um daher einen Ladungsausgleich herzustellen und nach außen neutrale oder schwach anionisch geladene Makromoleküle zu erzeugen, muß in die Struktur der für den Kontrast verantwortlichen Triiodaromaten eine Säuregruppen eingeführt werden. Diese protoniert eine sich im Innern des dendritischen Kontrastmittels befindliche tertiäre Aminogruppe unter gleichzeitiger Ausbildung eines Carboxylat-Anions. Folglich wird eine zwitterionische Spezies erzeugt. Bei der Annahme einer quantitativen Derivatisierung der 64 primären Amino-Endgruppen des POPAM-Dendrimers würde unter physiologischen Bedingungen nach außen sogar ein zweifach negativ geladenes Dendrimermolekül (s.o.) resultieren. Eine darüber hinausgehende Erhöhung der Anzahl an Carboxylgruppen ist nicht angebracht, da die unter physiologischen Bedingungen vorliegenden Carboxylat-Anionen freie Calciumionen komplexieren, was eine massive Störung des Calciumhaushalts zur Folge hätte^[57].

Die primären Amino-Endgruppen der POPAM-Dendrimere dienen als Verknüpfungsstellen zwischen den radiopaken Resten und dem dendritischen Grundgerüst. Um möglichst stabile Bindungen zwischen den beiden Verknüpfungspositionen zu erhalten, werden in dieser Arbeit die Amino-Endgruppen des Dendrimers mit je einer der Carboxylgruppen des Triiodaromaten unter Ausbildung von Amidbindungen umgesetzt. Zusammen mit der zum Ladungsausgleich notwendigen Carboxylgruppe (s.o.) führt dies letztlich zu Strukturen, in denen jeweils zwei Carboxylgruppen pro Triiodaromat neben einer großen Anzahl an hydrophilen Gruppen vorhanden sind.

4 Ergebnisse und Diskussion

Unter Berücksichtigung der im vorangehenden Kapitel 3.2.2.2 erläuterten Anforderungen werden nachfolgend die Synthesen von neuen optimierten Triiodaromaten beschrieben. Ihre polymeranalogen Verknüpfungreaktionen mit dem POPAM-Dendrimer werden in dem Unterkapitel 4.1.2 vorgestellt. Im Anschluß erfolgt in den Kapiteln 4.2 - 4.7 eine detaillierte Beschreibung der zur Charakterisierung dieser dendritischen Röntgenkontrastmittel herangezogenen Methoden sowie deren jeweiligen Ergebnisse.

4.1 Synthesen

4.1.1 Synthese der radiopaken Reste

Eine Übersicht der neu synthetisierten Triiodaromaten beinhalten die beiden Tabellen 4.1 und 4.2. Im weiteren Kontext der Arbeit werden die Triiodaromaten mit **GRR 1** bis **GRR 8** indiziert. **G** steht hierbei für *geschützte Form*, **RR** bedeutet *radiopaker Rest*. Die radiopaken Reste **GRR 1** bis **GRR 6** sind über aliphatische Carbonylgruppen mit dem dendritischen Trägermaterial verbunden. Vier Hydroxygruppen liegen dabei acetylgeschützt vor, daneben ist eine Carbonsäure als Ethylester geschützt. Zur Verbesserung der Hydrophilie sind die Triiodaromaten **GRR 1** bis **GRR 4** zusätzlich mit Ethergruppen substituiert, da diese einen positiven Einfluß auf die Verträglichkeit der dendritischen Verbindungen ausüben sollen.

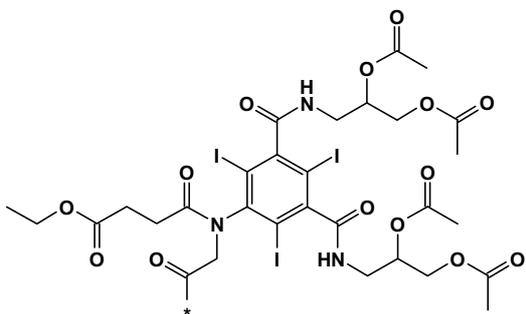
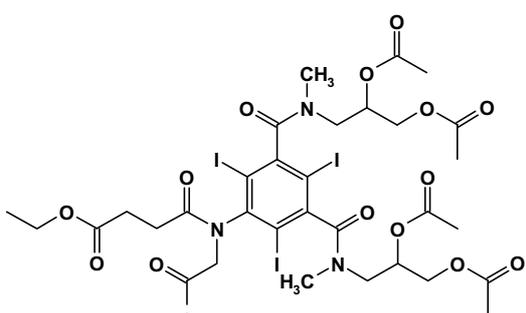
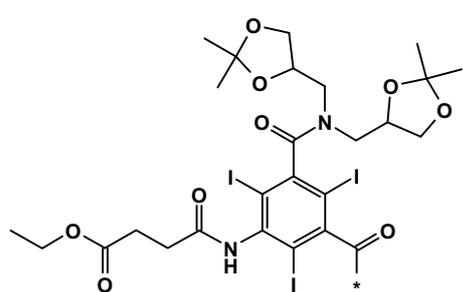
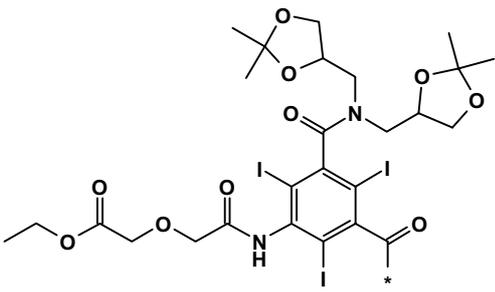
Die beiden radiopaken Reste **GRR 7** und **GRR 8** sind dagegen über eine am aromatischen Kern befindliche Carbonylgruppe an das dendritische Grundgerüst gebunden. Eine aliphatische, als Ethylester geschützte Carboxylgruppe stellt den geforderten Ladungsausgleich her. Die Hydroxygruppen liegen jeweils in geschützter Form als Isopropyliden-Acetale vor. **GRR 8** enthält außerdem in der Seitenkette eine Etherfunktion, die wiederum eine Verbesserung der Verträglichkeit bewirken soll.

In allen hier beschriebenen Beispielen werden die radiopaken Reste über Amidbindungen an das POPAM-Dendrimer gebunden. Hierzu wird eine der beiden Carboxylgruppen des Triiodaromaten in ein Carbonsäurechlorid überführt und mit den Amino-Endgruppen des dendritischen Grundgerüsts zur Reaktion gebracht.

In den beiden Tabellen 4.1 und 4.2 sind die jeweiligen Verknüpfungsstellen mit dem POPAM-Dendrimer durch einen Stern gekennzeichnet. Die Synthesen werden nachfolgend in den Unterkapiteln 4.1.1.2 - 4.1.1.7 detaillierter beschrieben.

Radiopaker Rest	Struktur
GRR 1	
GRR 2	
GRR 3	
GRR 4	

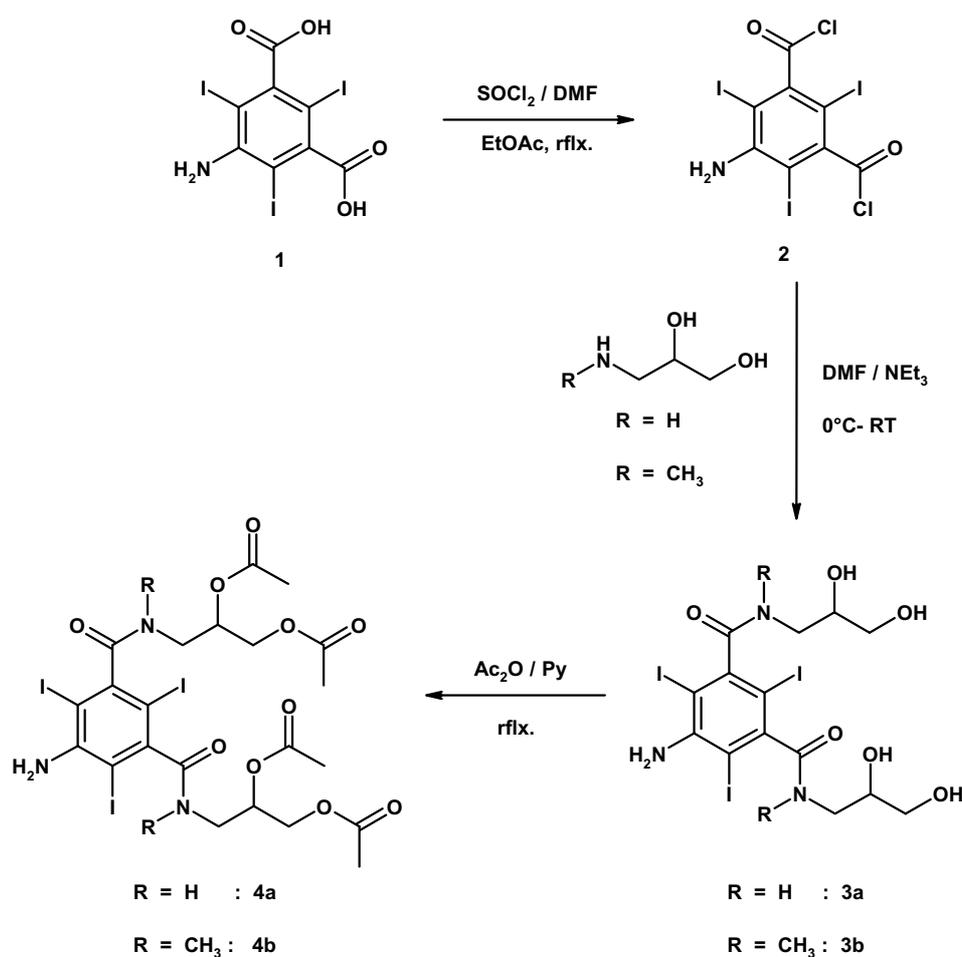
Tab. 4.1: Übersicht I, radiopake Reste

Radiopaker Rest	Struktur
GRR 5	
GRR 6	
GRR 7	
GRR 8	

Tab. 4.2: Übersicht II, radiopake Reste

4.1.1.1 Synthese der acetylierten Ausgangsverbindungen **4a** und **4b**

Als Basismolekül sämtlicher Synthesen dient 5-Amino-2,4,6-triiodisophthalsäure (Iodamsäure, **1**). Mit Thionylchlorid wird die Dicarbonsäure in das korrespondierende Iodamsäuredichlorid (**2**) überführt und anschließend mit 1-Amino-2,3-propandiol bzw. 1-Methylamino-2,3-propandiol zu den Bis-Amidverbindungen **3a** bzw. **3b** umgesetzt. Diese Moleküle besitzen die für die Hydrophilie der zukünftigen dendritischen Röntgenkontrastmittel notwendige Anzahl an Hydroxygruppen, die jedoch für den weiteren Syntheseverlauf in eine geschützte Form überführt werden müssen. Hierzu werden die Hydroxygruppen in **3a, b** durch die Umsetzung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin acetyliert (Schema 4.1).

Schema 4.1: Synthese der Ausgangsverbindungen **4a** und **4b**

Die acetylierten Triiodaromaten **4a** und **4b** sind die Ausgangsverbindungen für die Synthesen von sechs der acht in dieser Arbeit vorgestellten dendritischen Röntgenkontrastmittel. Sie unterscheiden sich lediglich in den beiden *N*-methylierten Amidgruppen. Im Folgenden werden daher die Synthesewege hin zu Triiodaromaten, die sich lediglich im *N*-Methylierungsgrad unterscheiden, in einem einzigen Syntheschema zusammengefaßt.

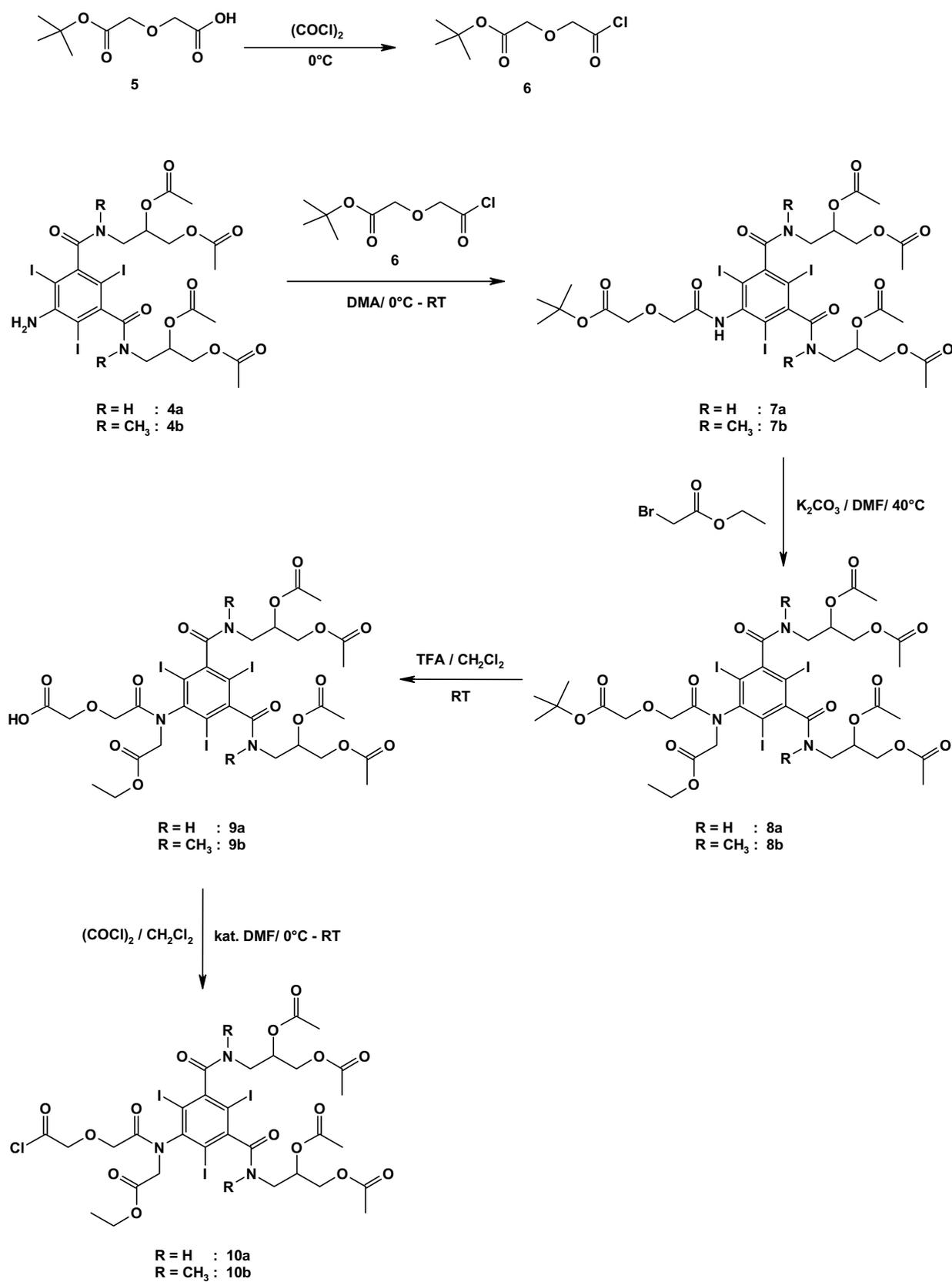
4.1.1.2 Synthese von **GRR 1** und **GRR 2**

Die beiden acetylgeschützten Triiodaromaten **4a** und **4b** werden im ersten Syntheseschritt in einer Amidbildungsreaktion mit dem Säurechlorid **6** des Diglykolsäuremono-*tert*-butylesters (**5**), welcher entsprechend einer Literaturvorschrift^[58] synthetisiert wurde, umgesetzt (Schema 4.2). Die Reaktionsführung ist insofern ungewöhnlich, da bei der Aktivierung einer Carbonsäure über das Säurechlorid Chlorwasserstoff als Nebenprodukt entsteht, der zugleich eine hydrolytische Spaltung der *tert*-Butylestergruppen initiieren könnte. Arbeitet man in Dimethylacetamid als Lösungsmittel kann diese unerwünschte Reaktion zurückgedrängt werden und die Isolierung der *tert*-Butylester **7a** bzw. **7b** gelingt in moderaten Ausbeuten von 43 bis 67 %.

Im Folgeschritt wird die zum Ladungsausgleich benötigte, geschützte Säure durch eine Alkylierung mit Bromessigsäureethylester und Kaliumcarbonat in Dimethylformamid unter relativ milden Bedingungen am Triiodaromaten eingeführt. Die Reaktion erfolgt dabei selektiv am amidischen Stickstoff in Position 5 des Triiodaromaten zu den Produkten **8a** und **8b**. Es wird keine Alkylierung an den Amid-Stickstoffatomen der Aminopropandiol-Seitengruppen von **7a** beobachtet.

Im nächsten Reaktionsschritt wird der *tert*-Butylester mittels Trifluoressigsäure (TFA) in Dichlormethan hydrolytisch zur freien Carbonsäure gespalten und somit die notwendige Kopplungsstelle zum POPAM-Dendrimer geschaffen. Unter diesen Bedingungen werden die Acetylgruppen nicht angegriffen. Die Hydroxygruppen lassen sich später leicht durch Verseifung der Essigsäureester mit methanolischer Natronlauge freisetzen. Die Umsetzung von **8a** und **8b** liefert quantitativ die gewünschten Produkte **9a** und **9b**.

Für die Kopplung der Triiodaromaten an das POPAM-Grundgerüst müssen die Carboxylgruppen aktiviert werden. Dies geschieht über die entsprechenden Carbonsäurechloride, welche im Vergleich zu Aktivestern oder gemischten Anhydriden relativ leicht zugänglich sind und obendrein eine ausreichend hohe Reaktivität für die vollständige Derivatisierung der 64 primären Aminogruppen des POPAM-Dendrimers besitzen. Die Carbonsäurechloride **10a** und **10b** konnten quantitativ durch die Umsetzung von **9a** und **9b** mit einem Überschuß Oxalylchlorid in Dichlormethan gewonnen werden (Schema 4.2).

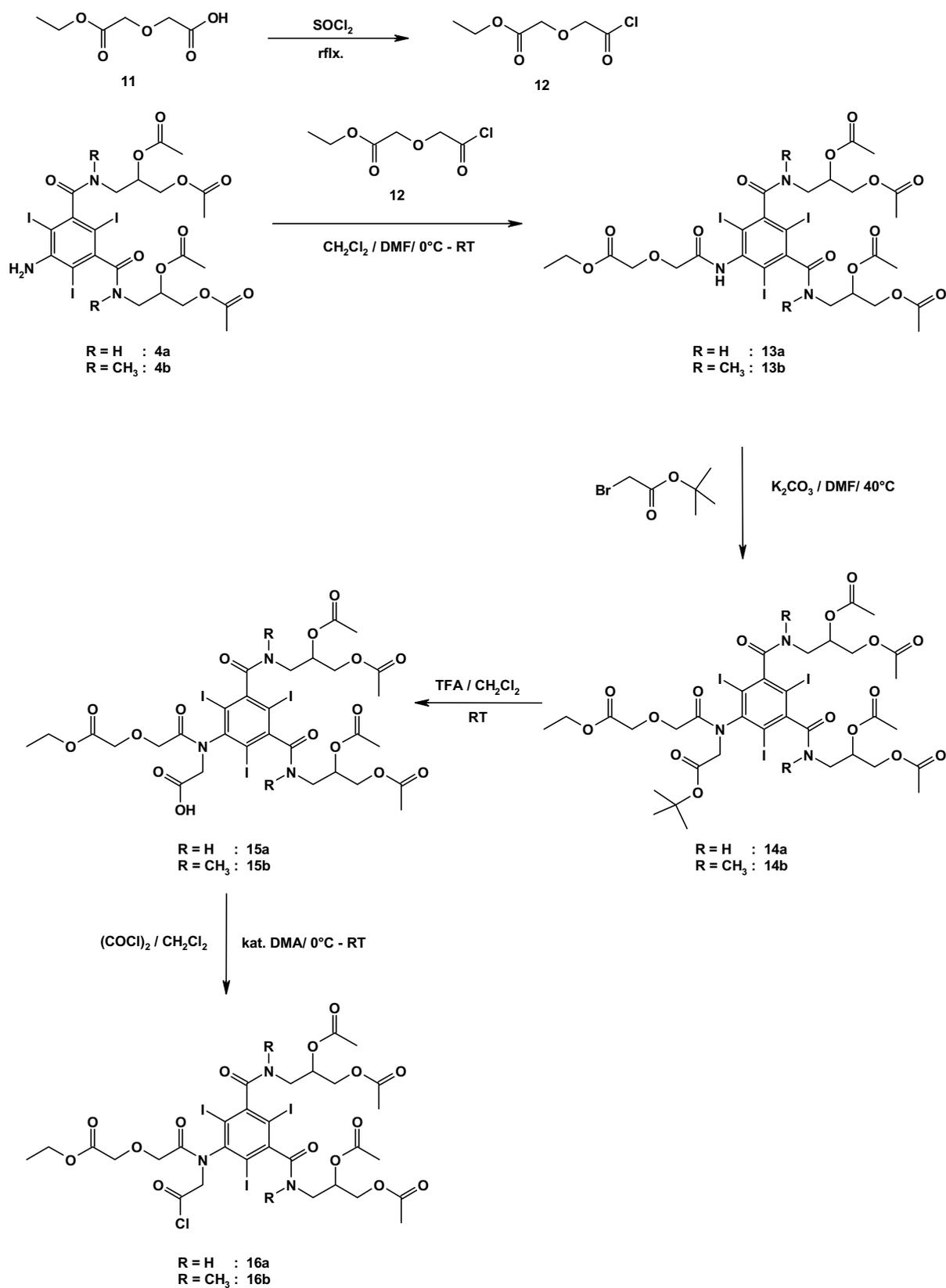


Schema 4.2: Synthese **GRR 1** und **GRR 2**

4.1.1.3 Synthese von **GRR 3** und **GRR 4**

Die Derivate **GRR 3** und **GRR 4** unterscheiden sich in der internen Position der späteren Verknüpfungstelle mit dem dendritischen Grundgerüst von den zuvor beschriebenen Verbindungen. Die Synthesen erfolgen unter analogen Reaktionsbedingungen. Ausgehend von **4a** bzw. **4b** wird im ersten Acylierungsschritt mit dem Säurechlorid **12** des Diglykolsäuremonoethylesters (**11**), das durch die Umsetzung von **11** mit Thionylchlorid erhalten wurde, die zum Ladungsausgleich notwendige Carbonsäure unter Bildung von **13a** und **13b** eingeführt.

Daran schließt sich ein Alkylierungsschritt mit Bromessigsäure-*tert*-butylester und K_2CO_3 in Dimethylformamid an (Schema 4.3). Über diese Seitenkette erfolgt die spätere Verankerung der Triiodaromaten **GRR 3** und **GRR 4** mit dem POPAM-Dendrimer. Man erhält somit die orthogonal geschützten Produkte **14a** und **14b**, die selektiv durch Hydrolyse mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan in die beiden Carbonsäuren **15a** bzw. **15b** überführt werden. Diese werden wiederum durch die Umsetzung mit einem Oxalylchlorid-Überschuß in die korrespondierenden Säurechloride **16a** und **16b** überführt (Schema 4.3).



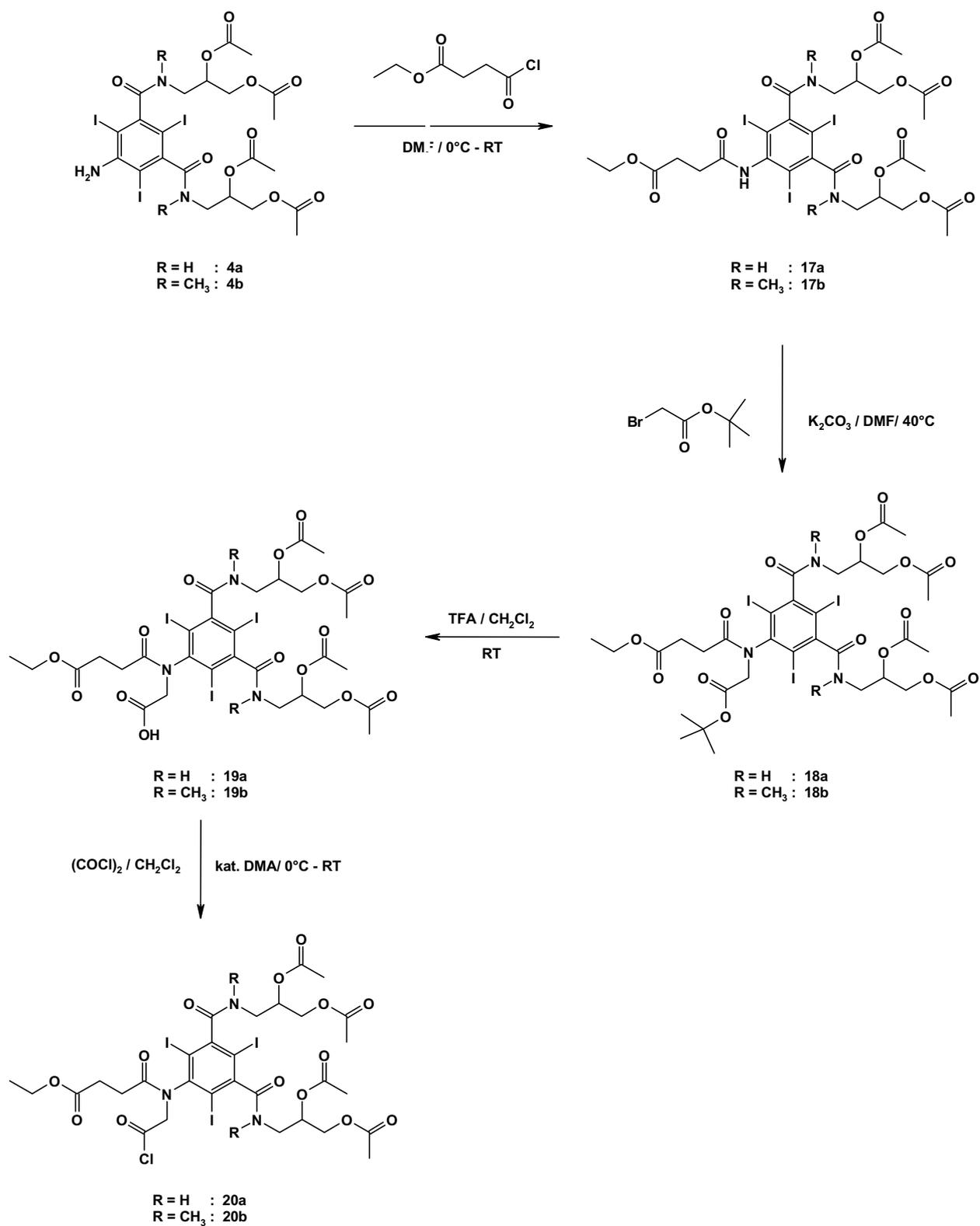
Schema 4.3: Synthese **GRR 3** und **GRR 4**

4.1.1.4 Synthese von **GRR 5** und **GRR 6**

Die in den Reaktionsschemata 4.2 und 4.3 vorgestellten radiopaken Reste **GRR 1** bis **GRR 4** zeichnen sich durch die Anwesenheit einer Diglykolsäure-Seitengruppe aus. Im Gegensatz hierzu besitzen die beiden nachfolgend beschriebenen radiopaken Reste Bernsteinsäure-Untereinheiten (Schema 4.4). Ausgangsmaterial für die entsprechenden Synthesen sind erneut die beiden Triiodaminoisophthalsäure-Derivate **4a** und **4b**. Die Synthesestrategie zu den beiden radiopaken Resten **GRR 5** und **GRR 6** ist analog zu den zuvor beschriebenen Verbindungen, d. h. die Triiodaromaten enthalten vier acetylgeschützte Hydroxygruppen, und es werden zwei Carbonsäuren pro Molekül des Triiodaromaten eingeführt, die orthogonal in Form ihrer *tert*-Butyl- und Ethylester geschützt sind.

Im ersten Reaktionsschritt werden jeweils die Amide **17a** und **17b** aus dem kommerziell erhältlichen Bernsteinsäureethylesterchlorid und den beiden Triiodaminoisophthalsäurederivaten **4a** bzw. **4b** gebildet (Schema 4.4). Diesen Reaktionen schließt sich wiederum ein Alkylierungsschritt mit Bromessigsäure-*tert*-butylester zu den Verbindungen **18a** bzw. **18b** an.

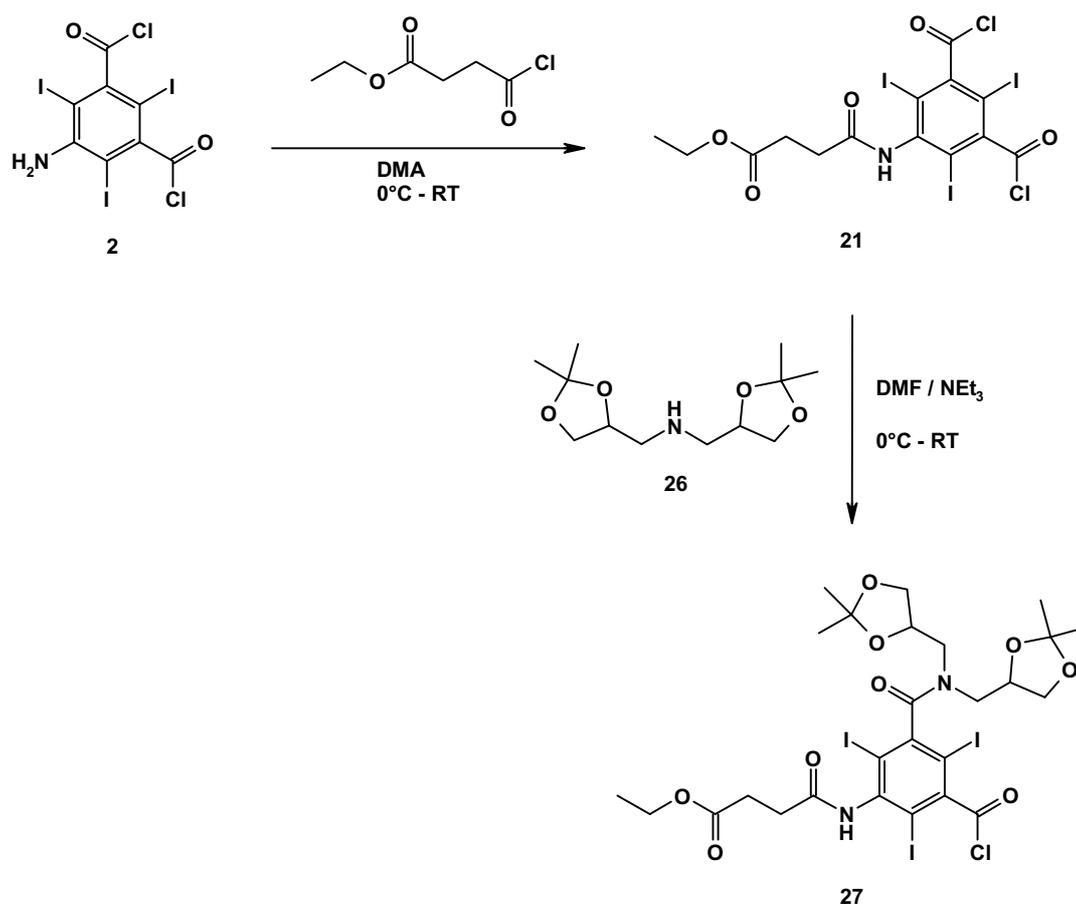
Durch Behandeln mit Trifluoressigsäure erhält man quantitativ die Carbonsäuren **19a** und **19b**, welche danach durch Umsetzung mit einem Überschuß Oxalylchlorid in die Carbonsäurechloride **20a** bzw. **20b** überführt werden (Schema 4.4).



Schema 4.4: Synthese von **GRR 5** und **GRR 6**

4.1.1.5 Synthese von **GRR 7**

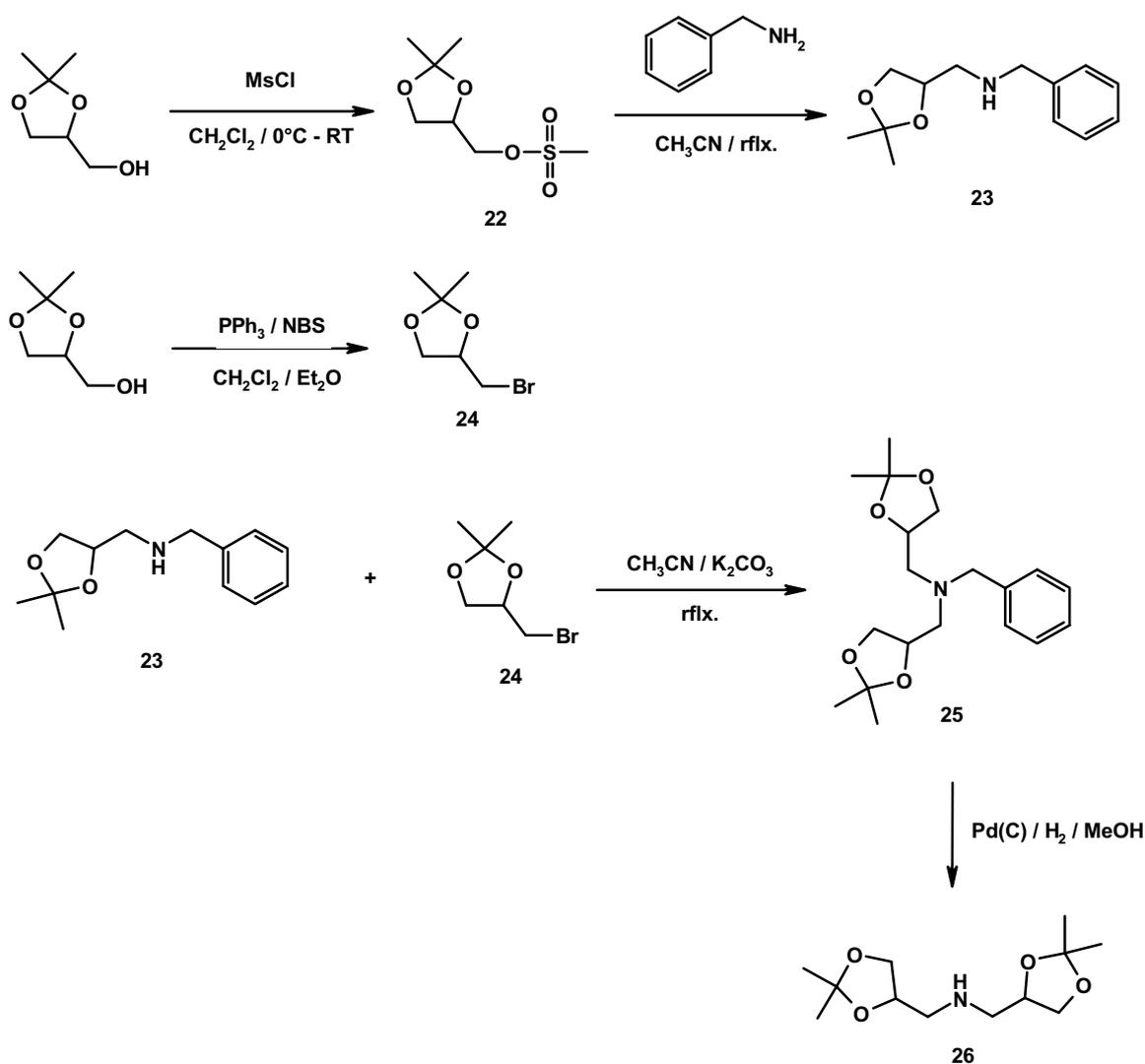
Die Synthese von **GRR 7** startet ebenfalls auf der Stufe der Iodamsäure (**1**). Nach deren Überführung in das Iodamsäuredichlorid (**2**) wird nun, im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Synthesen, mit Bernsteinsäureethylesterchlorid zur Verbindung **21** umgesetzt (Schema 4.5). Durch die Reaktion mit einem Äquivalent des sekundären Amins Bis-(2,2-dimethyl-[1,3]dioxolan-4-ylmethyl)amin (**26**) erhält man das Monosäurechlorid **27**. Die Synthese des sekundären Amins **26** ist in Schema 4.6 vorgestellt. Das Derivat **27** enthält neben dem aromatischen Säurechlorid zusätzlich eine als Ethylester geschützte aliphatische Carbonsäure sowie vier in Form von Isopropyliden-Acetalen geschützte Hydroxygruppen. Dieser radiopake Rest **27** kann nun in einer polymeranalogen Umsetzung direkt über das aromatische Carbonsäurechlorid an die primären Amino-Endgruppen des POPAM-Dendrimers gebunden werden.

Schema 4.5: Synthese von **GRR 7**

4.1.1.6 Synthese von Bis-(2,2-dimethyl-[1,3]dioxolan-4ylmethyl)amin (**26**)

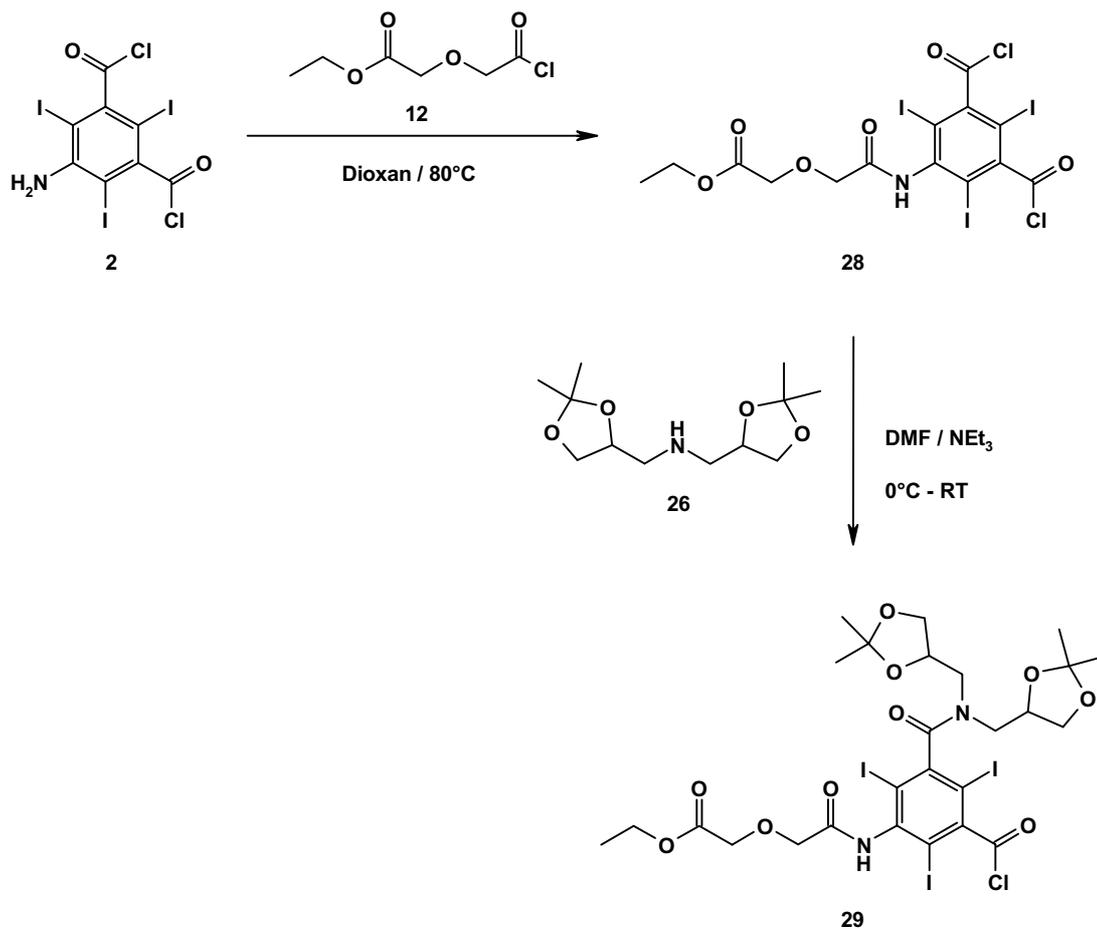
Ausgangsmaterial der Synthese von **26** (Schema 4.6) ist das kommerziell erhältliche 2,3-Isopropyliden-Glycerin. Die Umsetzung mit Mesylchlorid nach bekannten Literaturvorschriften^[59, 60] führt zum Mesylat **22**. Dieses wird mit Benzylamin zum sekundären Amin **23** umgesetzt^[59], welches anschließend mit dem Bromid **24** unter Bildung von **25** alkyliert wird.

Das Bromid **24** wird ebenfalls aus 2,3-Isopropyliden-Glycerin hergestellt. Hierzu setzt man dieses nacheinander mit Triphenylphosphin und *N*-Bromsuccinimid in Dichlormethan/Diethylether um. Durch Hydrierung an Pd-Kohle lässt sich der Benzylrest relativ leicht aus dem tertiären Amin **25** unter Bildung des gewünschten Zielmoleküls **26** entfernen.

Schema 4.6: Synthese von Bis-(2,2-dimethyl-[1,3]dioxolan-4ylmethyl)amin (**26**)

4.1.1.7 Synthese von **GRR 8**

Diese Synthese verläuft analog derjenigen von **GRR 7**. Ausgehend von Iodamsäuredichlorid (**2**) wird die aromatische Aminogruppe mit (Chlorcarbonylmethoxy)-essigsäureethylester (**12**) zur Reaktion gebracht. Das Produkt **28** setzt man nun mit einem Äquivalent **26** zu dem orthogonal geschützten aromatische Carbonsäurechlorid **29** um (Schema 4.7).



Schema 4.7: Synthese von **GRR-8**

4.1.2 Synthese der dendritischen Röntgenkontrastmittel

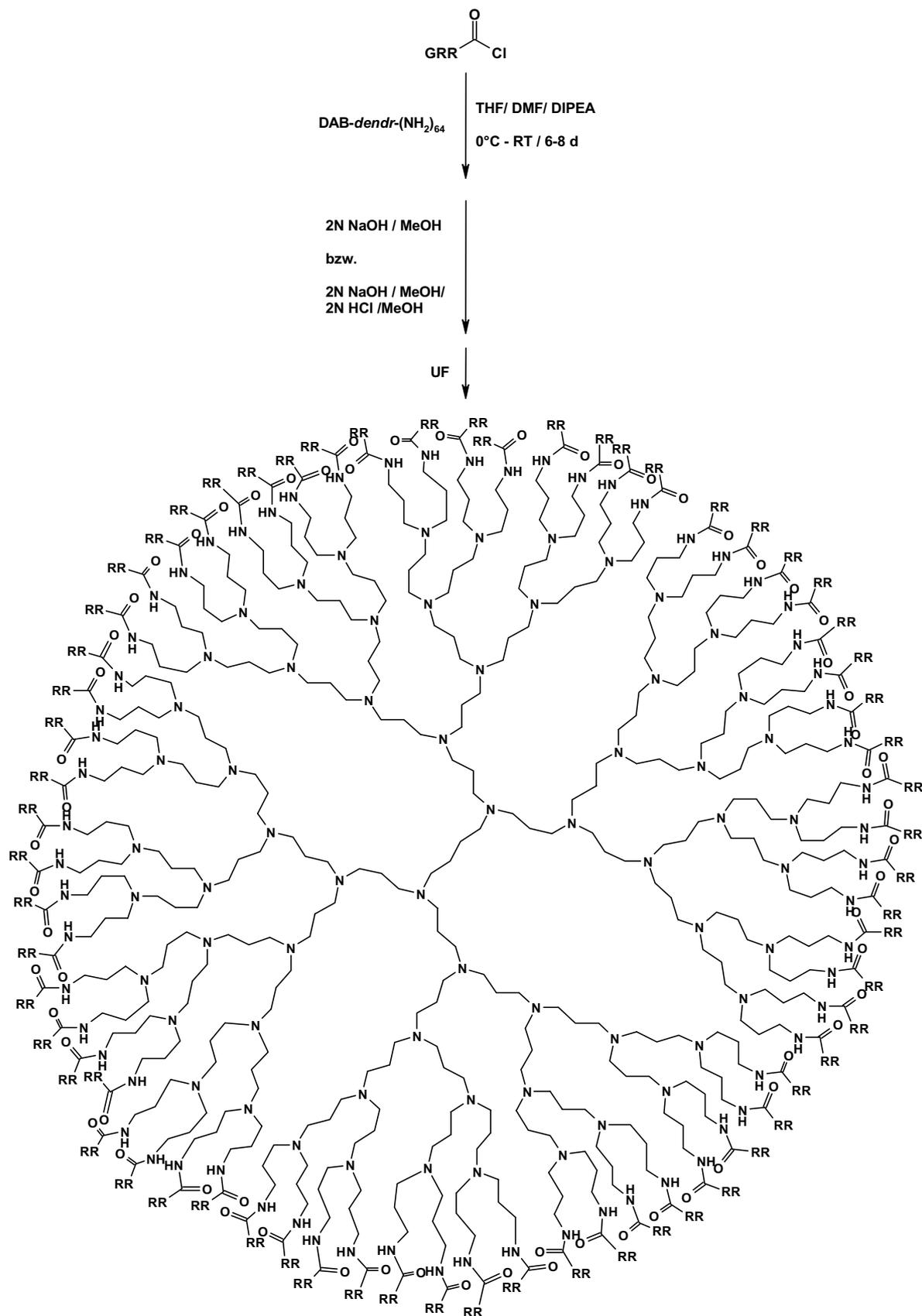
4.1.2.1 Allgemeines Syntheseschema

Nachdem die Synthesen der neuartigen, radiopaken Reste in den vorangehenden Kapiteln vorgestellt wurden, soll nunmehr auf die Synthesen der dendritischen Röntgenkontrastmittel eingegangen werden. Das nachfolgende Syntheseschema ist allgemein gehalten, da sich die einzelnen Reaktionsführungen nicht wesentlich unterscheiden.

Ein anderthalbfacher Überschuß (bezogen auf die Anzahl an Endgruppen des POPAM-Dendrimers) des als Carbonsäurechlorid aktivierten Triiodaromaten **GRR 1** bis **GRR 8** wird bei 0°C in einer Lösung aus Tetrahydrofuran/Dimethylformamid (Verhältnis ca. 4 - 5:1) mit dem POPAM-Dendrimer zu den dendritischen Verbindungen **Dendr-(GRR 1)₆₄** bis **Dendr-(GRR 8)₆₄** umgesetzt. Der große Triiodaromaten-Überschuß soll eine vollständige Derivatisierung der Amino-Endgruppen des Dendrimers gewährleisten. Ein großer Überschuß der Hilfsbase Diisopropylethylamin (DIPEA) soll zudem eine Protonierung der basischen, tertiären Aminogruppen des Dendrimers durch den frei werdenden Chlorwasserstoff verhindern, da dies zur Bildung von schwerlöslichen Hydrochloriden führen würde. Nach mehrtägigem Rühren bei Raumtemperatur werden die Ansätze filtriert und eingeeengt. Durch Zusatz von methanolischer NaOH-Lösung spaltet man im Falle der Dendrimere **Dendr-(GRR 1)₆₄** bis **Dendr-(GRR 6)₆₄** die Acetyl- bzw. Ethylester unter Bildung der wasserlöslichen Endprodukte **Dendr-(RR 1)₆₄** bis **Dendr-(RR 6)₆₄** (Schema 4.8).

Die dendritischen Verbindungen **Dendr-(GRR 7)₆₄** und **Dendr-(GRR 8)₆₄** besitzen neben den unter alkalischen Bedingungen spaltbaren Ethylester-Gruppen noch die Isopropyliden-Acetale. Diese sind im Alkalischen stabil und müssen daher durch Ansäuern mit 2 N HCl entfernt werden. Nach der Schutzgruppenabspaltung erhält man die beiden dendritischen Endprodukte **Dendr-(RR 7)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** (Schema 4.8).

Die weitere Reinigung der Produkte erfolgt durch eine Ultrafiltration (UF, MinitanTM-Ultrafiltrationsanlage der Fa. Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts) bei einem cut-off bei 10000 g/mol (Schema 4.8). Nach Gefriertrocknung der Retentate werden die dendritischen Röntgenkontrastmittel als farblose Feststoffe mit einem durchschnittlichen Wassergehalt von rund 3 % erhalten.



Schema 4.8: Synthese der dendritischen Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR N)₆₄**, N = 1-8

4.1.2.2 Übersicht der synthetisierten dendritischen Röntgenkontrastmittel

Eine Zusammenstellung der verschiedenen dendritischen Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR N)₆₄**, N = 1 - 8 mit den Strukturen der jeweiligen radiopaken Endgruppen ist in den Tabellen 4.3 und 4.4 gezeigt. Die Verknüpfungsstellen zwischen den aktivierten Triiodaromaten und den primären Aminogruppen des POPAM-Grundgerüsts, unter Ausbildung von Amidbindungen, sind durch einen Stern gekennzeichnet.

Dendrimer	Struktur der radiopaken Endgruppe
Dendr-(RR 1)₆₄	
Dendr-(RR 2)₆₄	
Dendr-(RR 3)₆₄	
Dendr-(RR 4)₆₄	

Tab. 4.3: Übersicht I, dendritische Röntgenkontrastmittel

Dendrimer	Struktur der radiopaken Endgruppe
Dendr-(RR 5)₆₄	
Dendr-(RR 6)₆₄	
Dendr-(RR 7)₆₄	
Dendr-(RR 8)₆₄	

Tab.4.4: Übersicht II, dendritische Röntgenkontrastmittel

Die Charakterisierung dieser erstmals synthetisierten dendritischen Röntgenkontrastmittel durch Gelpermeationschromatographie, Lichtstreuexperimente, viskosimetrische und densitometrische Untersuchungen sowie durch diverse elektrophoretische Methoden wird in den nachfolgenden Unterkapiteln 4.2 - 4.7 ausführlich beschrieben.

4.2 Gelpermeationschromatographie (GPC)

4.2.1 Theoretische Grundlagen

Die Gelpermeationschromatographie (GPC), auch unter dem Namen Größenausschluss-Chromatographie (engl. SEC \equiv Size Exclusion Chromatography) bekannt, ist heute die wichtigste und am häufigsten angewandte Methode zur Bestimmung der Molmassenverteilungen von Polymeren^[61]. Diese spezielle Art der Flüssigchromatographie trennt die Moleküle nach ihrer Molekülgröße und nicht nach ihrer Affinität zu dem verwendeten Säulenmaterial. Maßgeblich ist somit der hydrodynamische Radius r_h bzw. das hydrodynamische Volumen V_h der Moleküle.

Eine kleine Menge der zu trennenden Makromoleküle wird in den Lösemittelstrom injiziert und mit diesem durch eine Säule gepumpt, die mit einem porösen Gel gefüllt ist (Bild 4.1). Die stationäre Phase besteht aus vernetzten, im Lösemittel gequollenen kugelförmigen Polymerpartikeln, wie zum Beispiel Polystyrol, Polyacrylamid, Dextran oder Cellulose^[61]. Beim Transport entlang der Säule können nun die kleinsten Teilchen am weitesten in das Gel eindringen. Mittelgroße Teilchen dringen weniger weit in das Gel ein und Teilchen, die eine größere Ausdehnung als die größten Porendurchmesser haben, bleiben vom Gel ausgeschlossen. Daher werden die großen Teilchen vom Lösemittelstrom ohne zeitliche Verzögerung transportiert und ihr Elutionsvolumen V_e entspricht dem Volumen V_0 zwischen den Gelpartikeln^[62].

Je nach Größe steht kleinen und mittelgroßen Molekülen zusätzlich ein Volumen V_i anteilig zur Verfügung, das dem in den Poren enthaltenen Lösemittelvolumen entspricht. Somit ergibt sich folgende, als SEC-Gleichung^[61] bekannte Beziehung:

$$V_e = V_0 + k_d V_i \quad 0 \leq k_d \leq 1 \quad (\text{Gl. 4.1})$$

Der Verteilungskoeffizient k_d gibt den Bruchteil des Volumens im Gel an, der für ein Molekül bestimmter Größe zugänglich ist. Er hängt hauptsächlich von der Molekülgröße daneben aber auch von der Porengröße und Art des Gels, dem Lösemittel, der Temperatur und dem Verzweigungsgrad der gelösten Makromoleküle ab^[61].

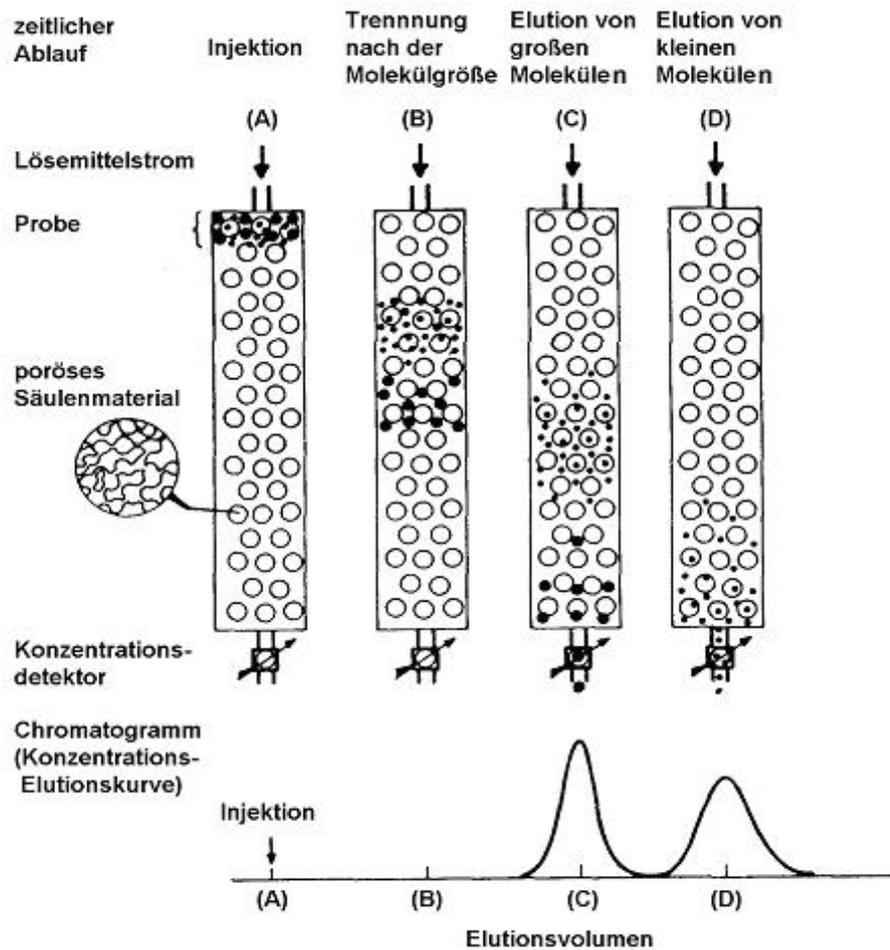


Bild 4.1: Verhältnisse innerhalb einer GPC-Säule^[63]

Bei herkömmlichen GPC-Untersuchungen ist eine Kalibrierung der Säule bzw. Säulenkombination mit mehreren Testsubstanzen bekannter Molmasse und sehr engen Molmassenverteilungen notwendig. Generell sollte sie mit Makromolekülen erfolgen, die ein ähnliches hydrodynamisches Volumen wie das zu untersuchende unbekannte Makromolekül besitzen. Aus den Elutionsvolumina kann die Molmasse über die Kalibrierfunktion $\log(M) = f(V_e)$ bestimmt werden. Da die zur Kalibrierung der Säule eingesetzten Testsubstanzen aber häufig ein anderes hydrodynamisches Volumen als die zu untersuchende Substanz aufweisen, erhält man nicht die wahre Molmasse, sondern statt dessen eine scheinbare Molmasse $M_{app.}$. Diese scheinbare Molmasse würde das zu untersuchende Molekül unter der Annahme, dass es dasselbe hydrodynamische Volumen wie die Eichsubstanzen einnimmt, besitzen. Verzweigte Makromoleküle haben beispielsweise kleinere

hydrodynamische Volumina als lineare Makromoleküle mit der gleichen Molmasse bzw. der gleichen Anzahl an Monomereinheiten^[64].

Die jeweiligen Anteile an Makromolekülen der Molmasse M können mit Hilfe eines Differentialrefraktometers (RI-Detektor) oder eines UV/VIS-Spektrometers ermittelt werden. Durch den Einsatz eines Lichtstredetektors können Eichprobleme umgangen werden, da der Lichtstredetektor das Massenmittel der Molmasse M_w jeder Fraktion absolut liefert. Sein Einsatz setzt die Kenntnis des spezifischen Brechungsindexinkrementes (dn/dc) des zu untersuchenden Makromoleküls im Lösemittel voraus. Das spezifische Brechungsindexinkrement (dn/dc) ist von fundamentaler Bedeutung, da dieser Wert als quadratisches Glied in die optische Konstante K einfließt. Es wird mit Hilfe eines Differentialrefraktometers bestimmt (vgl. Kapitel 4.3.2).

4.2.2 Größenausschlußchromatographie dendritischer Röntgenkontrastmittel

Die synthetisierten dendritischen Röntgenkontrastmittel wurden an der TU Berlin mit Hilfe der GPC untersucht. Die GPC-Anlage bestand aus einer LC10AD Pumpe (Fa. Shimadzu Corporation, Kyoto), einem UV-Detektor vom Typ Waters M484 (Fa. Waters Corporate, Milford), einem MALLS-Detektor (engl. MALLS \equiv Multi Angle Laser Light Scattering) vom Typ DAWN[®] DSP (Fa. Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara) sowie einem Optilab[®] DSP Differentialrefraktometer (Fa. Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara). Als stationäre Phase wurde eine Kombination aus einer Superdex 75[®]-Säule (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und Superose 12[®]-Säule (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gewählt. Eine 0,1 M Na₂HPO₄-Lösung mit einem Zusatz von 0,02 Gew.-% des Stabilisators NaN₃ fungierte als Elutionsmittel. Das Natriumazid soll durch seine antibakterielle Wirkung ein Verkeimen der Na₂HPO₄-Lösung verhindern. Der pH-Wert dieser Lösung betrug 9,25.

Die GPC-Anlage wurde mit Hilfe von Pullulan (Fa. Polymer Standards Service GmbH, Mainz) einer Eichsubstanz auf Basis eines unverzweigten Polysaccharids, kalibriert. Wie in Kapitel 4.2.4 gezeigt wird, haben Pullulan und die dendritischen Röntgenkontrastmittel unterschiedliche hydrodynamische Eigenschaften. Somit spiegeln die gefundenen Molmassen

die tatsächlichen Verhältnisse nicht korrekt wider. Die Molmassenbestimmung erfolgte daher unter Verwendung des oben genannten Lichtstreuendetektors.

Die nachfolgenden Chromatogramme der beiden dendritischen Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR 5)₆₄** (Bild 4.2) und **Dendr-(RR 1)₆₄** (Bild 4.3) sollen repräsentativ für alle synthetisierten dendritischen Röntgenkontrastmittel erläutert werden. Das normierte Signal des Lichtstreuendetektors (LS-), gemessen bei $\theta = 90^\circ$, sowie die UV- und RI-Detektorsignale sind gegen das Elutionsvolumen V_e aufgetragen worden.

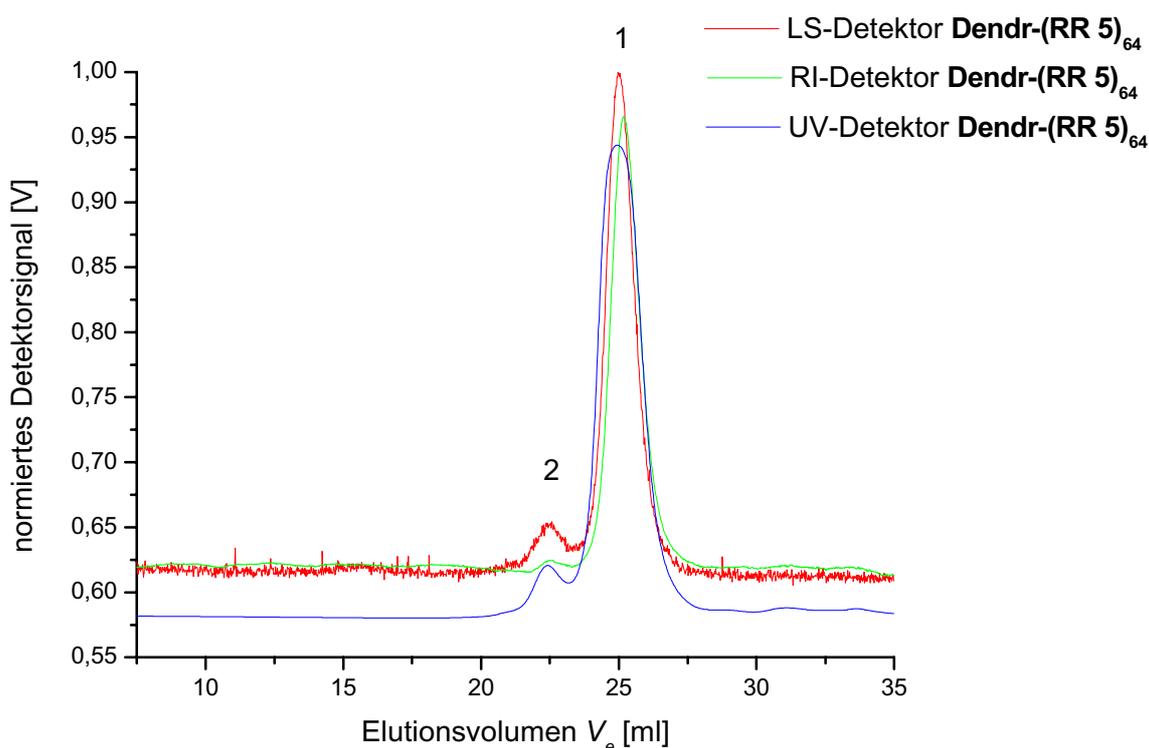


Bild 4.2: Größenausschlußchromatogramm des Dendrimers **Dendr-(RR 5)₆₄**

Im Chromatogramm der Verbindung **Dendr-(RR 5)₆₄** sind zwei Peaks, hier als Peak 1 bzw. Peak 2 indiziert, zu erkennen. Die Verbindung **Dendr-(RR 5)₆₄** weist eine bimodale Molmassenverteilung auf. Die Hauptkomponente (Peak 1) besitzt ein Elutionsvolumen von etwa 25 ml. Das Nebenprodukt (Peak 2) eluiert bei einem Volumen von ungefähr 22 ml.

Größenausschluß-Chromatogramme, die sich nur minimal von demjenigen der Verbindung **Dendr-(RR 5)₆₄** (Bild 4.2) unterscheiden, werden auch bei den Proben **Dendr-(RR 2)₆₄**, **Dendr-(RR 3)₆₄**, **Dendr-(RR 4)₆₄**, **Dendr-(RR 6)₆₄**, und **Dendr-(RR 7)₆₄** erhalten. Diese Proben weisen ebenfalls eine bimodale Molmassenverteilung auf und ihre Hauptkomponenten

eluierten alle bei ca. 25 ml. Diese Verbindungen zeigen daher ein ähnliches hydrodynamisches Volumen. Zugleich findet man bei sämtlichen Nebenprodukten ähnliche Elutionsvolumina und damit ein nahezu identisches hydrodynamisches Verhalten.

Aus der Fläche unter den Kurven der RI-Detektorsignale kann auf die relativen Anteile der einzelnen Komponenten an der Gesamtmenge geschlossen werden. Bei den oben genannten Verbindungen beträgt der Anteil der Hauptkomponente an der Gesamtmenge etwa 96 %, während sich der Anteil der Nebenprodukte auf rund 4 % beläuft.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Dendrimeren findet man bei der GPC der beiden dendritischen Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR 1)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** eine trimodale Molmassenverteilung. Da beide Proben ähnliche Chromatogramme besitzen, ist hier repräsentativ das der Substanz **Dendr-(RR 1)₆₄** (Bild 4.3) gezeigt. Außer der mit der Ziffer 1 indizierten Hauptkomponente sind noch zwei weitere Komponenten zu erkennen. Die Komponente 3 wird in Form einer Schulter des zur Komponente 2 gehörenden Signals detektiert. Jedoch eluiert auch die Hauptkomponente der beiden Proben **Dendr-(RR 1)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** bei einem Volumen von ca. 25 ml.

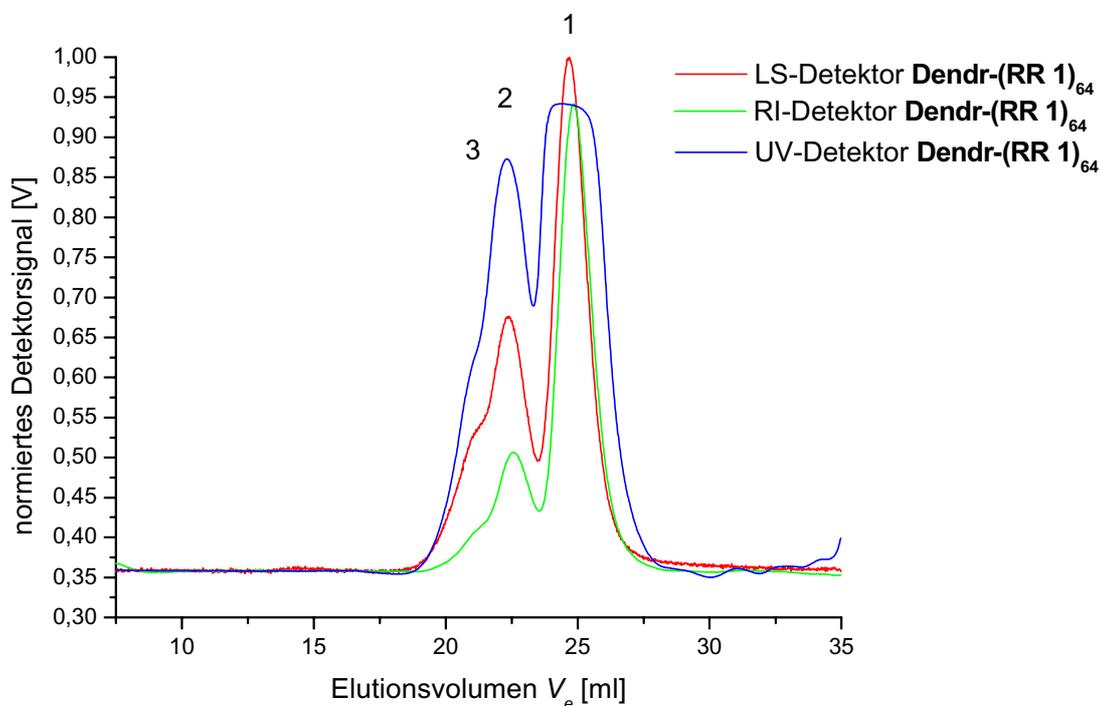


Bild 4.3: Größenausschlußchromatogramm des Dendrimers **Dendr-(RR 1)₆₄**

Die Hauptkomponenten dieser beiden dendritischen Röntgenkontrastmittel zeigen folglich nahezu das gleiche hydrodynamische Verhalten wie die Hauptkomponenten der sechs zuvor beschriebenen bimodal verteilten dendritischen Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR N)₆₄**, **N = 2 - 7**. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass es sich hierbei um die gewünschten dendritischen Zielverbindungen **Dendr-(RR N)₆₄**, **N = 1 - 8** handelt. Die Elutionsvolumina der Nebenkomponten 2 und 3 betragen 22,3 ml bzw. 22,6 ml. Deren Anteile sind bei den Proben **Dendr-(RR 1)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** mit rund 17 % jedoch deutlich größer als bei den sechs zuvor beschriebenen bimodal verteilten Dendrimeren.

Die mit Hilfe des MALLS-Detektors bestimmten Molmassen der Haupt- und Nebenkomponten aller synthetisierten Dendrimere sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst. Neben den theoretischen Molmassen der mit 64 radiopaken Endgruppen funktionalisierten POPAM-Dendrimere sind auch die Einheitlichkeiten der unterschiedlichen Fraktionen angegeben.

Dendrimer	Theoret. Molmasse $M_{theoret.}/[g/mol]$	Molmasse $M_w/[g/mol]$			Einheitlichkeit M_w/M_n		
		Peak Nr.			Peak-Nr.		
		1	2	3	1	2	3
Dendr-(RR 1)₆₄	62278	54800	113200	212100	1,03	1,02	1,06
Dendr-(RR 2)₆₄	64074	60300	112000		1,00	1,08	
Dendr-(RR 3)₆₄	62278	54100	77990		1,01	1,06	
Dendr-(RR 4)₆₄	64074	58900	113700		1,02	1,12	
Dendr-(RR 5)₆₄	61255	48000	100900		1,00	1,05	
Dendr-(RR 6)₆₄	63050	63100	130800		1,00	1,03	
Dendr-(RR 7)₆₄	57603	60400	115900		1,02	1,25	
Dendr-(RR 8)₆₄	58627	60000	129300	228600	1,01	1,01	1,04

Tab. 4.5: Ergebnisse der GPC-Untersuchungen der dendritischen Röntgenkontrastmittel

Die Molmassen M_w der Hauptkomponenten (Peak 1) weichen etwas von den theoretischen Molmassen $M_{theoret.}$ der vollständig mit Triiodaromaten funktionalisierten POPAM-Dendrimere ab. Am deutlichsten ist diese Differenz bei der Verbindung **Dendr-(RR 5)₆₄**. Die beste Übereinstimmung dieser beiden Werte wird dagegen bei der Probe **Dendr-(RR 6)₆₄** gefunden. Vermutlich verlief die polymeranaloge Umsetzung von DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄, Charge ng98751 mit dem aktivierten Triiodaromaten **GRR 5** unvollständig, während die übrigen polymeranalogen Umsetzungen zu deutlich höheren Besetzungszahlen des POPAM-Dendrimers mit den aktivierten Triiodaromaten geführt haben. Eventuell sind hierfür sterische Faktoren verantwortlich. Die Einheitlichkeiten M_w/M_n der Hauptkomponenten (Peak 1) sind mit Werten von 1,01 - 1,03 sehr gut (vgl. Tabelle 4.5). Hier zeigt sich der große Vorteil der dendritischen Röntgenkontrastmittel gegenüber den auf herkömmliche Art und Weise synthetisierten Makromolekülen (vgl. Kapitel 3.2.2.1).

Die mit 2 bzw. 3 indizierten Fraktionen (vgl. Bild 4.2 und 4.3) weisen deutlich höhere Molmassen auf. Die zu den Nebenkomponten (Peak 2) gehörenden Molmassen M_w betragen jeweils rund das Doppelte des für die korrespondierende Hauptkomponente (Peak 1) gefundenen Wertes. Die Einheitlichkeiten liegen hier im Bereich zwischen 1,01 - 1,12 und sind generell etwas schlechter als die der Hauptkomponenten.

Bei den beiden trimodal verteilten dendritischen Röntgenkontrastmitteln **Dendr-(RR 1)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** sind die bei der Fraktion 3 gefundenen Molmassen mit Werten $M_w > 200000$ g/mol besonders hoch und jeweils ungefähr um den Faktor 3,8 größer als die Molmassen der Hauptkomponente (Peak 1). Ihre Einheitlichkeiten sind mit 1,06 bzw. 1,04 ebenfalls schlechter als die der korrespondierenden Hauptkomponenten.

Derartige höhermolekulare Verunreinigungen könnten zu einer eingeschränkten renalen Eliminierung der dendritischen Röntgenkontrastmittel führen und müssen daher vor einem klinischen Einsatz beseitigt werden (vgl. Kapitel 4.8).

4.2.2.1 Analytik der eingesetzten Chargen von DAB-dendr-(NH₂)₆₄

Zu klären ist nun, ob diese unterschiedlichen Molmassenverteilungen eine Folge der Reaktionsführung der polymeranalogen Umsetzungen ist. Während die dendritischen Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR 1)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** mit dem POPAM-Dendrimer DAB-dendr-(NH₂)₆₄, Charge ng12351 umgesetzt wurden, kam bei den restlichen polymeranalogen Umsetzungen ausschließlich die Charge ng98751 mit neuerem Datum zum Einsatz. Eine Ursache für die abweichenden Molmassenverteilungen könnte also in der unterschiedlichen Qualität der eingesetzten Chargen des POPAM-Grundgerüsts liegen, was sehr wahrscheinlich ist. Um diese Vermutung zu verifizieren, wurden beide Chargen des POPAM-Dendrimers DAB-dendr-(NH₂)₆₄ sowohl einer HPLC- als auch einer GPC-Untersuchung unterzogen. Daneben wurden beide Chargen bei der *Schering AG* massenspektrometrisch analysiert.

Die HPLC-Untersuchung wurde bei der *Schering AG* an einer Hypercarb 100*4,6- Säule durchgeführt. Die Anlage bestand aus den beiden Pumpen Waters 510 (für Wasser) und Waters 590 (für Acetonitril) (Fa. Waters Coporate, Milford) und einem Degasser der Fa. Knauer, Berlin. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Verdampfungs-Lichtstredetektors PL ELS 1000 der Fa. Polymer Labratories, Waltrop. Als Elutionsmittel diente ein Lösemittelgradient aus Acetonitril/Wasser. Dabei wurde der Acetonitril-Anteil, ausgehend von einem Gemisch aus 5 % Acetonitril und 95 % Wasser, innerhalb von 25 min kontinuierlich auf 100 % gesteigert und anschließend weitere 5 min mit reinem Acetonitril eluiert. Alle Lösemittel waren mit einem 0,05 %-igen Zusatz an Trifluoressigsäure versehen, um die Polarität der Dendrimere durch die Protonierung der Aminogruppen zu erhöhen.

Das Chromatogramm der Charge ng98751 (Bild 4.4) zeigt einen relativ steil ansteigenden, breiten Peak. Das Peakmaximum liegt bei einer Retentionszeit von ca. 8,8 min. Anschließend nimmt das Detektorsignal kontinuierlich ab und erreicht nach etwa 14 min wieder seinen Ausgangswert.

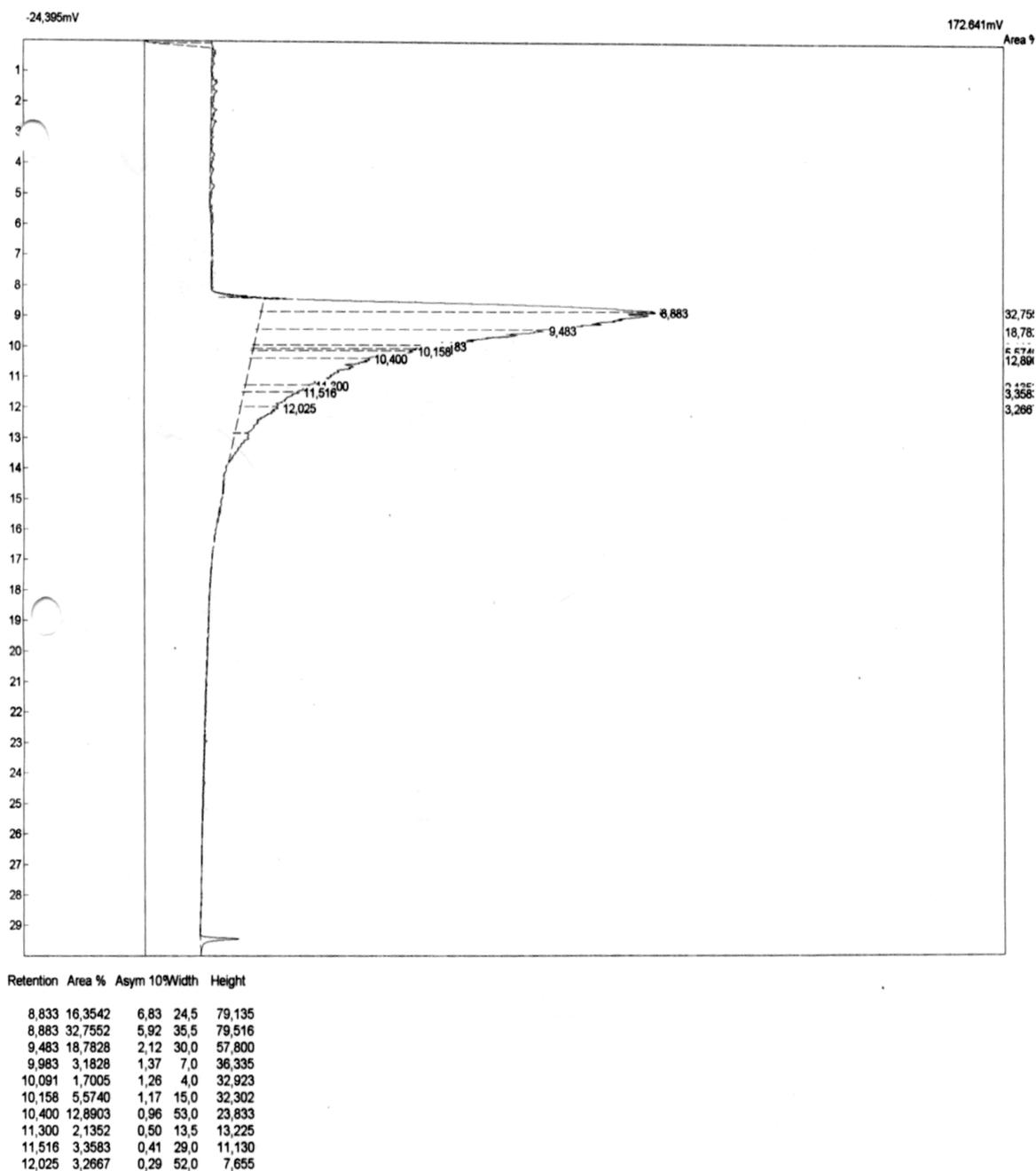


Bild 4.4: HPLC-Chromatogramm der Verbindung DAB-dendr-(NH₂)₆₄, Charge ng98751

Die ungewöhnliche Peakbreite ist höchstwahrscheinlich eine Folge der unterschiedlichen Protonierungsgrade der 126 basische Aminogruppen des DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄-Dendrimers (verteilt auf 62 tertiäre und 64 primäre Aminogruppen), die durch den TFA-Zusatz zu den Lösemitteln verursacht werden.

Eventuell vorhandene Fehlstellen bzw. Fehlsequenzen innerhalb des POPAM-Dendrimers lassen sich mit Hilfe der HPLC nicht direkt nachweisen, da die Absorptionsunterschiede zum Säulenmaterial zu gering für eine differenzierte Detektion sind^[65].

Im Chromatogramm der Charge ng12351 (Bild 4.5) sind zwei weitere Komponenten zu sehen. Nach dem ebenfalls steilen Anstieg des ersten Peaks mit einem Peakmaximum bei der Retentionszeit von 10,1 min, fällt auch dieser kontinuierlich ab. Bei einer Retentionszeit von 12,9 min wird ein zweiter Peak detektiert, der im Chromatogramm der Charge ng98751 (Bild 6) nicht zu erkennen ist. Ein deutlich abgegrenzten dritten Peak wird schließlich bei einer Retentionszeit von 15,4 min gefunden, der ebenfalls nicht im Chromatogramm der Charge ng98751 vorhanden ist.

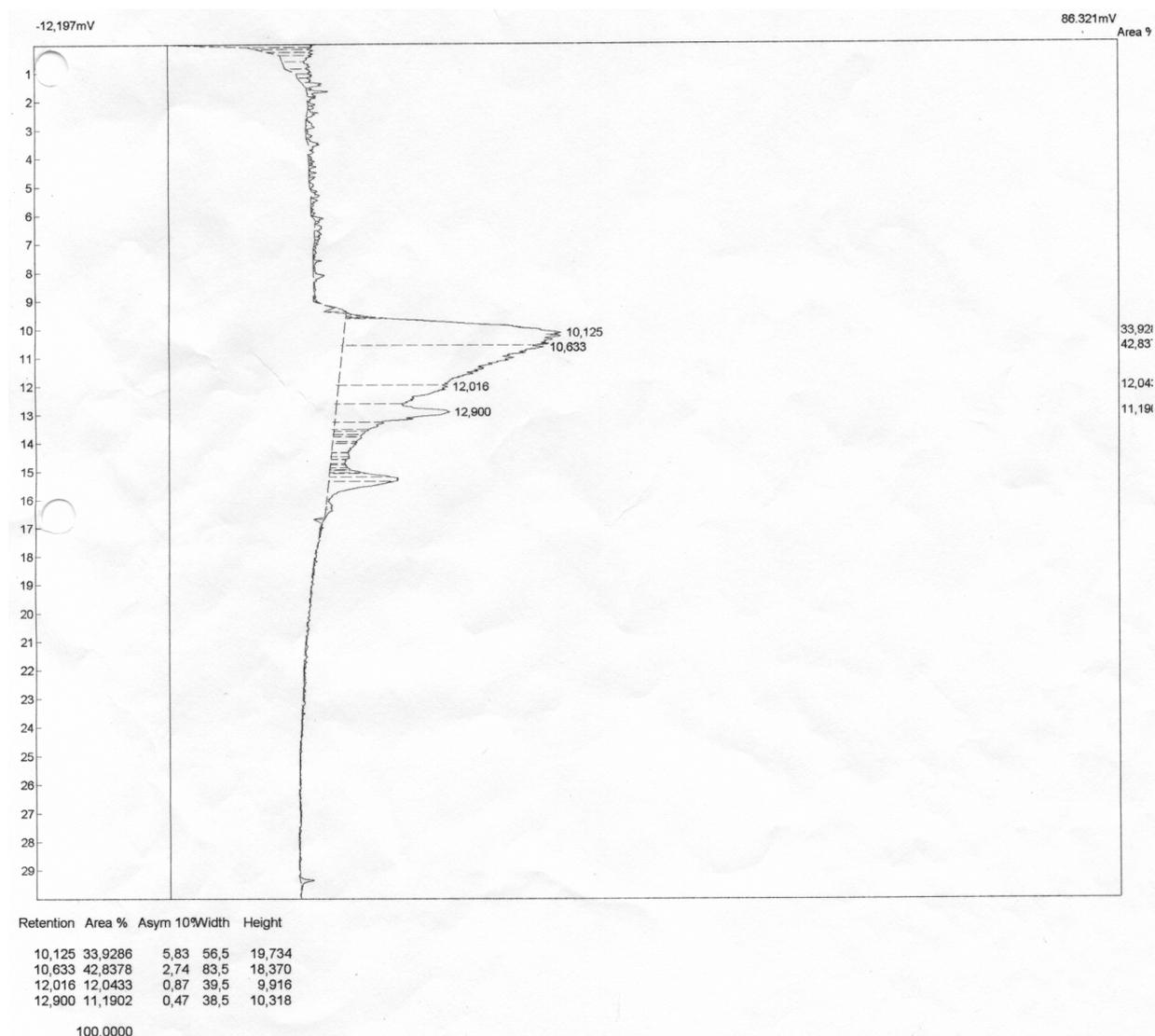


Bild 4.5: HPLC-Chromatogramm der Verbindung DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄, Charge ng12351

Beide Chargen des POPAM-Dendrimers DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄ wurden mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie (engl. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight, Matrixgestützte Laserionisations/Desorptions Massenspektrometrie) analysiert. Dabei wurde jeweils ein Hauptpeak bei $m/z = 7166$ gefunden. Mit dieser Methode konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Dendrimer-Chargen festgestellt werden. Vor allem die An- bzw. Abwesenheit eventuell vorhandener höhermolekularer Anteile konnte nicht zweifelsfrei geklärt werden.

Gegenüber der Gelpermeationschromatographie der dendritischen Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR 1)₆₄** bis **Dendr-(RR 8)₆₄** wurden zur Untersuchung der beiden Chargen ng98751 und ng12351 Bedingungen gewählt, die von Mitarbeitern der Firma DSM, dem Hersteller der POPAM-Dendrimere DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄, publiziert worden sind^[65]. Als Eluent wurde eine 0,3 M Na₂SO₄-Lösung mit 0,1 %-igem Trifluoressigsäure-Zusatz verwendet. Außerdem wurde hier nur eine Superdex 75[®]-Säule eingesetzt, die Superose 12[®]-Säule, die bei den dendritischen Röntgenkontrastmitteln zum Einsatz kam, wurde dagegen nicht benutzt.

In Bild 4.6 sind die beiden Chromatogramme der Chargen ng98751 und ng12351 von DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄ übereinander gelegt worden. Der besseren Übersichtlichkeit wegen sind nur die normierten RI-Detektorsignale aufgetragen.

Eine Nebenkomponente mit einem Elutionsvolumen von ca. 11 ml (Peak 3) ist bei beiden Dendrimer-Chargen zu erkennen. Das Chromatogramm der Charge ng12351 zeigt außerdem eine signifikante Schulter beim Elutionsvolumen von ca. 14 ml (Peak 1).

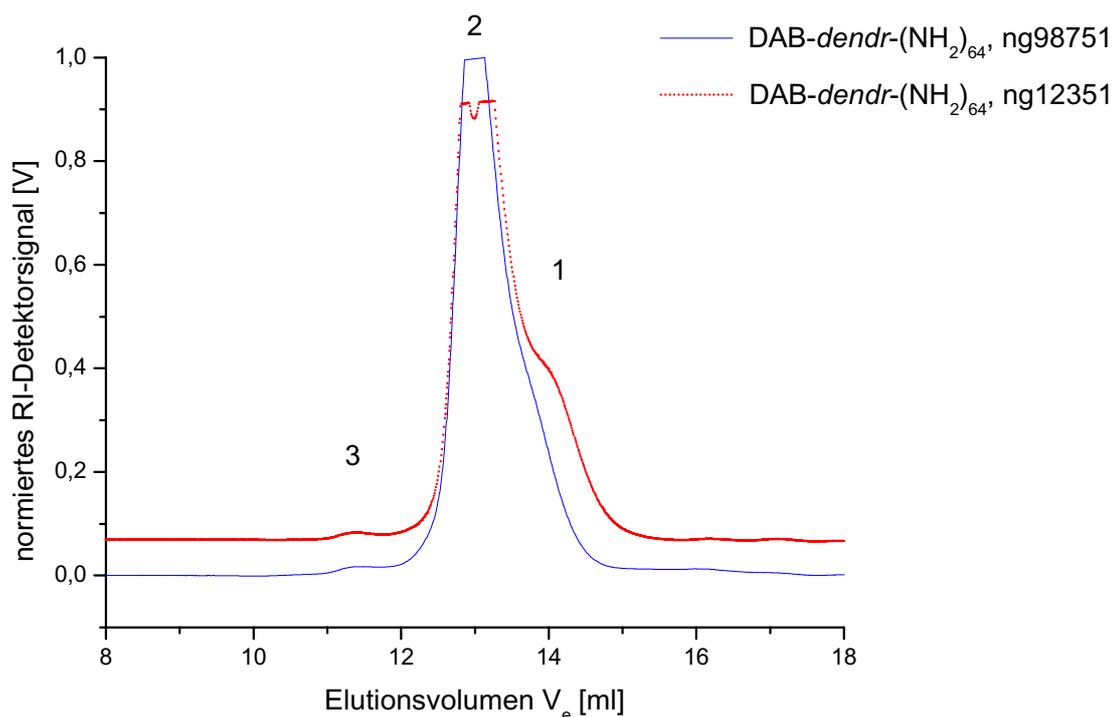


Bild 4.6: Vergleich der Chromatogramme der beiden Chargen ng98751 und ng12351 des Dendrimers DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄; [Säule: Superdex[®]75; Eluent: 0,3 M Na₂SO₄-Lösung + 0,1% TFA]

Da die Chromatographiebedingungen im Vergleich zu denen bei der Analyse der dendritischen Röntgenkontrastmittel deutlich verändert wurden (Wechsel des Eluenten und damit auch unterschiedliche pH-Werte, anderes Säulenmaterial) findet man natürlich nicht die gleichen Peakmuster. Dennoch kann die Reinheit der Chargen ng98751 und ng12351 qualitativ beurteilt werden. Zusammen mit den Ergebnissen der HPLC kann auf eine deutlich schlechtere Qualität der Charge ng12351 geschlossen werden. Diese Tatsache schlägt sich naturgemäß auch in den polymeranalogen Umsetzungen von Charge ng12351 mit den aktivierten Triiodaromaten **GRR 1** und **GRR 8** nieder. Die erhaltenen Größenausschluß-Chromatogramme der Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR 1)₆₄** bis **Dendr-(RR 8)₆₄** sind letztlich also ein Abbild der qualitativ unterschiedlichen dendritischen Grundgerüste.

Wie die chromatographischen Untersuchungen der verschiedenen Chargen des POPAM-Dendrimers zeigen, beeinflussen eventuell vorhandene Verunreinigungen die Produktverteilung unmittelbar. Im Hinblick auf eine Anwendung von dendritischen Röntgenkontrastmitteln ist daher die Kenntnis der Güte des verwendeten POPAM-Grundgerüsts entscheidend. Je größer der Anteil an höhermolekularen Verunreinigungen ist, desto mehr Moleküle des aktivierten Triiodaromaten reagieren mit deren Amino-Endgruppen und werden bei der polymeranalogen Umsetzung nutzlos verbraucht. Hierdurch steigen die Synthesekosten extrem an.

4.2.2.2 Einfluss der Eichsubstanz auf die ermittelten Molmassen

Wie wichtig die Wahl der „passenden“ Eichsubstanz für die ermittelten Molmassen bei einer GPC-Untersuchung ist, verdeutlicht Tabelle 4.6. Hier sind die über eine Pullulankalibrierung erhaltenen Molmassen einiger dendritischer Röntgenkontrastmittel gezeigt. Pullulan ist ein lineares Makromolekül und besitzt als solches ein anderes hydrodynamisches Verhalten als die hoch verzweigten dendritischen Röntgenkontrastmittel. Die gefundenen scheinbaren Molmassen $M_{app}(1)$ der Hauptkomponenten (Peak 1) liegen im Bereich zwischen 9800 g/mol und 11900 g/mol.

Bildet man den Quotienten aus theoretischer Molmasse $M_{theoret.}$ und der scheinbaren Molmassen $M_{app}(1)$ so findet man Faktoren in der Größenordnung um 5,5 - 5,9. Um diese

Faktoren unterscheiden sich folglich auch die hydrodynamischen Volumina der untersuchten dendritischen Röntgenkontrastmittel von dem Pullulan-Standard. Daher ist eine mit Hilfe von Pullulan kalibrierte GPC-Säule für die Molmassenbestimmung von dendritischen Röntgenkontrastmitteln ungeeignet und führt zu viel zu kleinen Molmassenwerten. Die Tatsache, dass die scheinbare Molmasse $M_{app.}$ aller untersuchten Dendrimerproben um etwa den gleichen Faktor differieren, ist ein weiteres Indiz für das nahezu identische hydrodynamische Verhalten der untersuchten dendritischen Röntgenkontrastmittel. Die Struktur der radiopaken Endgruppen hat folglich keinen signifikanten Einfluß auf deren hydrodynamisches Verhalten.

Dendrimer	Theoret. Molmasse $M_{theoret.}$ [g/mol]	Scheinbare Molmasse			$\frac{M_{theoret.}}{M_{app.}}$ (1)
		$M_{app.}$ [g/mol]			
		Peak Nr.			
		1	2	3	
Dendr-(RR 1)₆₄	62278	11300	20600	32000	5,51
Dendr-(RR 3)₆₄	62278	11600	22300		5,37
Dendr-(RR 4)₆₄	64074	11000	20000		5,82
Dendr-(RR 5)₆₄	61255	11900	23000		5,15
Dendr-(RR 6)₆₄	63050	11300	23500		5,58
Dendr-(RR 7)₆₄	57603	10300	21400		5,59
Dendr-(RR 8)₆₄	58627	9800	20000	33000	5,98

Tab. 4.6: Scheinbare Molmassen $M_{app.}$ bei einer Kalibrierung der GPC-Säule mit Hilfe von Pullulan

4.2.2.3 Untersuchungen zur chemischen Beständigkeit bei der Hitzesterilisation

Generell gelten für die Herstellung von Injektions- und Infusionslösungen besondere Qualitätsanforderungen^[21]. So schließt sich beispielsweise nach dem Abfüllen eines Röntgenkontrastmittels eine Hitzesterilisation an. Hierbei werden die Kontrastmittellösungen

20 min lang in geschlossenen Ampullen bei 120°C autoklaviert. Unter diesen Bedingungen darf sich ein Röntgenkontrastmittel nicht zersetzen.

Für eine qualitative Beurteilung der chemischen Beständigkeit der synthetisierten radiopaken Dendrimere ist die Gelpermeationschromatographie hervorragend geeignet. Die zuvor untersuchten Dendrimerproben wurden in verschlossenen Glasfläschchen im Trockenschrank für die Dauer von 60 min bei 120°C gelagert. Nach dem Abkühlen wurden die Lösungen mittels GPC untersucht. Durch Vergleich mit den vor der Hitzebehandlung erhaltenen Chromatogrammen derselben Proben, lassen sich Aussagen zur chemische Beständigkeit der Verbindungen treffen.

In dem Bild 4.7 ist das Chromatogramm des dendritischen Röntgenkontrastmittels **Dendr-(RR 3)₆₄** vor und nach einer Hitzebehandlung übereinander gelegt gezeigt. Die ausgezogenen Linien stehen für das RI-Detektorsignal der Messung vor der Hitzebehandlung, die punktierte Linie repräsentiert das RI-Detektorsignal nach der Hitzebehandlung. Die Signale des LS- und UV-Detektors wurden der besseren Übersichtlichkeit wegen weggelassen.

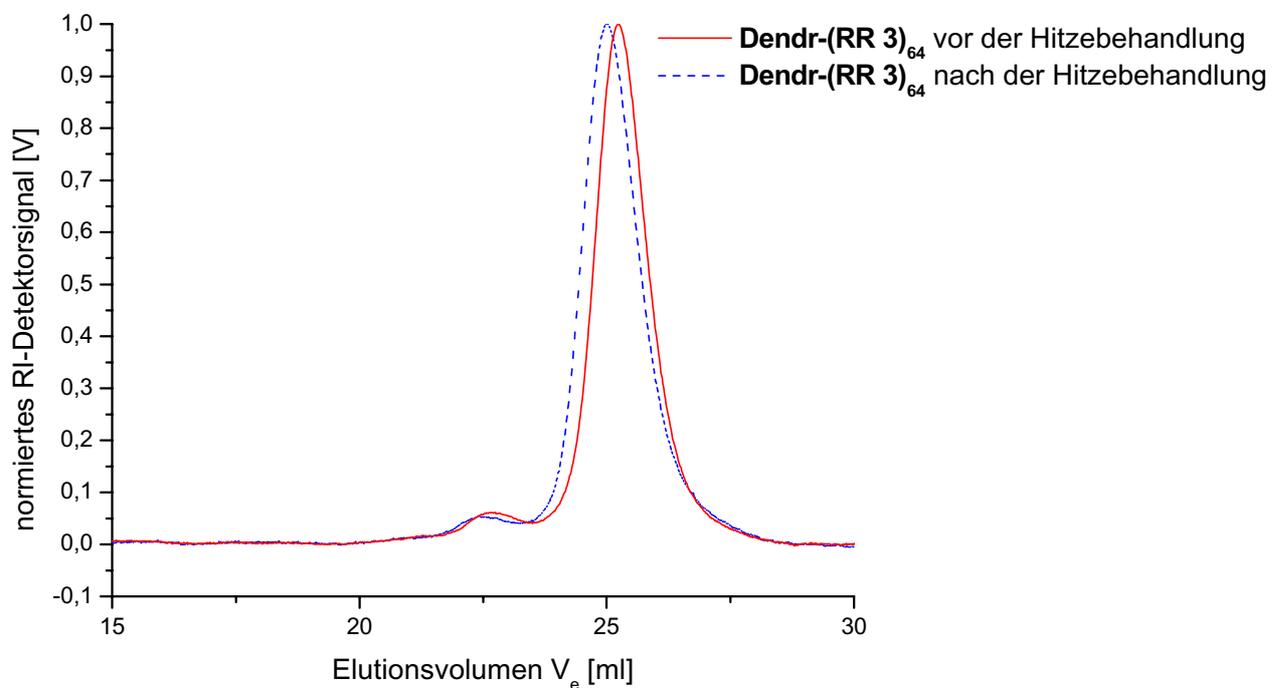


Bild 4.7: Chromatogramme der Verbindung **Dendr-(RR 3)₆₄** vor und nach der Hitzebehandlung

Sowohl die Verbindungen **Dendr-(RR 3)₆₄** als auch die anderen, hier nicht explizit besprochenen Röntgenkontrastmittel, sind unter der oben beschriebenen Sterilisationsbedingungen beständig. Die jeweils vor und nach der Hitzebehandlung aufgenommenen Chromatogramme sind fast deckungsgleich und bei keiner Probe sind Zersetzungsprodukte nachweisbar. Somit sollten alle im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten dendritischen Röntgenkontrastmittel im Produktionsprozeß der Hitzesterilisation chemisch ausreichend beständig sein.

4.3 Statische Lichtstreuung

4.3.1 Theoretische Grundlagen

Streumethoden sind die wichtigsten Methoden zur Bestimmung der Gestalt und Dimension von Makromolekülen^[66]. Die Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit Materie führt zu einer Absorption oder einer Streuung. Trifft ein oszillierendes elektrisches Feld auf ein unpolares Molekül, so werden die Schwerpunkte der positiven und negativen Ladungen getrennt. Es wird ein inneres elektrisches Feld erzeugt, das dem äußeren entgegenwirkt. Man bezeichnet dieses Verhalten als Verschiebungspolarisation^[67]. Der induzierte Dipol schwingt mit der gleichen Frequenz wie das anregende Feld und strahlt seinerseits ein elektromagnetisches Wechselfeld, die Streustrahlung, aus. Die einfallenden und die gestreuten Wellen sind kohärent, man spricht auch von einem elastischen Streuprozess. Bei der theoretischen Beschreibung der durch elektromagnetische Strahlung hervorgerufenen Streuprozesse berücksichtigt man lediglich oszillierende elektrische Felder, magnetische Felder spielen dagegen eine untergeordnete Rolle.

Die physikalischen Betrachtungen sind auf den gesamten Wellenlängenbereich anwendbar. Zur analytischen Untersuchung von Makromolekülen arbeitet man aber hauptsächlich mit sichtbarem Licht im Wellenlängenbereich zwischen 300 und 700 nm (zum Vergleich: Neutronenstrahlung (0,1 - 1 nm) und Röntgenstrahlung (0,02 - 2 nm)). Das Verhältnis der Teilchenabmessungen zur Wellenlänge des einfallenden Lichtes unterteilt die Lichtstreuung in zwei verschiedene Bereiche^[68].

1. Rayleigh-Bereich: Lichtstreuung an kleinen Molekülen, der Teilchendurchmesser d ist kleiner als $\lambda/20$.
2. Debye-Bereich: Lichtstreuung an großen Molekülen, der Teilchendurchmesser d liegt im Bereich der Wellenlänge des erregenden Lichts ($\lambda > d > \lambda/20$).

Rayleigh leitete im Jahr 1871 erstmals folgende Beziehung für das Verhältnis der Intensität I_s von gestreutem zur Intensität I_0 des einfallenden Lichtes her:

$$\frac{I_s}{I_0} = \frac{16\pi^4 \alpha^2 (\sin \theta)^2}{\lambda_0^4 r^2} \quad (\text{Gl. 4.2})$$

mit: α = Polarisierbarkeit

θ = Beobachtungswinkel

λ_0 = Wellenlänge des einfallenden Lichts

r = Abstand zwischen dem Beobachter und dem schwingenden Dipol

Für unpolarisiertes Licht, das aus zwei linear polarisierten Lichtstrahlen gleicher Intensität aber senkrecht zueinander stehenden Polarisations Ebenen (Index h : „horizontal“; Index v : „vertikal“) besteht, gilt:

$$\frac{I_s}{I_0} = \frac{16\pi^4 \alpha^2}{\lambda_0^4 r^2} \left[\left(\frac{1}{2} \right) [(\sin \theta_h)^2 + (\sin \theta_v)^2] \right] \quad (\text{Gl. 4.3})$$

$$= \frac{8\pi^4 \alpha^2}{\lambda_0^4 r^2} [1 + (\cos \theta)^2] \quad (\text{Gl. 4.4})$$

Über die Clausius-Mosotti-Gleichung ist die Polarisierbarkeit α mit der Dielektrizitätskonstanten ϵ und durch die *Maxwellsche* Beziehung $\epsilon = n^2$ auch mit dem Brechungsindex n verknüpft.

$$\alpha = \frac{M}{2\pi N_L} \left(\frac{dn}{dc} \right) \quad (\text{Gl. 4.5})$$

mit: (dn/dc) = spezifisches Brechungsindexinkrement,

M = molare Masse,

N_L = Loschmidt-Konstante,

c = Massenkonzentration in Gramm pro Kubikzentimeter Lösung.

Die Intensität I_s des Lichtes, das von einem System unabhängiger Moleküle gestreut wird, ist bei einer gegebenen Massenkonzentration proportional zu deren molarer Masse. In einer verdünnten makromolekularen Lösung setzt sich die Intensität des Streulichtes aus zwei Beiträgen zusammen, der Dichtefluktuation des Lösemittels und dem Beitrag des gelösten Makromoleküls. Da die Dichtefluktuation des Lösemittels durch einen geringen Anteil an Makromolekülen nicht beeinflusst wird, läßt sich durch Vergleich der Streuintensitäten des reinen Lösemittels und der verdünnten Lösung der Beitrag der gelösten Makromoleküle ermitteln. Die statische Lichtstreuung ist also von den unterschiedlichen Polarisierbarkeit zwischen den zu untersuchenden Makromolekülen und dem Lösemitteln abhängig^[66]. Unter Einbeziehung des Brechungsindex n_0 des Lösemittel erhält man die für ideale Systeme gültige Beziehung:

$$\frac{I_s}{I_0} = \frac{2\pi^2 n_0^2 M c}{r^2 \lambda_0^4 N_L} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \left[1 + (\cos\theta)^2 \right] \quad (\text{Gl. 4.6})$$

Bei nicht idealen Lösungen müssen die örtlichen Konzentrationsschwankungen δc innerhalb der Lösung berücksichtigt werden. Diese führen zu einer Änderungen in der *Gibbs*schen Energie ΔG . Unter Anwendung der Boltzmann-Statistik und allgemeiner thermodynamischer Gesetze lassen sich die Änderungen der *Gibbs*schen Energie bzw. des chemischen Potentials in Abhängigkeit von der Konzentration beschreiben. Ausgehend von einem Virialansatz ergibt sich schließlich die Fundamentalgleichung der Lichtstreuung von unpolarisiertem Licht an gelösten Molekülen, die sehr viel kleiner als die Wellenlänge des eingestrahlt Lichts sind:

$$\frac{K c}{R(\theta)} = \frac{1}{M} + 2 A_2 c + 3 A_3 c^2 + \dots \quad (\text{Gl. 4.7})$$

mit: A_2, A_3 = zweiter bzw. dritter osmotischer Virialkoeffizient,

$R(\theta)$ = Rayleigh-Verhältnis,

K = optische Konstante, vom Polariastionszustand des Primärlichts abhängig.

Bei verdünnten Lösungen können in Gl. 4.7 die Terme, die den dritten und höhere Virialkoeffizienten enthalten, vernachlässigt werden.

Das Rayleigh-Verhältnis $R(\theta)$ und die optische Konstante K werden zur weiteren Vereinfachung eingeführt, sie sind für unpolarisiertes Primärlicht folgendermaßen definiert:

$$R(?) = \frac{I_s^{Exze\beta} r^2}{I_0 (1 + \cos^2 \theta)} = \frac{K c}{M^{-1} + 2 A_2 c + 3 A_3 c^2 + \dots} \quad (\text{Gl. 4.8})$$

$$K = \frac{2 \pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 N_L} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \quad (\text{Gl. 4.9})$$

$$I_s^{Exze\beta} = I_{s,Lösung} - I_{s,Lösemittel} \quad (\text{Gl. 4.10})$$

Bei großen Molekülen tritt in Folge der Streuung an verschiedenen intramolekularen Streuzentren eine Interferenz der Streustrahlung auf. Diese winkelabhängige Schwächung des Lichtes wird durch die von Debye abgeleitete Streufunktion $P(\theta)$ berücksichtigt. $P(\theta)$ ist definiert als der Quotient der Rayleigh-Verhältnisse bei den Beobachtungswinkeln θ und 0°

$$P(\theta) = \frac{R(\theta)}{R(0)} \quad (\text{Gl. 4.11})$$

Für $\theta = 0$ gilt:

$$\frac{1}{P(\theta)} = 1 + \frac{16 \pi^2}{3 \lambda_0^2} \langle r^2 \rangle \sin^2 \left(\frac{\theta}{2} \right) \quad (\text{Gl. 4.12})$$

mit: $\langle r^2 \rangle$ = mittleres Quadrat des Trägheitsradius.

Die allgemeine Streuformel für große Moleküle unter der Berücksichtigung der Winkelabhängigkeit wurde 1948 von Zimm hergeleitet. Sie lautet:

$$\frac{K c}{R(\theta)} = \frac{1}{P(\theta)} \left[\frac{1}{M} + 2 A_2 c + 3 A_3 c^2 + \dots \right] \quad (\text{Gl. 4.13})$$

Der mittlere quadratische Trägheitsradius und die Virialkoeffizienten lassen sich durch doppelte Extrapolation zum Winkel $\theta \rightarrow 0^\circ$ und auf die Konzentration $c \rightarrow 0$ bestimmen.

Unter diesen Bedingungen ist $P(\theta) = 1$. Die doppelte Extrapolation wird mit Hilfe eines Zimm-Diagramms durchgeführt. Dazu werden die für $Kc/R(\theta)$ gemessenen Werte gegen $\sin^2(\theta/2) + \text{const.} \cdot c$ aufgetragen. Sowohl die Extrapolation des Winkels $\theta \rightarrow 0^\circ$ als auch die Extrapolation der Konzentration $c \rightarrow 0$ liefert bei polymolekularen Proben als Ordinatenabschnitt den Kehrwert der massengemittelten Molmasse M_w . Aus der Steigung der Geraden des winkelabhängigen Teils ergibt sich bei $c \rightarrow 0$ der z-gemittelte mittlere quadratische Trägheitsradius $\sqrt{\langle r^2 \rangle}$. Aus der Geradensteigung des konzentrationsabhängigen Teils kann bei $\theta \rightarrow 0^\circ$ der zweite osmotische Virialkoeffizient A_2 bestimmt werden.

4.3.2 Bestimmung des spezifischen Brechungsindexinkrements (dn/dc)

Das spezifische Brechungsindexinkrement (dn/dc), vereinfacht auch als Brechungsinkrement bezeichnet, ist eine fundamentale Größe bei Streuexperimenten im Bereich des sichtbaren Lichts (s.o.) und gibt den Grad der Abhängigkeit des Brechungsindex n einer Lösung von der Konzentration c an^[69]. Gemäß Gl. 4.9 ist die optische Konstante K , die einen Einfluß auf die Intensität I_s des gestreuten Lichtes ausübt, proportional zum Quadrat des Brechungsinkrements. Es kann in verdünnten Lösungen (Konzentrationsbereich 0,01 – 0,02 g/ml) zufriedenstellend durch das Verhältnis $\Delta n/c$ beschrieben werden. Δn gibt hierbei die Differenz zwischen den Brechungsindices der Lösung und des reinen Lösemittels an. Das Brechungsinkrement ist von der Wellenlänge λ_0 des eingestrahnten Lichts abhängig und steigt mit kleiner werdender Wellenlänge an. Beispielsweise beträgt sein Anstieg beim Übergang von $\lambda = 546$ nm auf $\lambda = 436$ nm etwa 1 - 3%^[69]. Weiterhin ist (dn/dc) temperaturabhängig und steigt in der Regel mit der Temperatur an. So verändert ein Temperaturunterschied von 1°C das Brechungsinkrement um etwa 0,0001 - 0,0005 ml/g. Da der Messfehler herkömmlicher Geräte ca. $\pm 0,001$ ml/g beträgt ist die absolute Temperaturkonstanz während der Messung nicht so bedeutend. Wichtig ist aber exakt gleiche Temperatur der Probenlösung und des Lösemittels.

Wichtig ist auch, dass das Lösemittel zur Herstellung der Lösungen der gleichen Charge entstammt, die als Referenz-Flüssigkeit verwendet wird, um sicherzustellen, dass eventuelle Verunreinigungen, wie z.B. Wasser, die einen Einfluß auf die Messung ausüben können, in der Lösung und dem Lösemittel gleich sind.

Die Bestimmung der Brechungsinkremente erfolgte an der TU Berlin mit einem Differentialrefraktometer vom Typ Optilab[®] DSP (Fa. Wyatt Technology) bei der Wellenlänge von $\lambda_0 = 633$ nm. Von jeder dendritischen Substanz **Dendr-(RR N)₆₄**, **N = 1 - 8** wurden sechs unterschiedlich konzentrierte Lösungen im Konzentrationsbereich zwischen $0,1 \leq c / \text{mg/ml} \leq 1$ hergestellt. Als Lösemittel diente 0,1 M Na₂HPO₄-Lösung, der 0,02 Gew.-% NaN₃ als keimtötendes Agens zugesetzt wurden. Alle Messungen wurden bei 25°C durchgeführt. Die einzelnen Proben jeder Messreihe wurden unter Zuhilfenahme einer Spritzenpumpe (Fa. Bioblock Scientific, Illkirch) mit ansteigender Konzentration in das Differentialrefraktometer injiziert. Dabei stellte sich nach kurzer Zeit ein Plateau-Wert des Brechungsindexunterschiedes zu der mit Lösemittel gefüllten Referenzzelle ein.

Zur Ermittlung der Basislinie ($\Delta n = 0$) wurde zu Beginn und am Ende jeder Messreihe die Brechungsindexdifferenz des reinen Lösemittels zwischen der Mess- und Referenzzelle gemessen. Die Auftragung der Differenz der Brechungsindices gegen die Konzentration ergibt eine Gerade, deren Steigung zu dem gesuchten Brechungsinkrement der Verbindung führt.

Am Beispiel der Verbindung **Dendr-(RR 5)₆₄** ist in Bild 4.8 die Differenz der Brechungsindices Δn zwischen der Mess- und der Referenzzelle für die einzelnen Konzentrationen c gezeigt. Aus der Steigung der Regressionsgraden ist für das gesuchte Brechungsinkrement der Verbindung **Dendr-(RR 5)₆₄** ein Wert von $(dn/dc) = 0,1630 \pm 0,0048$ ml/g bestimmt worden.

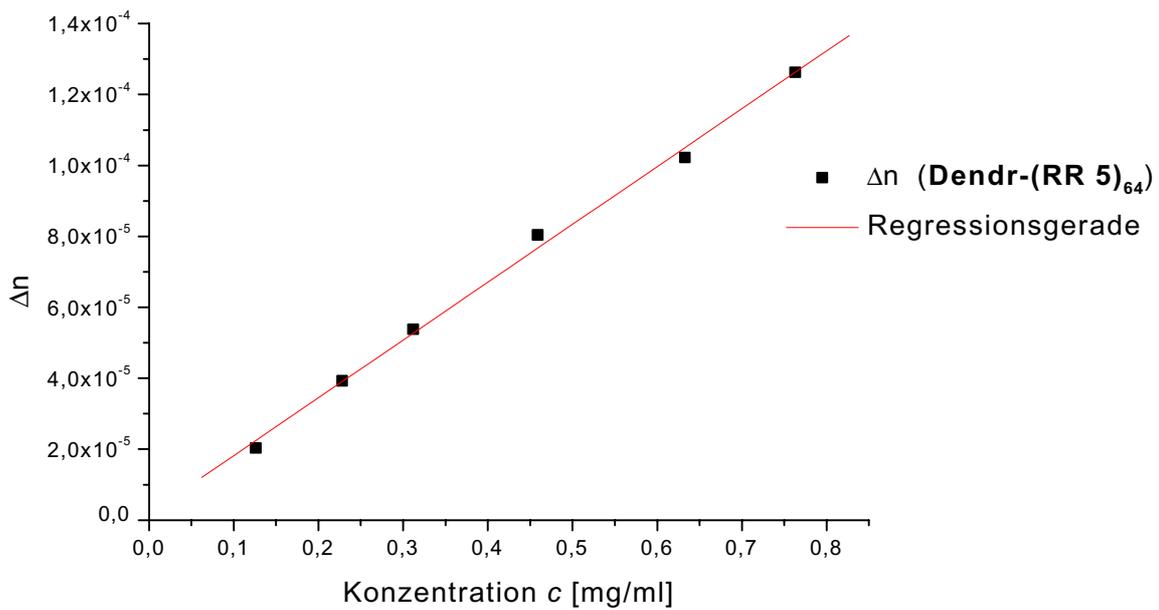


Bild 4.8: Auftragung der Differenz dn der Brechungsindices von Lösemittel und Lösung gegen die Konzentration c für die Verbindung **Dendr-(RR 5)₆₄**

In der nachfolgenden Tabelle 4.8 sind die bei 25°C nach dieser Verfahrensweise ermittelten Brechungszinkremente der dendritischen Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR N)₆₄**, $N = 1 - 8$ in 0,1 M Na_2HPO_4 -Lösung mit 0,02 Gew.-% NaN_3 -Zusatz angegeben. Im Rahmen der Fehlergrenze sind die Messwerte nahezu gleich. Sie sind bei der Auswertung der statischen Streulichtmessungen an den dendritischen Röntgenkontrastmitteln verwendet worden, desgleichen bei der GPC zur Molmassenbestimmung mit Hilfe eines MALLS-Detektors (vgl. Kapitel 4.2.2).

Dendrimer	(dn/dc) [ml/g]
Dendr-(RR 1)₆₄	0,1585 ± 0,0027
Dendr-(RR 2)₆₄	0,1416 ± 0,0086
Dendr-(RR 3)₆₄	0,1493 ± 0,0107
Dendr-(RR 4)₆₄	0,1536 ± 0,0098
Dendr-(RR 5)₆₄	0,1630 ± 0,0048
Dendr-(RR 6)₆₄	0,1594 ± 0,0022
Dendr-(RR 7)₆₄	0,1426 ± 0,0065
Dendr-(RR 8)₆₄	0,1482 ± 0,0025

Tab. 4.8: Gemessene Brechungsindexinkremente der dendritischen Röntgenkontrastmittel in 0,1 M Na₂HPO₄-Lösung + 0,02 Gew.-% NaN₃ bei 25°C

4.3.3 Statische Lichtstreuung an dendritischen Röntgenkontrastmitteln

Es wurden mindestens 5 verschieden konzentrierte Lösungen im Konzentrationsbereich zwischen $1 \leq c/\text{mg/ml} \leq 10$ hergestellt. Das Lösemittel war eine 0,1 M Na₂HPO₄-Lösung mit einem Zusatz von 0,02 Gew.-% NaN₃ als Stabilisator. Alle Messungen wurden an der TU Berlin bei 22°C und einer Wellenlänge von $\lambda_0 = 543,5$ nm mit einem Streulichtphotometer FICA 50 (Fa. G. Baur, SLS Systemtechnik, Hausen) durchgeführt. Dabei wurde jeweils im Winkelbereich zwischen $50^\circ \leq \theta \leq 145^\circ$ gemessen. Zur Beseitigung störender Staubpartikel und anderer makroskopischer Verunreinigungen wurden sämtliche Lösungen vor der Messung filtriert (Membranspritzenfilter Millex[®]-GS 0,22 μm , Fa. Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts) und anschließend 25 min bei 1263 g zentrifugiert (Megafuge 1.0, Fa. Heraeus Sepatech, Osterode). Die Auswertung erfolgte nach dem unter 4.3.1 beschriebenen grafischen Verfahren nach Zimm unter Zuhilfenahme der Auswertesoftware SLS Version 4.1 (Fa. G. Baur, SLS Systemtechnik, Hausen).

In Bild 4.9 ist das bei der statischen Lichtstreuung an fünf verschiedenen konzentrierten Lösungen des Röntgenkontrastmittels **Dendr-(RR 4)₆₄** erhaltene Zimm-Diagramm gezeigt. Für das Dendrimer **Dendr-(RR 4)₆₄** wird die Molmasse $M_w = 55600 \text{ g/mol}$ gefunden.

Der Wert des zweiten osmotischen Virialkoeffizienten A_2 ist aufgrund der Messwert-schwankungen mit einem erheblichen Fehler behaftet und beträgt ungefähr $A_2 \approx 5,89 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{ml}/\text{g}^2$.

Der experimentell bestimmte mittlere quadratische Trägheitsradius $\sqrt{\langle r^2 \rangle} = 24 \text{ nm}$ ist nur ein virtueller Wert. Wie Messungen der dynamischen Lichtstreuung (Kapitel 4.4.2) sowie viskosimetrische (Kapitel 4.5.3) und densitometrische (Kapitel 4.6.2) Untersuchungen gezeigt haben, sind die Teilchendurchmesser der dendritischen Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR N)₆₄**, $N = 1 - 8$ deutlich kleiner als $\lambda/20$ und können daher nicht mit der zur Verfügung stehenden Apparatur ermittelt werden.

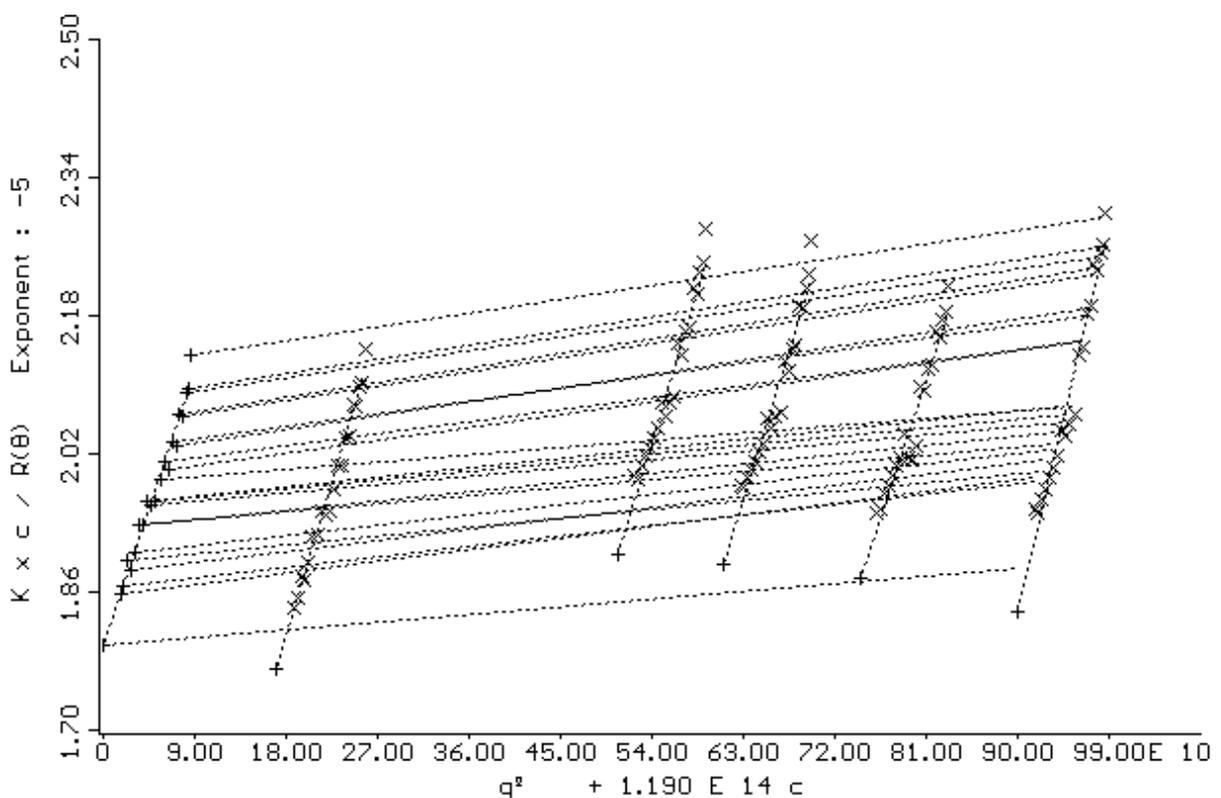
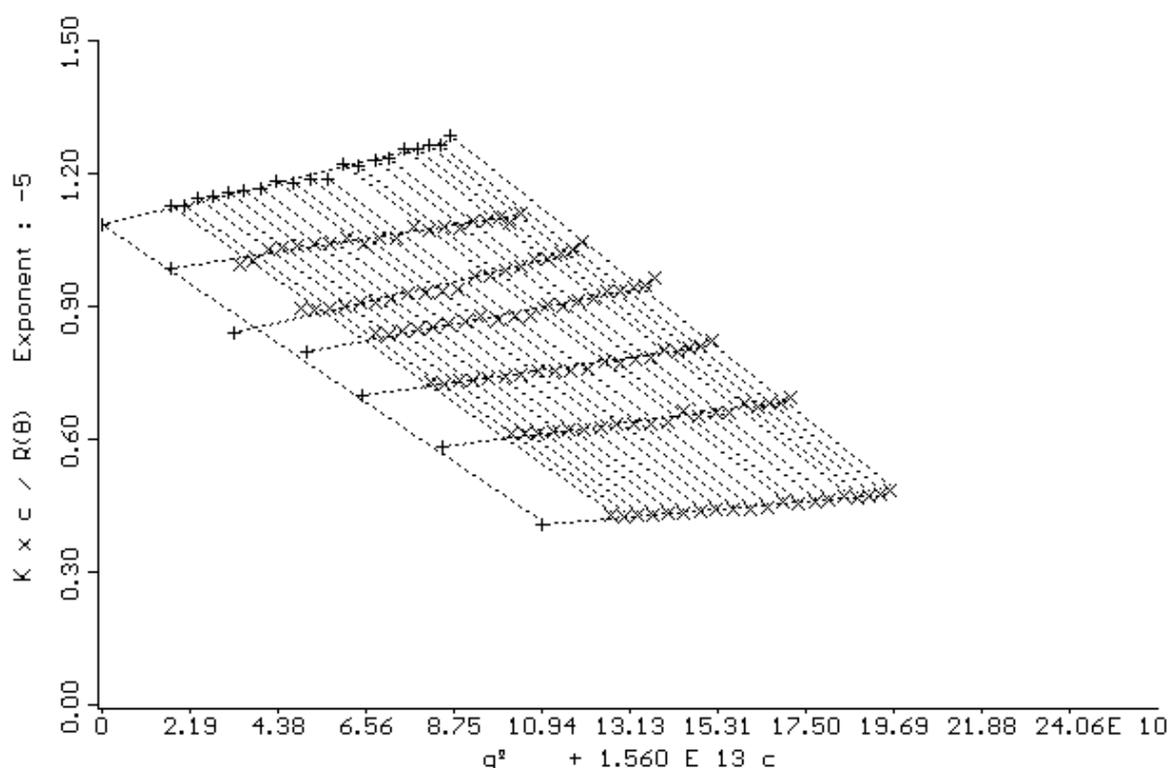


Bild 4.9: Zimm-Diagramm der Verbindung **Dendr-(RR 4)₆₄**

Das in Bild 4.10 dargestellte Zimm-Diagramm zeigt das Ergebnis der statischen Lichtstreuung an sechs unterschiedlich konzentrierten Lösungen des dendritischen Röntgenkontrastmittels **Dendr-(RR 8)₆₄**. Auffallend ist die negative Steigung der auf den Winkel $\theta \rightarrow 0^\circ$ extrapolierten Geraden, d.h. ein deutlich negativer Zahlenwert des zweiten osmotischen Virialkoeffizienten $A_2 = -4,79 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{ml}/\text{g}^2$, der auf ein thermodynamisch schlechtes Lösemittel hindeutet. Schon bei der Herstellung der Messlösungen zeichnete sich die Substanz **Dendr-(RR 8)₆₄** durch eine ausgesprochene Schwerlöslichkeit aus. Sie ging erst nach mehreren Tagen unter ständigem Schütteln in Lösung. Außerdem findet man, vermutlich aufgrund der trimodalen Verteilung der Substanz, eine deutliche Abweichung der experimentell bestimmten Molmasse vom theoretischen Wert (vgl. Kapitel 4.2.2) In dieser und auch in der Probe **Dendr-(RR 1)₆₄** sind zahlreiche höhermolekulare Anteile vorhanden, die bei der statischen Lichtstreuung überproportional gewichtet werden. Bei der GPC mit Hilfe des MALLS-Detektors sind dafür Molmassen $M > 200000 \text{ g/mol}$ bestimmt worden. Die für die Probe **Dendr-(RR 8)₆₄** experimentell ermittelte Molmasse $M_w = 92100 \text{ g/mol}$ ist somit der Mittelwert aller Komponenten innerhalb der Lösungen.

Bild 4.10: Zimm-Diagramm der Verbindung **Dendr-(RR 8)₆₄**

In Tabelle 4.9 sind sämtliche Messergebnisse der statischen Lichtstreuung zusammengestellt. Mit Ausnahme der Probe **Dendr-(RR 7)₆₄**, von der keine ausreichende Substanzmenge zur Verfügung stand, wurden alle synthetisierten dendritischen Röntgenkontrastmittel gemessen. Neben den theoretischen und den in der statischen Lichtstreuung gefunden Molmassen M_w sind die jeweiligen Werte für die zweiten osmotischen Virialkoeffizienten A_2 sowie die scheinbaren mittleren quadratischen Trägheitsradien $\sqrt{\langle r^2 \rangle}$ angeführt.

Dendrimer	Theoret. Molmasse $M_{theoret.}$ / [g/mol]	Gef. Molmasse M_w / [g/mol]	$A_2 \cdot 10^{-4}$ / [mol*ml/g ²]	$\sqrt{\langle r^2 \rangle}$ / [nm]
Dendr-(RR 1)₆₄	62278	73700	1,24	21
Dendr-(RR 2)₆₄	64074	60400	1,12	18
Dendr-(RR 3)₆₄	62278	57900	-0,18	17
Dendr-(RR 4)₆₄	64074	55600	0,59	24
Dendr-(RR 5)₆₄	61255	46600	1,92	21
Dendr-(RR 6)₆₄	63050	62300	1,31	27
Dendr-(RR 8)₆₄	58627	92100	-4,79	26

Tab.4.9: Ergebnisse der statischen Lichtstreuung an den dendritischen Röntgenkontrastmitteln **Dendr-(RR N)₆₄, N = 1-6, 8**

Die experimentell ermittelten Molmassen der beiden Verbindungen **Dendr-(RR 1)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** sind deutlich größer als die theoretischen Werte. Wie bereits zuvor am Beispiel der Verbindung **Dendr-(RR 8)₆₄** (Bild 4.10) erwähnt, dürfte die Ursache dafür in der trimodalen Molmassenverteilung der beiden Dendrimerproben mit den hohen Anteilen an höhermolekularen Verunreinigungen liegen.

Mit Ausnahme der Substanz **Dendr-(RR 5)₆₄** weichen die theoretischen und experimentell bestimmten Molmassen der übrigen Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR 2)₆₄**, **Dendr-(RR 3)₆₄**, **Dendr-(RR 4)₆₄** und **Dendr-(RR 6)₆₄** nur wenig voneinander ab. Die Differenzen sind vermutlich auf unvollständige Derivatisierungen zurückzuführen. Die genaue Ursache dieser Diskrepanzen kann nicht erklärt werden.

Die zweiten osmotischen Virialkoeffizienten A_2 der beiden Proben **Dendr-(RR 3)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** sind negativ. Für diese beiden dendritischen Röntgenkontrastmittel ist die verwendete 0,1 M Na₂HPO₄-Lösung ein thermodynamisch schlechtes Lösemittel.

Ihre Zahlenwerte unterscheiden sich jedoch um rund eine Zehnerpotenz, was sich auch bei der Herstellung der Probenlösungen zeigte. Während die Verbindung **Dendr-(RR 3)₆₄** in der 0,1 M Na₂HPO₄-Lösung relativ gut löslich war, erwies sich die Substanz **Dendr-(RR 8)₆₄** als extrem schwerlöslich. Alle anderen Dendrimerproben waren in 0,1 M Na₂HPO₄-Lösung ausgezeichnet löslich, was sich in den positiven zweiten osmotischen Virialkoeffizienten widerspiegelt.

Die experimentell gefundenen Trägheitsradien $\sqrt{\langle r^2 \rangle}$ liegen alle unterhalb bzw. im Falle der Verbindungen **Dendr-(RR 6)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** an der Grenze zum Debye-Bereich der Lichtstreuung. Bei den durch die Messapparatur vorgegebenen Versuchsbedingungen liegt die experimentelle Grenze zur Bestimmung von Trägheitsradien bei Werten von ca. $\frac{543,5 \text{ nm}}{20} \approx 27 \text{ nm}$. Die in der Tabelle 4.9 aufgeführten mittleren quadratischen Trägheitsradien sind daher als virtuelle Werte anzusehen, da sich die Molekülabbmessungen in einer deutlich kleineren Größenordnung bewegen (vgl. Kapitel 4.4.2, 4.5.3 und 4.6.2). Zur Bestimmung des mittleren quadratischen Trägheitsradius müsste bei kürzeren Wellenlängen, beispielsweise mit Röntgen- oder Neutronenstrahlung gemessen werden. Solche Geräte standen im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht zur Verfügung.

Die nachfolgende Tabelle 4.10 präsentiert für die synthetisierten dendritischen Röntgenkontrastmittel eine Zusammenstellung zum Vergleich der durch die statische Lichtstreuung mit Hilfe eines Goniometers bzw. eines MALLS-Detektors gefundenen Molmassenwerte M_w . Der besseren Übersichtlichkeit wegen sind nochmals die theoretischen Molmassen aufgenommen worden.

Dendrimer	Theoret. Molmasse $M_{theoret.}$ [g/mol]	M_w / [g/mol] SLS	M_w / [g/mol] GPC, MALLS (Peak 1)
Dendr-(RR 1)₆₄	62278	73700	54800
Dendr-(RR 2)₆₄	64074	60400	60300
Dendr-(RR 3)₆₄	62278	57900	54100
Dendr-(RR 4)₆₄	64074	55600	58900
Dendr-(RR 5)₆₄	61255	46600	48000
Dendr-(RR 6)₆₄	63050	62300	63100
Dendr-(RR 8)₆₄	58627	92100	60000

Tab. 4.10: Experimentell und theoretisch bestimmte Molmassen M_w

Die deutlichsten Abweichungen zwischen den auf verschiedenen experimentellen Wegen bestimmten Molmassen treten bei den beiden auf der Charge ng12351 basierenden, trimodal verteilten Verbindungen **Dendr-(RR 1)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** auf und dürften auf die zu einem großen Prozentsatz vorhandenen höhermolekularen Anteile zurückzuführen sein. Allerdings unterscheiden sich die beiden Proben in ihrem thermodynamischen Verhalten mit dem Lösemittel. Während **Dendr-(RR 1)₆₄** einen positiven Wert für den zweiten osmotischen Virialkoeffizienten aufweist, nimmt dieser bei **Dendr-(RR 8)₆₄** einen deutlich negativen Wert an (vgl. Tabelle 4.9). Abgesehen von diesen beiden dendritischen Verbindungen wird eine gute Übereinstimmung zwischen der mittels MALLS-Detektor und der mittels statischer Lichtstreuung mit Hilfe eines Goniometers erhaltenen Molmasse gefunden. Ebenso sind im Fall der Verbindung **Dendr-(RR 5)₆₄** die Abweichungen zwischen der theoretischen Molmasse und den beiden experimentell erhaltenen Molmassen nahezu identisch.

Die unterschiedlichen Methoden GPC und statische Lichtstreuung ergänzen sich bei der Charakterisierung dendritischer Röntgenkontrastmittel gegenseitig und ermöglichen einen ersten Vergleich der M_w -Werte.

4.4 Dynamische Lichtstreuung

4.4.1 Theoretische Grundlagen

Die Entwicklung der Laser-Technologie ermöglichte erstmals die *Brownsche* Molekularbewegung von Makromolekülen mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung zu studieren^[70]. Die dynamische Lichtstreuung wird häufig auch als quasielastische Lichtstreuung, inelastische Lichtstreuung oder Photonen-Korrelations-Spektroskopie bezeichnet^[71]. Der bekannte Doppler-Effekt bildet die Grundlage dieser Methode. Je nach der relativen Bewegung einer Strahlungsquelle in Richtung oder entgegen eines Detektors, wird die Frequenz zu höheren oder niedrigeren Frequenzen verschoben. Diese Frequenzverschiebung, auch als *Doppler-Shift* bezeichnet, ist proportional zum Verhältnis zwischen der Geschwindigkeit der Quelle v und der Ausbreitungsgeschwindigkeit c der Welle.

In einem Gas oder in einer Lösung bewegen sich die Moleküle mit den unterschiedlichsten Geschwindigkeiten in alle Raumrichtungen. Man findet daher eine Geschwindigkeitsverteilung^[70]. Die Moleküle als Ganzes, oder auch nur einzelne Molekülgruppen, können während der Bewegung rotieren. Außerdem können Molekül- und Atomgruppen Schwingungen ausführen, so dass insgesamt ein breites Spektrum unterschiedlich verschobener Frequenzen in Bezug auf die eingestrahlte Frequenz vorliegt^[71]. Prinzipiell könnte die Molekülbewegung mit Hilfe eines Interferometers studiert werden. Im Vergleich zur Lichtgeschwindigkeit bewegen sich die Moleküle jedoch mit einer sehr kleinen Geschwindigkeit, so dass der interferometrischen Bestimmung des optischen Spektrums Grenzen gesetzt sind. Eine Lösung dieses Problems bietet das *Wiener-Khintchine-Theorem*, das einen Zusammenhang zwischen dem optischen Spektrum $S(\omega)$ und einer zeitabhängigen Funktion $C(t)$ herstellt.

$$S(\omega) = \frac{1}{2p} \int_{-\infty}^{+\infty} C(t) e^{i(\omega t)} dt \quad (\text{Gl. 4.14})$$

$$C(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} S(\omega) e^{i(\omega t)} d\omega \quad (\text{Gl. 4.15})$$

Die Funktionen $S(\omega)$ und $C(t)$ sind miteinander über eine Fourier Transformation verbunden. Der Doppler-Effekt verursacht eine Verbreiterung Γ der Spektrallinien der Funktionen $S(\omega)$, die proportional zum Translations-Diffusionskoeffizienten D ist (Bild 4.11).

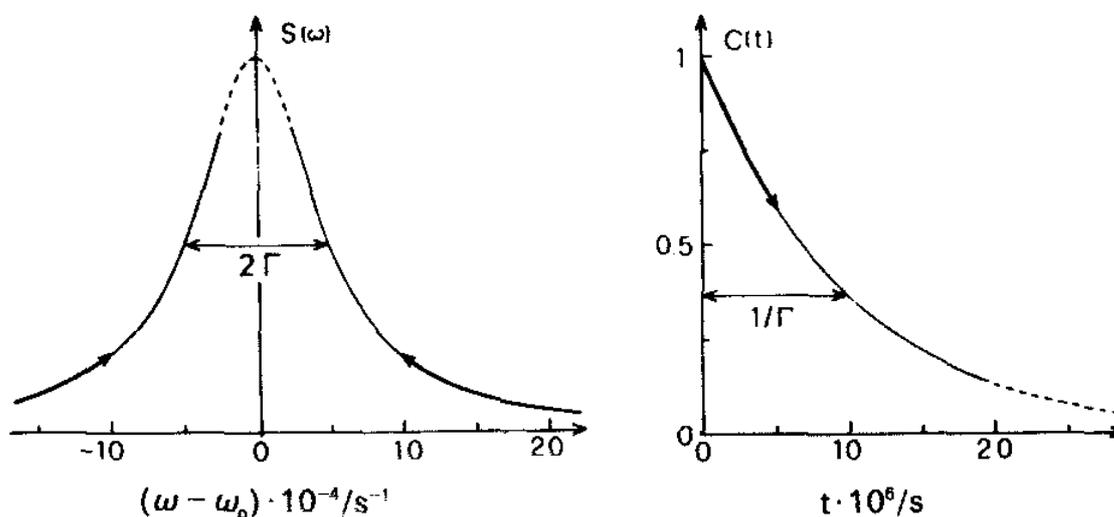


Bild 4.11: Gestalt einer Spektrallinie $S(\omega)$, die durch den Doppler-Effekt verbreitert ist, und die dazugehörige Autokorrelationsfunktion $C(t)$ ^[70]

Im Gegensatz zur statischen Lichtstreuung wird bei der dynamischen Lichtstreuung bei einem kleinen Streuvolumen und kurzen Detektionszeiten gemessen ($< 1 \mu\text{s}$). Bei diesen Bedingungen findet man starke Schwankungen der Streuintensität. Diese Schwankungen enthalten Informationen über die Beweglichkeit der Makromoleküle und bewegen sich um die bei der statischen Lichtstreuung gemessene Streuintensität^[70, 72]. Aus den Schwankungen kann eine exponentiell abfallende Funktion berechnet werden, die auch als Autokorrelationsfunktion bezeichnet wird. Der Kurvenverlauf erklärt sich aus der Tatsache, dass die meisten Moleküle bei einem kleinen Zeitintervall keinerlei Kollisionen mit anderen Molekülen erfahren. Daher wird die ursprüngliche Bewegungsrichtung und die Geschwindigkeit der Moleküle sehr gut beschrieben. Je größer aber das Zeitintervall wird, desto mehr Kollisionen erleiden die Moleküle, so dass sie nun kaum noch ein Erinnerungsvermögen an ihre ursprünglichen Bewegungen haben.

Für monodisperse kugelförmige Teilchen, die klein sind im Vergleich zur eingestrahlten Wellenlänge, kann die Autokorrelationsfunktion näherungsweise durch eine einfache Exponentialfunktion $g_1(t)$ beschrieben werden.

$$g_1(t) = e^{-\Gamma t} \quad (\text{Gl. 4.16})$$

$$= e^{-D q^2 t} \quad (\text{Gl. 4.17})$$

mit: $q = \left(\frac{4\pi}{\lambda_0} \right) \sin \frac{\theta}{2},$

Γ = Linienverbreiterung,

D = Diffusionskoeffizient.

Bei kugelförmigen Teilchen liegt außerdem nur Translations-Diffusion vor, so dass der Diffusionskoeffizient anhand der obigen Beziehung bestimmt werden kann. Er ist bei kugelförmigen Teilchen seinerseits über die *Stokes-Einstein-Beziehung* mit dem hydrodynamischen Radius r_h verknüpft^[71]:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi \eta_0 r_h} \quad (\text{Gl 4.18})$$

mit: k_B = Boltzmann-Konstante,

T = Temperatur,

η_0 = Viskosität des Lösemittels,

r_h = hydrodynamischer Radius.

4.4.2 Dynamische Lichtstreuung an dendritischen Röntgenkontrastmitteln

In der Abteilung „Allgemeine Physikochemie“ der Schering AG wurden die Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR 1)₆₄**, **Dendr-(RR 5)₆₄**, **Dendr-(RR 6)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung untersucht. Als Strahlungsquelle kam ein Laser vom Typ „Lexel 85“ mit einer Wellenlänge $\lambda_0 = 514$ nm der Fa. Malvern Instruments, Herrenberg, zum Einsatz. Daneben besteht die Anlage aus dem Stepper Motor Controller PCS 7 sowie einem Temperatur Controller und Photomultiplier PCS 8 (alle Fa. Malvern Instruments, Herrenberg). Für die Auswertung der Messdaten wurde die Software PCS Sizemode V 1.41 (Fa. Malvern Instruments, Herrenberg) eingesetzt.

Von den oben genannten Kontrastmitteln wurde jeweils eine Probelösung der Konzentration $c = 10$ mg/ml hergestellt und vor der Lichtstreuung 30 min bei einer Beschleunigung von 60000 g zentrifugiert (Zentrifuge vom Typ Sorvall Evolution, Fa. Kendro, Hanau). Alle Messungen wurden bei 25°C in Wasser durchgeführt. Die Detektion der Photonen erfolgte ausschließlich beim Beobachtungswinkel $\theta = 90^\circ$.

Tabelle 4.11 enthält die durch dynamische Lichtstreuung gewonnenen Diffusionskoeffizienten D und die aus der *Stokes-Einstein*-Beziehung zugänglichen hydrodynamischen Radien r_h . Dabei ist eine kugelförmige Gestalt der dendritischen Röntgenkontrastmittel zugrunde gelegt worden. Die oben genannte Auswertesoftware liefert direkt die hydrodynamischen Radien r_h , so dass die Diffusionskoeffizienten D zurückgerechnet werden mussten.

Dendrimer	Diffusionskoeffizient $D \cdot 10^{-7} / [\text{cm}^2/\text{s}]$	Hydrodyn.Radius $r_h / [\text{nm}]$
Dendr-(RR 1)₆₄	6,54	3,75
Dendr-(RR 5)₆₄	8,05	3,05
Dendr-(RR 6)₆₄	7,11	3,45
Dendr-(RR 8)₆₄	6,82	3,60

Tab. 4.11: Dynamischen Lichtstreuung einiger dendritischer Röntgenkontrastmittel in Wasser bei 25°C

Die berechneten Diffusionskoeffizienten D aller vier untersuchten Verbindungen unterscheiden sich nur minimal. Die hydrodynamischen Radien r_h der Proben bewegen sich zwischen 3,05 und 3,75 nm. Obwohl diese Werte in reinem Wasser gemessen worden sind, lassen sie sich qualitativ mit den durch statische Lichtstreuung gemessenen Werten vergleichen. In Tabelle 4.12 sind die Daten der vier Proben einander gegenübergestellt.

Dendrimer	Hydrodyn. Radius $r_h / [\text{nm}]^*$	Trägheitsradius $\sqrt{\langle r^2 \rangle} / [\text{nm}]^{**}$ (SLS)	Ber. Trägheitsradius $\sqrt{\langle r^2 \rangle}_{ber.} / [\text{nm}]^*$
Dendr-(RR 1)₆₄	3,75	21	2,90
Dendr-(RR 5)₆₄	3,05	21	2,36
Dendr-(RR 6)₆₄	3,45	27	2,67
Dendr-(RR 8)₆₄	3,60	26	2,78

* in Wasser

** in 0,1 M Na₂HPO₄-Lösung mit 0,02 Gew-% NaN₃

Tab. 4.12: Vergleich der hydrodynamischen Radien mit den mittleren quadratischen Trägheitsradien

Die unter den Bedingungen der dynamischen Lichtstreuung gefundenen hydrodynamischen Radien sind rund 6 - 8 mal kleiner als die durch statische Lichtstreuung ermittelten Trägheitsradien. Für kompakte, kugelförmige Teilchen existiert theoretisch ein Zusammenhang zwischen dem hydrodynamischen Radius und dem Trägheitsradius^[73]:

$$r_h \cong \sqrt{(5/3)\langle r^2 \rangle} \quad (\text{Gl. 4.19})$$

Mit dieser Beziehung lassen sich die „theoretischen“ Trägheitsradien der vier genannten dendritischen Röntgenkontrastmittel aus den gemessenen hydrodynamischen Radien berechnen. Diese Werte sind in der vierten Spalte der Tabelle 4.12 aufgeführt. Auch wenn der Vergleich nicht ganz korrekt ist (die dynamische Lichtstreuung wurde in reinem Wasser und nicht in einer 0,1 M Na₂HPO₄-Lösung durchgeführt), so zeigen die Daten dennoch eindrucksvoll, dass die durch statische Lichtstreuung gewonnene Trägheitsradien viel zu groß,

und offensichtlich nicht korrekt, sind. Die berechneten Trägheitsradien bewegen sich zwischen ca. 2,4 nm und 2,9 nm, und sind rund 7 - 10 mal kleiner als die bei der statischen Lichtstreuung erhaltenen Werte.

4.5 Viskosimetrie

4.5.1 Theoretische Grundlagen

Unter der Viskosität oder Zähigkeit versteht man den inneren Widerstand, den ein System aus gegeneinander beweglichen Teilchen einer Deformation entgegensetzt^[74]. Die Definition der Viskosität basiert auf der laminaren Strömung einer Flüssigkeit zwischen zwei im Abstand x voneinander parallel stehenden Platten, von denen eine feststehend, die zweite beweglich ist. Durch deren Bewegung in x -Richtung mit der Geschwindigkeit u wird in der dazwischen liegenden Flüssigkeitssäule eine laminare Strömung mit dem Geschwindigkeitsgefälle (du/dx) aufgebaut. Die Richtung der Scherkraft K_s , die an der Platte angreift, ist der der Reibungskraft K_r entgegengesetzt. Für dieses Strömungsmodell gilt das *Newtonsche-Reibungsgesetz*:

$$K_s = \eta A \frac{du}{dx} \quad (\text{Gl. 4.20})$$

Die Schubspannung τ ist als Quotient aus der Scherkraft K_s und Fläche A definiert. Durch die Einführung von $(du/dx) \equiv \dot{\gamma}$, wird folgende wichtige Beziehung erhalten:

$$\frac{K_s}{A} \equiv \tau = \eta \frac{du}{dx} \equiv \eta \dot{\gamma} \quad (\text{Gl. 4.21})$$

Das Geschwindigkeitsgefälle $\dot{\gamma}$, das auch als die Scherrate bezeichnet wird, ist der Schubspannung τ proportional. Diese Gesetzmäßigkeit gilt für *Newtonsche* Flüssigkeiten und die „dynamische“ Viskosität η ist ein Proportionalitätsfaktor (Bild 4.12).

Dagegen ist bei *Nicht-Newtonschen*-Flüssigkeiten die Viskosität η eine Funktion des Geschwindigkeitsgefälles $\dot{\gamma}$ ($\eta = f(\dot{\gamma})$). Je nach dem Grad der Abhängigkeit spricht man von einem strukturviskosen oder dilatanten Fließverhalten (Bild 4.12). Lösungen von Makromolekülen und kolloide Dispersionen verhalten sich nur in großer Verdünnung gemäß dem *Newtonschen* Reibungsgesetz Gl. 4.20^[74].

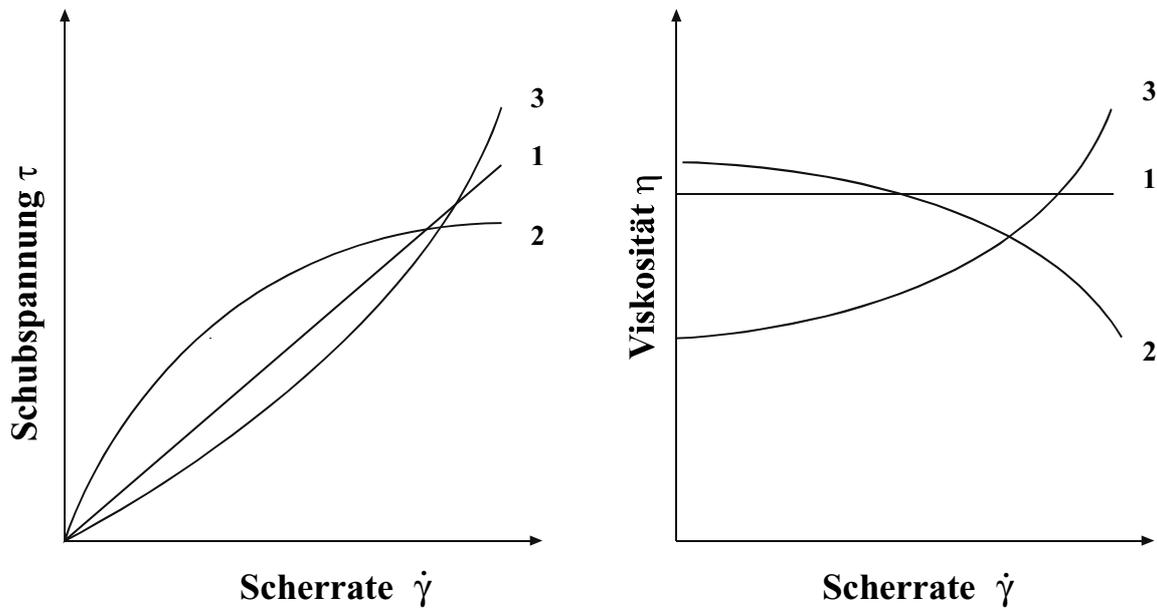


Bild 4.12: Vergleich des Fließverhaltens einer *Newtonschen* Flüssigkeit (1) mit dem einer strukturviskosen (2) und einer dilatanten Flüssigkeit (3)^[74]

Zur Messung der Viskosität stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, von denen in dieser Arbeit die Rotations- und die Kapillarviskosimetrie verwendet wurden.

Ein Couette-Rotationsviskosimeter besteht aus einem Messkopf, der verschiedene Geometrien wie beispielsweise Zylinder-, Kegel- oder Platte besitzen kann^[74]. Die zu untersuchende Flüssigkeit wird in einen äußeren Zylinder gegeben, in den der Messkopf ragt, so dass sich die zu untersuchende Flüssigkeit im Spalt zwischen den beiden Zylindern befindet. Die Flüssigkeit überträgt das Drehmoment des äußeren auf den inneren Zylinder. Aus dem gemessenen Drehmoment kann die Schubspannung τ berechnet werden. Die Scherrate $\dot{\gamma}$ wird durch die Umdrehungszahl des äußeren Zylinders vorgegeben und ist innerhalb eines durch das Messsystem vorgegebenen Bereichs frei wählbar. Mit Hilfe eines Rotationsviskosimeters kann somit die Abhängigkeit der Viskosität von der Scherrate, und damit die Gültigkeit des *Newtonschen-Reibungsgesetzes* (Gl. 4.20), überprüft werden^[74].

Die Viskosität η einer verdünnten Polymerlösung ($\rho \cong \rho_0$) kann auch aus deren Auslaufzeit aus einer Glaskapillare bestimmt werden. Die zu vermessende Flüssigkeit wird durch eine Kapillare von einem tiefergelegenen Reservoir in ein höhergelegenes Reservoir gesaugt. Erreicht der Meniskus die obere Lichtschranke, so wird die Saugkraft abgeschaltet und die Lösung fließt unter dem Einfluß der Gravitation in das untere Reservoir zurück.

Die laminare Strömung in der Glaskapillare wird durch das *Hagen-Poiseuille*-Gesetz beschrieben^[62]:

$$\eta = \frac{\pi r^4 \Delta p t}{8 l V} \quad (\text{Gl. 4.22})$$

mit: r = Radius der Kapillare,
 Δp = Druckdifferenz zwischen Kapillarein- und austritt,
 t = Auslaufzeit,
 l = Länge der Kapillare,
 V = Flüssigkeitsvolumen.

Nach Hagenbach und Couette muß die obige Gleichung noch durch ein Korrekturglied ergänzt werden, da sich der hydrostatische Druck der Flüssigkeit durch die Beschleunigung beim Eintritt in die Kapillare verringert. Außerdem erzeugt eine höhere Beschleunigung eine stärkere Reibung. Unter Berücksichtigung dieser Korrekturen ergibt sich:

$$\eta = \frac{\pi r^4 \Delta p t}{8 l V} - \frac{m \rho V}{8 \pi t (l + nr)} \quad (\text{Gl. 4.23})$$

mit: m = Hagenbachfaktor (Zahlenwert $\cong 1,1$),
 ρ = Dichte der Flüssigkeit,
 nr = fiktive Länge zur Korrektur der Druckerniedrigung durch eine erhöhte Reibung.

Durch die Wahl einer genügend engen Kapillare kann bei einer relativ langen Laufzeit der Flüssigkeit durch die Kapillare (ca. 100 s) die Hagenbach-Couette-Korrektur vernachlässigt werden.

Die Druckdifferenz Δp in der obigen Formel läßt sich wie folgt ausdrücken:

$$\Delta p = \Delta h g \rho \quad (\text{Gl. 4.24})$$

mit: Δh = Niveaudifferenz,
 g = Erdbeschleunigung.

Letztlich erhält man:

$$\eta = \frac{\pi r^4 \Delta h g}{8 l V} \rho t \quad (\text{Gl. 4.25})$$

$$= K^* \rho t \quad (\text{Gl. 4.26})$$

Die Viskositätsmessung reduziert sich daher bei Vorgabe der Kapillarkonstanten K^* auf die Bestimmung der Dichte ρ und Messung der Auslaufzeit t eines Flüssigkeitsvolumens V . Mit Hilfe eines Kapillarviskosimeters kann die relative Viskosität η_{rel} von kolloiden und makromolekularen Lösungen einfach ermittelt werden. Man versteht darunter den Quotienten aus der Viskosität η einer Lösung und der Viskosität η_0 des Lösemittels.

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} \quad (\text{Gl. 4.27})$$

$$= \frac{\rho t}{\rho_0 t_0} \quad (\text{Gl. 4.28})$$

Bei verdünnten Lösungen, für die $\rho \cong \rho_0$ gesetzt werden kann, ergibt sich die relative Viskosität durch Messung der Auslaufzeit t der Lösung und t_0 des Lösemittels:

$$\eta_{rel} \cong \frac{t}{t_0} \quad (\text{Gl. 4.29})$$

Weitere wichtige Definition umfassen die spezifische und die reduzierte Viskosität. Die spezifische Viskosität ist wie folgt definiert:

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} \quad (\text{Gl. 4.30})$$

$$= \frac{\eta}{\eta_0} - 1 \quad (\text{Gl. 4.31})$$

$$= \eta_{rel} - 1 \quad (\text{Gl. 4.32})$$

Die reduzierte Viskosität ist als Quotient der spezifischen Viskosität η_{sp} der Lösung und der Konzentration c definiert:

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (\text{Gl. 4.33})$$

$$= \frac{\eta_{rel} - 1}{c} \quad (\text{Gl. 4.34})$$

Die Grenzviskositätszahl $[\eta]$, häufig auch einfach als Viskositätszahl, intrinsische Viskosität oder als Staudinger-Index bezeichnet, wird durch Extrapolation der reduzierten Viskosität auf die Konzentration $c \rightarrow 0$ und die Scherrate $\dot{\gamma} \rightarrow 0$ erhalten.

$$[\eta] = \lim_{\substack{c \rightarrow 0 \\ \dot{\gamma} \rightarrow 0}} \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (\text{Gl. 4.35})$$

Die Extrapolation auf $\dot{\gamma} \rightarrow 0$ ist im Falle des Vorliegens von *Nicht-Newton*schen Flüssigkeiten notwendig. Die Viskositätszahl $[\eta]$ ist nach ihrer Dimension [ml/g] keine Viskosität sondern vielmehr ein spezifisches Volumen. Sie mißt direkt die hydrodynamischen Dimensionen von Makromolekülen aber nur indirekt deren Molmasse über bekannte Beziehungen zwischen dem hydrodynamischen Volumen von Makromolekülen mit identischer Gestalt und Segmentverteilung.

Die Viskositätszahl läßt sich durch unterschiedliche empirische Reihenentwicklungen grafisch bestimmen. Bei der am häufigsten verwendeten Huggins-Auftragung wird folgende Formel zu Grunde gelegt:

$$\eta_{red} = [\eta] + [\eta]^2 k_H c + \dots \quad (\text{Gl. 4.36})$$

mit: k_H = Huggins-Konstante.

Trägt man die reduzierte Viskosität η_{red} gegen die Konzentration c auf ergibt sich eine Gerade mit der Steigung $k_H[\eta]^2$. Deren Ordinatenabschnitt führt zur gesuchten Viskositätszahl $[\eta]$.

Eine weitere, ebenfalls häufig benutzte Auswertemethode basiert auf der Reihenentwicklung nach Schulz und Blaschke:

$$\eta_{red} = [\eta] + [\eta] k_{SB} \eta_{sp} + \dots \quad (\text{Gl. 4.37})$$

mit: k_{SB} = Schulz-Blaschke-Konstante.

Bei dieser Extrapolation wird die reduzierte Viskosität η_{red} gegen die spezifische Viskosität η_{sp} aufgetragen. Der Ordinatenabschnitt liefert wiederum die Viskositätszahl $[\eta]$ und aus der Steigung der Geraden kann die Konstante k_{SB} ermittelt werden. Die Wahl eines der Extrapolationsverfahren erfolgt so, dass die Messdaten der reduzierten Viskosität η_{red} möglichst gut durch eine Regressionsgerade wiedergegeben werden.

Dendrimermoleküle verhalten sich in Lösung wie solvatisierte Kugeln mit großer Formstabilität^[34] (vgl. Kapitel 3.2.2.1.1). Daher kann bei Dendrimermolekülen das *Einsteinsche* Viskositätsgesetz zur Berechnung der hydrodynamischen Radien angewendet werden:

$$[\eta] = 2,5 \frac{V_\eta}{M} \quad (\text{Gl. 4.38})$$

mit: V_η = Molvolumen der gelösten Dendrimermoleküle.

Bei bekannter Viskositätszahl $[\eta]$ und Molmasse eines Makromoleküls lässt sich daraus der hydrodynamische Radius r_η der kugelförmigen Moleküle wie folgt berechnen:

$$[\eta] = 2,5 \frac{4}{3} \pi r_\eta^3 \frac{N_L}{M} \quad (\text{Gl. 4.39})$$

$$[\eta] = \left(\frac{10\pi}{3} \right) \left(\frac{N_L r_\eta^3}{M} \right) \quad (\text{Gl. 4.40})$$

$$r_\eta = \sqrt[3]{\left(\frac{3}{10\pi} \right) \left(\frac{M [\eta]}{N_L} \right)} \quad (\text{Gl. 4.41})$$

4.5.2 Rotationsviskosimetrische Untersuchungen dendritischer Röntgenkontrastmittel

Die dendritischen Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR 3)₆₄**, **Dendr-(RR 5)₆₄**, **Dendr-(RR 6)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** wurden an der TU Berlin rotationsviskosimetrisch untersucht. Hierzu wurden von jeder dieser Substanzen mindestens sechs verschieden konzentrierte Lösungen hergestellt. Als Lösemittel wurde die bereits erwähnte 0,1 M Na₂HPO₄-Lösung mit Natriumazid-Zusatz verwendet. Die Konzentrationen der Probelösungen lagen jeweils im Bereich zwischen $3 \leq c / \text{mg/ml} \leq 11$. Als Messgerät wurde ein Rotationsviskosimeter des Typs Rotovisko mit der Messeinrichtung ZB30 der Fa. Haake, Karlsruhe benutzt. Die Messungen wurden bei 25°C und verschiedenen, kontinuierlich ansteigenden Scherraten im Bereich von $0 < \dot{\gamma} / \text{s}^{-1} < 1000$ durchgeführt. Die am besten reproduzierbaren Werte ergaben sich bei kontinuierlicher Steigerung der Scherrate von Null auf 700 s^{-1} innerhalb einer Zeitspanne von 30 min. Anschließend wurde noch 10 min bei dieser Scherrate gemessen. Die Viskosität kann gemäß Gl. 4.21 aus der Auftragung der Schubspannung τ gegen die Scherrate $\dot{\gamma}$ bestimmt werden. Eine solche Auftragung ist in Bild 4.13 für sieben unterschiedlich konzentrierte Lösungen der Probe **Dendr-(RR 6)₆₄** sowie für das Lösemittel zu sehen.

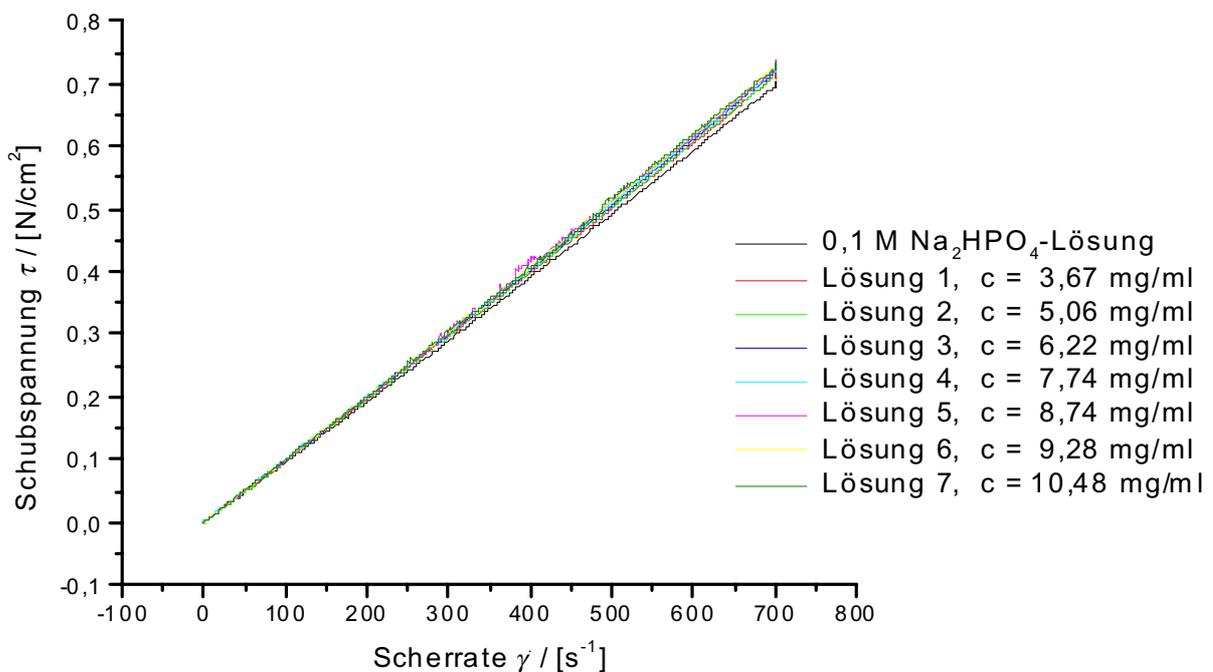


Bild 4.13: Rotationsviskosimetrische Untersuchung der Probe **Dendr-(RR-6)₆₄**, 25°C

Der besseren Übersichtlichkeit wegen ist in Bild 4.14 ein vergrößerter Ausschnitt des Bilds 4.13 gezeigt. Mit steigender Konzentration nimmt auch die Steigung der Messkurven, d.h. die Viskosität der Lösungen leicht zu. Die unterste Messkurve repräsentiert das reine Lösemittel. Bei Vernachlässigung der minimalen Messwertschwankungen findet man bei allen Lösungen im untersuchten Konzentrationsbereich einen nahezu linearen Verlauf.

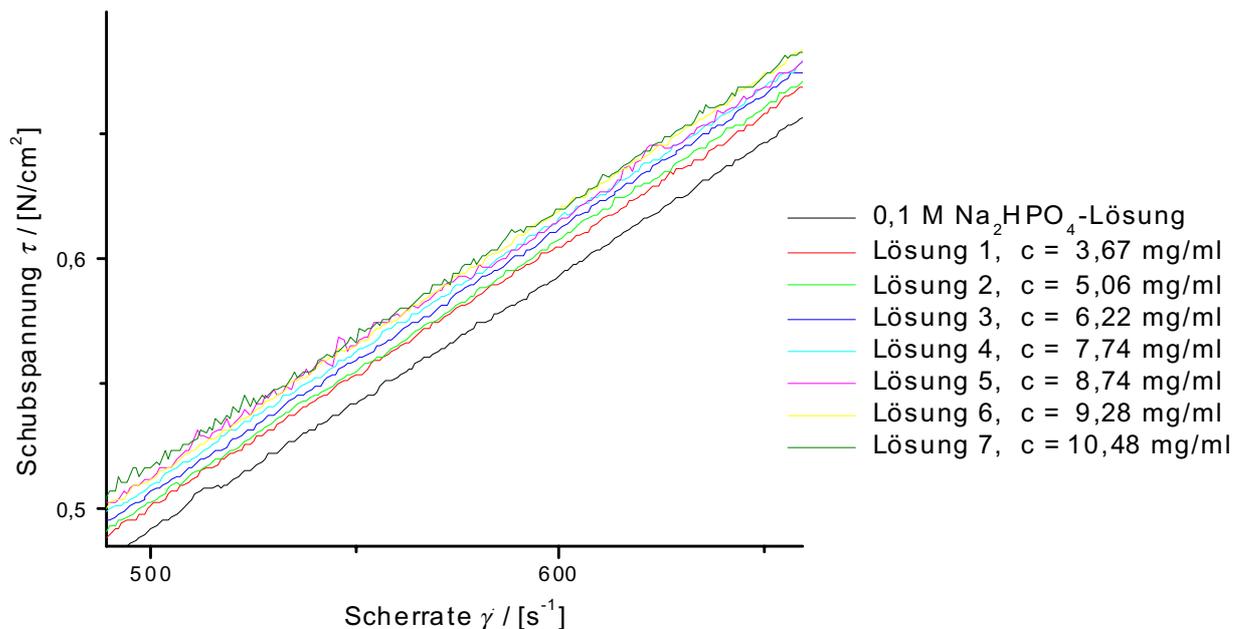


Bild 4.14: Abhängigkeit der Schubspannung τ von der Scherrate $\dot{\gamma}$ bei der Probe **Dendr-(RR 6)₆₄**, (vergrößerter Ausschnitt), 25°C

Die Schubspannung ist proportional der angelegten Scherrate d.h. das *Newtonsche* Reibungsgesetz besitzt Gültigkeit. Daher muß eine Auftragung der gemessenen Viskositäten η gegen die Schubspannung τ , wie in Bild 4.15 durchgeführt, bei Gültigkeit des *Newtonschen* Reibungsgesetzes eine zur Abszisse parallele Gerade ergeben.

Stets ist ein Ansteigen der Viskosität bei Erhöhung der Konzentration der Lösungen gefunden worden. Die gelegentlichen Überschneidungen der Messkurven sind auf die geringen Viskositätsänderungen innerhalb einer Konzentrationsreihe der Lösungen zurückzuführen.

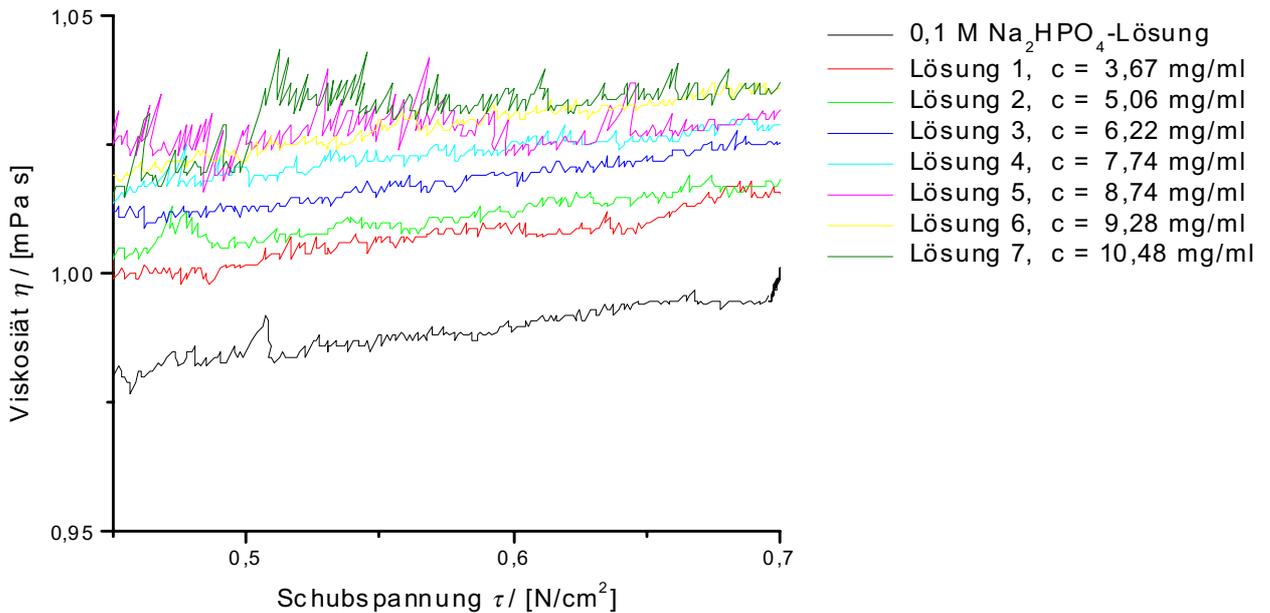


Bild 4.15: Viskositätsverlauf in Abhängigkeit von der Schubspannung τ für verschiedene Konzentrationen c der Probe **Dendr-(RR 6)₆₄**, 25°C

Im gewählten Konzentrationsbereich zeigen alle vier untersuchten Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR 3)₆₄**, **Dendr-(RR 5)₆₄**, **Dendr-(RR 6)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** *Newtonsches* Fließverhalten d.h. die Viskosität η der Lösungen ist unabhängig von der angelegten Schubspannung τ .

Aufgrund der minimalen Messwertschwankungen ist die Viskosität jeder einzelnen Lösung aus der Steigung der Regressionsgeraden gemäß Bild 4.13 bzw. 4.14 berechnet worden. Für die sieben unterschiedlich konzentrierten Lösungen der Probe **Dendr-(RR 6)₆₄** sind die so ermittelten Werte in Tabelle 4.13 wiedergegeben.

Lösung Nr.	Konzentration c / [mg/ml]	Viskosität η / [mPa s]
1	3,67	1,03
2	5,06	1,03
3	6,22	1,03
4	7,74	1,04
5	8,74	1,05
6	9,28	1,05
7	10,48	1,04
0,1 M Na ₂ HPO ₄ + 0,02 Gew-% NaN ₃	-	1,01

Tab. 4.13: Rotationsviskosimetrische Untersuchung von **Dendr-(RR 6)₆₄**

Die gemessene Viskositätsdifferenz zwischen der Lösung 1 und dem reinem Lösemittel ist minimal, und macht sich erst in der zweiten Nachkommastelle bemerkbar. Ebenso verhält es sich zwischen den nächst höher konzentrierten Lösungen der Konzentrationsreihe. Selbst zwischen der Lösung 7 und dem Lösemittel bzw. zwischen der Lösung 7 und der Lösung 1 findet man nur geringfügige Viskositätsdifferenzen.

Dieser Befund wird auch bei den anderen, hier nicht explizit gezeigten Dendrimern **Dendr-(RR 3)₆₄**, **Dendr-(RR 5)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄**, erhalten. Zur Bestimmung der Viskositätszahl $[\eta]$ dendritischer Röntgenkontrastmittel sind die rotationsviskosimetrischen Untersuchungen zu ungenau. Eine Auswertung nach Huggins bzw. Schulz und Blaschke konnte daher nicht vorgenommen werden.

Generell erlaubt die Kapillarviskosimetrie durch die gezielte Auswahl einer genügend engen Kapillare eine genauere Bestimmung der Viskosität. Bei dieser Methode haben selbst noch die geringsten Unterschiede in der Viskosität einen großen Einfluß auf die Auslaufzeit der Lösungen aus der Kapillare. Aus diesem Grund erfolgte die Bestimmung der Viskositätszahl $[\eta]$ der dendritischen Röntgenkontrastmittel ausschließlich mit Hilfe dieser Methode.

4.5.3 Kapillarviskosimetrische Untersuchungen dendritischer Röntgenkontrastmittel

Analog zu den rotationsviskosimetrischen Untersuchungen wurden von jedem dendritischen Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR N)₆₄**, **N = 1 - 8** unterschiedlich konzentrierte Lösungen im Konzentrationsbereich zwischen $1,5 \leq c / \text{mg/ml} \leq 11,0$ hergestellt. Als Lösemittel wurde eine 0,1 M Na_2HPO_4 -Lösung mit NaN_3 -Zusatz gewählt. Die Messungen wurden bei 25°C mit Hilfe eines Mikro-Ubbelohde-Kapillarviskosimeters der Fa. Schott, Mainz (Typ I, $K^* = 0,009756 \text{ mm}^2/\text{s}^2$) bei der *Schering AG* durchgeführt. Die Messeinheit bestand aus einem Durchsicht-Thermostat/Wasserbad CT 1450 und einem Kühlgerät CK 100 (beide von der Fa. Schott, Mainz). Als externer Druckregler und zur Bestimmung der Auslaufzeit wurde das Gerät Viscoboy 2 benutzt, als Steuereinheit und Schreiber diente das Gerät KM2 (beide von der Fa. Lauda, Lauda-Königshofen).

Die Auslaufzeit jeder Lösung aus der Kapillare wurde mindestens siebenmal gemessen und anschließend das arithmetische Mittel gebildet. Durch Multiplikation der gemittelten Auslaufzeit mit der Kapillarkonstante K^* wird das Viskositäts/Dichte-Verhältnis, die sogenannte kinematische Viskosität der Lösung erhalten. Multipliziert man diese mit der Dichte der jeweiligen Lösung, ergibt sich die dynamische Viskosität (Gl. 4.26). Die Dichten der Lösungen wurden mit einem DMA 55 Densitometer der Fa. Paar, Graz (*Schering AG*) bestimmt (vgl. Kapitel 4.6.2).

Aus der dynamischen Viskosität läßt sich die reduzierte bzw. spezifische Viskosität bestimmen. Die Viskositätszahl $[\eta]$ wurde mit Hilfe des Auswerteverfahrens nach Schulz-Blaschke, aus der Auftragung der reduzierten η_{red} gegen die spezifische Viskosität η_{sp} , ermittelt. Diese empirische Auswertemethode gibt die einzelnen Messpunkte η_{red} am besten durch eine Regressionsgerade wieder.

Das Ergebnis der kapillarviskosimetrischen Untersuchung der Verbindung **Dendr-(RR 6)₆₄** ist in Bild 4.16 gezeigt. Der Schnittpunkt, der durch die Messwerte der reduzierten Viskosität η_{red} gelegten Regressionsgeraden mit der Ordinate liefert die gesuchte Viskositätszahl $[\eta]$.

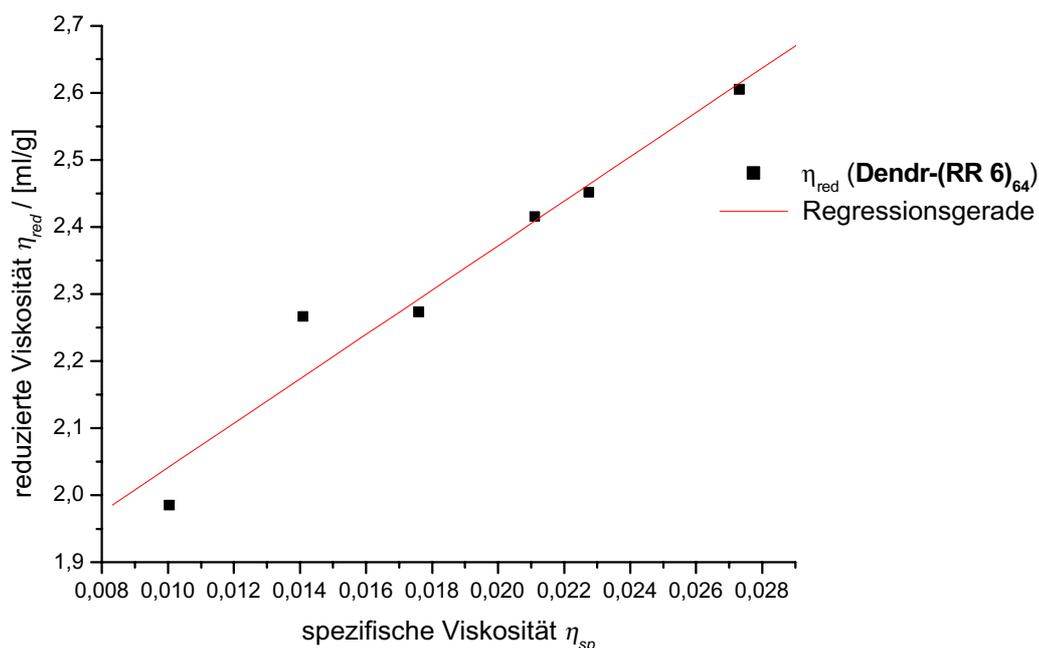


Bild 4.16: Schulz-Blaschke-Auswertung am Beispiel der Verbindung **Dendr-(RR 6)₆₄** in 0,1 M Na₂HPO₄-Lösung mit NaN₃-Zusatz bei 25°C

Für die Verbindung **Dendr-(RR 6)₆₄** wird die Viskositätszahl $[\eta] = 1,71 \text{ ml/g}$ erhalten. Bei Kenntnis der Viskositätszahl $[\eta]$ und der Molmasse eines Makromoleküls kann aus dem *Einsteinschen* Viskositätsgesetz (Gl. 4.38) das hydrodynamische Volumen v_η eines kompakten, kugelförmigen Moleküls errechnet werden. Aus der allgemein bekannten Formel für das Kugelvolumen ist der hydrodynamische Radius r_η des Teilchens zugänglich.

Mit der durch statische Lichtstreuung bestimmten Molmasse der Substanz **Dendr-(RR 6)₆₄** $M_w = 62300 \text{ g/mol}$ und der Viskositätszahl $[\eta] = 1,71 \text{ ml/g}$ errechnet sich ein hydrodynamisches Volumen pro Molekül von $71,1 \text{ nm}^3$ und daraus ein hydrodynamischer Radius $r_\eta = 2,57 \text{ nm}$.

Der hydrodynamische Radius r_η eines kompakten kugelförmigen Teilchens ist mit dem mittleren quadratischen Trägheitsradius über die Beziehung Gl. 4.19 verbunden. Wendet man diese Beziehung auf den viskosimetrisch bestimmten hydrodynamischen Radius der Probe **Dendr-(RR 6)₆₄** an, ergibt sich ein theoretischer Trägheitsradius von $\sqrt{\langle r^2 \rangle} = 1,99 \text{ nm}$, der

deutlich von dem durch statische Lichtstreuung erhaltenen Wert $\sqrt{\langle r^2 \rangle} = 27$ nm abweicht. (vgl. Tabelle 4.9 und Tabelle 4.12). Dies verdeutlicht nochmals, dass es sich bei den durch statische Lichtstreuung erhaltenen Trägheitsradien um virtuelle Radien handelt. (vgl. Kapitel 4.3.3).

In Tabelle 4.14 sind die Ergebnisse der kapillarviskosimetrischen Untersuchungen sämtlicher dendritischer Kontrastmittel **Dendr-(RR N)₆₄**, **N = 1 - 8** zusammengestellt. Neben den nach Schulz-Blaschke erhaltenen Viskositätszahlen $[\eta]$ sind die für die Berechnungen notwendigen Molmassen M , sowie die daraus resultierenden hydrodynamischen Volumina v_η und Radien r_η aufgenommen. Die Indizierung der Spalten mit „GPC“ bzw. „SLS“ gibt die Bestimmungsmethode der Molmasse an.

Mit Ausnahme der radiopaken Dendrimere **Dendr-(RR 1)₆₄**, **Dendr-(RR 7)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** wurden allein die mit Hilfe des Goniometers der Fa. Baur, SLS Systemtechnik, Hausen, bestimmten Molmassen bei der Auswertung berücksichtigt. Aufgrund der trimodalen Molmassenverteilungen der Dendrimere **Dendr-(RR 1)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** sind dort auch die bei der GPC bestimmten Molmassen der Hauptfraktionen angegeben und daraus die hydrodynamischen Volumina und Radien berechnet worden. Da von dem dendritischen Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR 7)₆₄** nur wenig Substanz zur Verfügung stand, konnte dessen Molmasse nur mittels GPC bestimmt werden.

Dendrimer	M_w / [g/mol]		$[\eta]$ / [ml/g]	v_η / [nm ³]		r_η / [nm]	
	GPC	SLS		GPC	SLS	GPC	SLS
Dendr-(RR 1)₆₄	54800	73700	2,09 ± 0,14	76,2	102,2	2,63 ± 0,06	2,90 ± 0,06
Dendr-(RR 2)₆₄		60400	1,81 ± 0,12		72,8		2,59 ± 0,06
Dendr-(RR 3)₆₄		57900	1,76 ± 0,08		67,8		2,53 ± 0,05
Dendr-(RR 4)₆₄		55600	1,74 ± 0,06		63,9		2,48 ± 0,03
Dendr-(RR 5)₆₄		46600	2,29 ± 0,05		71,1		2,57 ± 0,02
Dendr-(RR 6)₆₄		62300	1,71 ± 0,08		71,1		2,57 ± 0,04
Dendr-(RR 7)₆₄	60400		2,10 ± 0,12	84,3		2,72 ± 0,05	
Dendr-(RR 8)₆₄	60000	92100	1,92 ± 0,17	76,2	117,7	2,63 ± 0,08	3,04 ± 0,09

Tab. 4.14: Kapillarviskosimetrische Ergebnisse mit Hilfe des Auswerteverfahrens nach Schulz-Blaschke; Lösemittel 0,1 M Na₂HPO₄-Lösung mit NaN₃-Zusatz, 25°C

Die kapillarviskosimetrisch ermittelten Viskositätszahlen $[\eta]$ haben Zahlenwerte um 2 ml/g. Bei Annahme kugelförmiger Teilchen findet man für die dendritischen Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR N)₆₄**, N = 2 - 7 hydrodynamische Volumina zwischen $63,9 \leq v_\eta / \text{nm}^3 \leq 84,3$.

Für die Verbindungen **Dendr-(RR 1)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** sind mit $v_\eta = 102,2 \text{ nm}^3$ (**Dendr-(RR 1)₆₄**) bzw. mit $v_\eta = 117,7 \text{ nm}^3$ (**Dendr-(RR 8)₆₄**) etwas größere hydrodynamische Volumina gefunden worden (SLS), was vermutlich auf die trimodale Molmassenverteilung mit den relativ großen Anteilen an höhermolekularen Verunreinigungen zurückzuführen ist. Berechnet man die hydrodynamischen Volumina von **Dendr-(RR 1)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** unter alleiniger Berücksichtigung der bei der GPC bestimmten

Molmasse, ergeben sich jeweils hydrodynamische Volumina von $v_\eta = 76,2 \text{ nm}^3$, die mit denen der anderen Dendrimerproben besser übereinstimmen.

Die Viskositätszahl der Probe **Dendr-(RR 5)₆₄** ist mit $[\eta] = 2,29 \text{ ml/g}$ der größte Wert aller untersuchten Verbindungen. Die Substanz **Dendr-(RR 6)₆₄** besitzt mit $[\eta] = 1,71 \text{ ml/g}$ den kleinsten Wert. Dennoch haben beide Verbindungen mit $v_\eta = 71,1 \text{ nm}^3$ gleiches hydrodynamisches Volumen und mit $r_\eta = 2,57 \text{ nm}$ auch denselben hydrodynamischen Radius.

Während man bei der statischen Lichtstreuung der Verbindung **Dendr-(RR 6)₆₄** eine Molmasse von $M_w = 62300 \text{ g/mol}$ findet, die nahe am theoretischen Wert von $M_{theoret.} = 63050 \text{ g/mol}$ liegt, wird bei der statischen Streulichtmessung des Dendrimers **Dendr-(RR 5)₆₄** eine Molmasse von $M_w = 48000 \text{ g/mol}$ im Vergleich zur theoretischen Molmasse $M_{theoret.} = 61260 \text{ g/mol}$ bestimmt.

Vermutlich sind die Endgruppen des POPAM-Grundgerüsts bei der Synthese des dendritischen Röntgenkontrastmittels **Dendr-(RR 5)₆₄** nur unvollständig derivatisiert worden. Die unvollständige Besetzung mit dem Triiodaromaten **RR 5** hat ein verändertes hydrodynamisches Verhalten zur Folge, da das dendritische Endprodukt **Dendr-(RR 5)₆₄** dadurch eine geringere Zahl an peripheren Hydroxygruppen aufweist und zudem eine bedeutende Anzahl an nicht funktionalisierten primären Aminogruppen vorhanden ist. Dies könnte auch die Ursache für eine, im Vergleich zu den übrigen dendritischen Verbindungen, größere Viskositätszahl $[\eta]$ sein.

So wurde von Scherrenberg et al.^[75] für eine Lösung des amino-terminierten Dendrimers **DAB-dendr-(NH₂)₆₄** in D₂O bei 25°C eine Viskositätszahl $[\eta] = 6,8 \text{ ml/g}$ bestimmt. Für das hydrodynamische Volumen v_η von **DAB-dendr-(NH₂)₆₄** geben die Autoren einen Zahlenwert von $v_\eta = 32,4 \text{ nm}^3$ an, den hydrodynamischen Radius berechneten sie zu $r_\eta = 1,98 \text{ nm}$.

Anhand dieser Literaturdaten läßt sich folgern, dass eine Derivatisierung des Dendrimers **DAB-dendr-(NH₂)₆₄** mit den beschriebenen radiopaken Resten **RR N**, **N = 1 - 8** in erster Näherung zu einer Verdopplung des hydrodynamischen Volumen führt (vgl. Tabelle 4.14). Gleichzeitig vergrößert sich der hydrodynamische Radius der radiopaken Dendrimere gegenüber dem nicht-derivatisierten POPAM-Dendrimer um etwa 0,5 - 0,8 nm.

Die in dieser Arbeit bestimmten hydrodynamischen Volumina und Radien der dendritischen Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR N)₆₄**, **N = 1 - 8** haben alle ähnliche Größe. Die Struktur der jeweiligen radiopaken Endgruppen **RR N**, **N = 1 - 8** scheint, bei Annahme einer nahezu quantitativen Derivatisierung, nur einen geringen Einfluß auf die hydrodynamischen Eigenschaften der daraus abgeleiteten dendritischen Röntgenkontrastmittel zu haben.

Vergleicht man die erhaltenen Ergebnisse mit demjenigen des von Schlichter^[20] untersuchten Dendrimers **JP 591-3**, so zeigen sich gute Übereinstimmungen. Der radiopake Rest des dendritischen Röntgenkontrastmittels **JP 591-3** unterscheidet sich in der Anzahl der Hydroxygruppen (es sind nur zwei Hydroxygruppen pro Triiodaromat vorhanden) sowie in der Anwesenheit einer zusätzlichen freien Carbonsäure. Außerdem ist der radiopake Rest nicht über die Seitenkette sondern über die aromatische Carbonylgruppe an das POPAM-Dendrimer **DAB-dendr-(NH₂)₆₄** gebunden. Schlichter erhält als Viskositätszahl $[\eta] = 1,76 \text{ ml/g}$. Die daraus für das hydrodynamische Volumen bzw. den hydrodynamischen Radius abgeleiteten Werte betragen $v_\eta = 66,6 \text{ nm}^3$ und $r_\eta = 2,52 \text{ nm}$. Trotz der strukturellen Unterschiede der radiopaken Reste sind die von Schlichter gefundenen Werte nahezu identisch mit den in der Tabelle 4.14 dieser Arbeit publizierten Werten.

Abschließend sind in der nachfolgenden Tabelle 4.15 die mit den unterschiedlichen Methoden Viskosimetrie und dynamischer Lichtstreuung bestimmten hydrodynamischen Radien einander gegenübergestellt. Die Temperatur betrug bei beiden Messungen 25°C. Im Fall der dynamischen Lichtstreuung wurde in Wasser gemessen während die viskosimetrische Bestimmung der hydrodynamischen Radien in 0,1 M Na₂HPO₄-Lösung erfolgte. Außerdem wurden die hier angeführten Werte unter Einbeziehung der bei der statischen Lichtstreuung erhaltenen Molmassen ermittelt. Dennoch lassen sich qualitative Aussagen treffen.

Dendrimer	hydrodyn. Radius (DLS)*	Hydrodyn. Radius (Visk)**
	r_h [nm]	r_η [nm]
Dendr-(RR 1)₆₄	3,75	2,90
Dendr-(RR 5)₆₄	3,05	2,57
Dendr-(RR 6)₆₄	3,45	2,57
Dendr-(RR 8)₆₄	3,60	3,04

* in Wasser
** in 0,1 M Na₂HPO₄-Lösung mit 0,02 Gew-% NaN₃

Tab. 4.15: Gegenüberstellung der experimentell bestimmten hydrodynamischen Radien

Die bei den beiden Methoden bestimmten hydrodynamischen Radien r_η bzw. r_h bewegen sich zwischen 2,5 und 3,8 nm, wenngleich die bei der dynamischen Lichtstreuung gemessenen Werte etwas größer sind als die dazu gehörenden viskosimetrisch ermittelten Radien. Alle Werte liegen weit unterhalb der bei der statischen Lichtstreuung für die mittleren quadratischen Trägheitsradien $\sqrt{\langle r^2 \rangle}$ gefundenen Zahlenwerte.

Da alle dendritischen Röntgenkontrastmittel zwitterionische Moleküle sind, haben die unterschiedlichen pH-Werte der beiden Lösemittel Wasser bzw. 0,1 M Na₂HPO₄ einen großen Einfluß auf die gemessenen Molekülradien. Weiterhin ist die Viskosimetrie etwas fehlerbehafteter als die dynamische Lichtstreuung. Zur Auswertung ist eine empirische Auswerteformel zur grafischen Bestimmung der Viskositätszahl herangezogen worden. Darüber hinaus fließt in die Berechnung des hydrodynamischen Radius r_η eine weitere experimentell ermittelte fehlerbehaftete Größe, die Molmasse M_w , ein.

Letztlich ist auch die Annahme von kugelförmigen Teilchen, die bei beiden Methoden zu Grunde gelegt wurde, nicht ganz korrekt. Tatsächlich nehmen Dendrimere in höheren Generationen eine blumenkohlartige Gestalt an^[34]. Die viskosimetrische Bestimmung mit Hilfe des *Einsteinschen* Viskositätsgesetzes und die genäherte Autokorrelationsfunktion $g_I(t)$ (vgl. Kapitel 4.4.2) gehen von kompakten Kugeln als Molekülgestalt aus.

Trotz allem liefern diese beiden unterschiedlichen Messmethoden Werte, die im Rahmen der Fehlergrenzen übereinstimmen. Beide geben einen guten, und im Falle der Viskosimetrie auch leicht zugänglichen Einblick in die molekularen Dimensionen der vorliegenden dendritischen Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR N)₆₄, N = 1 - 8**.

4.6 Densitometrie

4.6.1 Theoretische Grundlagen

Die Dichte von Flüssigkeiten oder Gasen ist eine fundamentale Eigenschaft. Ihre Abhängigkeit von der Temperatur und dem Druck ist die maßgebliche Größe bei der Aufstellung von Zustandsgleichungen^[76]. Aus der Dichte von Lösungen und reinem Lösemittel kann das partielle spezifische Volumen der gelösten Substanz errechnet werden. Hierzu benötigt man den Grenzwert des partiellen spezifischen Volumens \bar{v}_2 für die Konzentration null. Es gilt folgende Beziehung:

$$\bar{v}_2 = \frac{1}{\rho_0} \left(1 - \frac{\rho - \rho_0}{c} \right) \quad (\text{Gl. 4.42})$$

mit : ρ = Dichte der Lösung,

ρ_0 = Dichte des Lösemittels,

c = Massenkonzentration in Gramm pro Kubikzentimeter.

Die obige Gleichung läßt sich in eine Geradengleichung überführen aus deren Steigung das partielle spezifische Volumen \bar{v}_2 berechnet werden kann:

$$\rho = \rho_0 + (1 - \bar{v}_2 \rho_0) c \quad (\text{Gl. 4.43})$$

Durch Multiplikation des partiellen spezifischen Volumens \bar{v}_2 mit der Molmasse M_w erhält man das partielle Molvolumen V_2 , die Division mit der Loschmidt-Zahl N_L führt zu dem gesuchten scheinbaren Molekülvolumen v_m :

$$V_2 = \bar{v}_2 M_w \quad (\text{Gl. 4.44})$$

$$v_m = \frac{V_2}{N_L} \quad (\text{Gl. 4.45})$$

Die Dichten der dendritischen Röntgenkontrastmittel-Lösungen wurden bei der *Schering AG* anhand der Eigenfrequenzänderung eines Biegeschwingers DMA 55 der Fa. Paar, Graz, bestimmt. Dessen Resonanzfrequenz wird im leeren und gefüllten Zustand gemessen. Für die Dichte gilt:

$$\rho = AT^2 - B \quad (\text{Gl. 4.46})$$

T ist die Schwingungsdauer, A und B sind Apparatkonstanten, die durch Eichmessungen von Medien bekannter Dichte (Wasser, Luft) stets neu bestimmt werden müssen.

4.6.2 Densitometrische Untersuchungen dendritischer Röntgenkontrastmittel

Bei 25°C wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren die Dichten der dendritischen Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR N)₆₄**, $N = 1 - 8$, gelöst in einer 0,1 M Na₂HPO₄-Lösung, der 0,02 Gew.-% NaN₃ als Stabilisator zugesetzt wurde, bestimmt.

Für die Substanz **Dendr-(RR 4)₆₄** ist stellvertretend eine Auftragung der gemessenen Dichte der einzelnen Lösungen gegen die dazugehörige Konzentration in Bild 4.17 gezeigt.

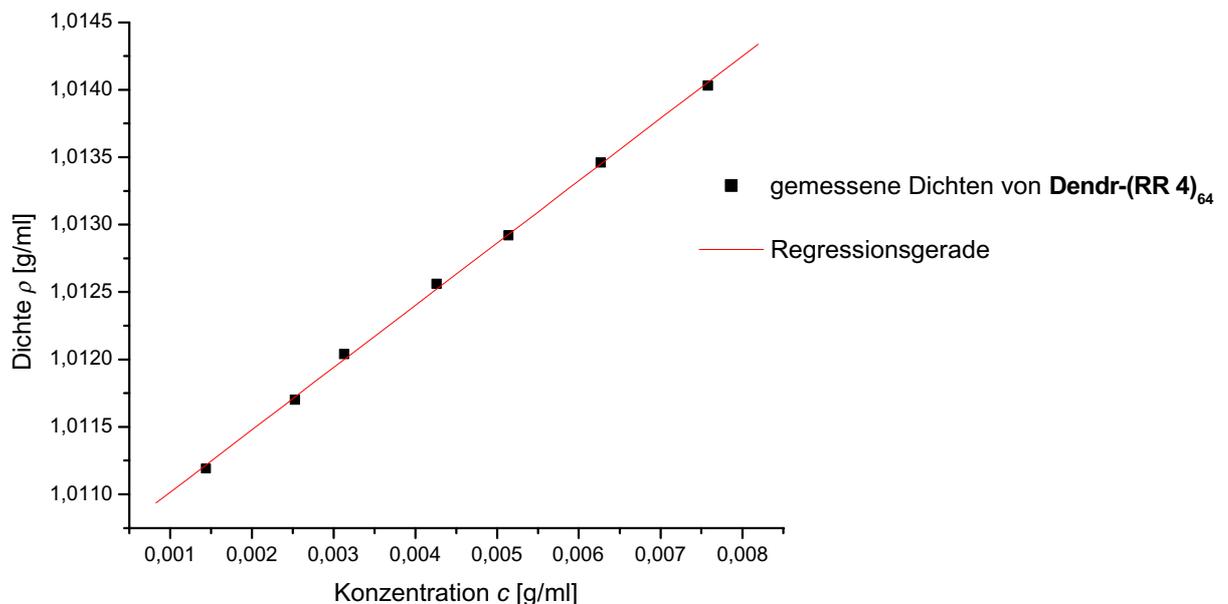


Bild 4.17: Auftragung der gemessenen Dichte gegen die Konzentration am Beispiel der Verbindung **Dendr-(RR 4)₆₄**; Lösemittel 0,1 M Na₂HPO₄-Lösung

Aus der Geradensteigung m läßt sich das partielle spezifische Volumen mit Hilfe folgender Beziehung berechnen (vgl. Gl. 4.43):

$$\bar{v}_2 = \frac{1 - m}{\rho_0} \quad (\text{Gl. 4.47})$$

Tabelle 4.16 präsentiert eine Zusammenstellung der durch Densitometrie ermittelten partiellen spezifischen Volumina \bar{v}_2 und der hieraus abgeleiteten Molekülvolumina v_m und -radien r_m . Für die Auswertung wurden analog zur Viskosimetrie die mit Hilfe der GPC bzw. SLS bestimmten Molmassen herangezogen. Die Ergebnisse sind in den Spalten unter „SLS“ oder „GPC“ gesondert aufgeführt worden.

Dendrimer	M_w / [g/mol]		\bar{v}_2 / [ml/g]	v_m / [nm ³]		r_m / [nm]	
	GPC	SLS		GPC	SLS	GPC	SLS
Dendr-(RR 1)₆₄	54800	73700	0,5357	48,7	65,6	2,27	2,50
Dendr-(RR 2)₆₄		60400	0,5386		54,0		2,34
Dendr-(RR 3)₆₄		57900	0,5398		51,9		2,31
Dendr-(RR 4)₆₄		55600	0,5323		49,1		2,27
Dendr-(RR 5)₆₄		46600	0,5704		44,1		2,19
Dendr-(RR 6)₆₄		62300	0,4948		51,2		2,30
Dendr-(RR 7)₆₄	60400		0,6183	62,0		2,46	
Dendr-(RR 8)₆₄	60000	92100	0,5427	54,1	83,0	2,35	2,71

Tab. 4.16: Übersicht der aus Dichtemessungen bestimmten Molekülvolumina und Molekülradien

Die Moleküllradien lassen sich bei Annahme einer Kugelgeometrie aus den Molekylvolumina berechnen. Werden die Proben **Dendr-(RR 1)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** nicht berücksichtigt, dann liegen die aus den Molekylvolumina errechneten Moleküllradien r_m zwischen $2,19 \leq r_m / \text{nm} \leq 2,46$. Da die Proben **Dendr-(RR 1)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** eine trimodale Molmassenverteilung besitzen und in der statischen Lichtstreuung deutlich größere Molmassen gefunden werden, ergibt die Berechnung der Molekylvolumina etwas größere Werte. Die daraus abgeleiteten scheinbaren Moleküllradien sind mit $r_m = 2,50 \text{ nm}$ für das Kontrastmittel **Dendr-(RR 1)₆₄** bzw. $r_m = 2,71 \text{ nm}$ für die Verbindung **Dendr-(RR 8)₆₄** ebenfalls ein wenig größer als die übrigen Werte.

Legt man die via GPC ermittelten Molmassen der Hauptkomponenten zugrunde, so erhält man für **Dendr-(RR 1)₆₄** ein Molekylvolumen von $v_m = 48,7 \text{ nm}^3$ und einen Moleküllradius von $r_m = 2,27 \text{ nm}$. Die densitometrische Untersuchung der Verbindung **Dendr-(RR 8)₆₄** führt zu einem Molekylvolumen von $v_m = 54,1 \text{ nm}^3$ und einen daraus abgeleiteten Radius von $r_m = 2,35 \text{ nm}$. Diese vier Werte sind wiederum denjenigen der restlichen Proben ähnlich.

In Tabelle 4.17 werden die viskosimetrisch bestimmten hydrodynamischen Radien denen durch die Densitometrie bestimmten zum Vergleich gegenübergestellt. Wie bereits in der vorangehenden Tabelle 4.16 wird zwischen den zur Auswertung herangezogenen Molmassenbestimmungsmethoden (SLS bzw. GPC) unterschieden.

Dendrimer	M_w / [g/mol]		r_m / [nm]		r_η / [nm]		Differenz			
	GPC	SLS	GPC	SLS	GPC	SLS	GPC		SLS	
							/ [nm]	/ [%]	/ [nm]	/ [%]
Dendr-(RR 1)₆₄	54800	73700	2,27	2,50	2,63	2,90	0,36	13,7	0,40	13,8
Dendr-(RR 2)₆₄		60400		2,34		2,59			0,25	9,7
Dendr-(RR 3)₆₄		57900		2,31		2,53			0,22	8,7
Dendr-(RR 4)₆₄		55600		2,27		2,48			0,21	8,5
Dendr-(RR 5)₆₄		46600		2,19		2,57			0,38	14,7
Dendr-(RR 6)₆₄		62300		2,30		2,57			0,27	10,5
Dendr-(RR 7)₆₄	60400		2,46		2,72		0,26	9,6		
Dendr-(RR 8)₆₄	60000	92100	2,35	2,71	2,63	3,04	0,28	10,6	0,33	10,9

Tab. 4.17: Hydrodynamische Radien r_η und durch Densitometrie erhaltene scheinbare Molekülradien r_m

Die durch Viskosimetrie bestimmten hydrodynamischen Radien r_η korrelieren relativ gut mit den durch Densitometrie bestimmten scheinbaren Molekülradien r_m . Allgemein nehmen die viskosimetrisch ermittelten hydrodynamischen Radien r_η etwas größere Werte an. Die Differenz bewegt sich prozentual betrachtet im Bereich von ca. 0,2 - 0,4 nm bzw. 9 - 15 % unabhängig von der berücksichtigten Methode der Molmassenbestimmung. Die Viskosität wird von der Hydrathülle beeinflusst und damit auch der gemessene hydrodynamische Radius.

Die Viskosimetrie liefert ein „solvatisiertes Volumen“^[73], die gemessenen hydrodynamischen Radien der dendritischen Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR N)₆₄**, **N = 1 - 8** sind größer als die scheinbaren Molekülradien r_m . Die Densitometrie gestattet dagegen die Bestimmung der scheinbaren Molekülvolumina und Molekülradien aus den partiellen spezifischen Volumina der gelösten Komponenten ohne Berücksichtigung von Lösemittelmolekülen.

4.7 Elektrophoretische Methoden

4.7.1 Gelelektrophorese

4.7.1.1 Theoretische Grundlagen

Unter dem Einfluß eines elektrisches Feldes wandern gelöste, geladene Moleküle in die Richtung der entgegengesetzt geladenen Elektroden^[77]. Dabei sind die Wanderungsgeschwindigkeiten der einzelnen Moleküle eines Substanzgemisches, bedingt durch die unterschiedlichen Ladungen und Molmassen, verschieden, so dass ein Substanzgemisch in einzelne Fraktionen aufgetrennt wird. Die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit ist ein charakteristischer Parameter für ein geladenes Molekül^[77]. Sie ist abhängig vom Lösemittel - wie hier in der Regel Wasser - vom pK-Wert der geladenen Gruppen, der Molekülgröße, vom verwendeten Puffersystem, der Temperatur, der elektrischen Feldstärke und dem Trägermaterial. Die relative elektrophoretische Beweglichkeit ergibt sich nun durch den Vergleich mit der Wanderungsstrecke der zu untersuchenden Substanz mit einer Standardsubstanz, die in demselben Lauf aufgetragen wurde. Es gibt drei grundlegend verschiedene elektrophoretische Trennmethode, die Elektrophorese, die Isotachophorese und die Isoelektrische Fokussierung.

Bei der Gelelektrophorese wird während der gesamten Versuchsdurchführung in einem homogenen Puffersystem gearbeitet. Hierdurch ist ein gleichbleibender pH-Wert gewährleistet und die innerhalb einer festgelegten Zeit gemessene Wanderungsstrecke ist ein Maß für die elektrophoretische Beweglichkeit.

Als Trägergel wird meist ein Polyacrylamidgel eingesetzt, das durch Copolymerisation von Acrylamid und dem Vernetzer *N,N'*-Methylenbisacrylamid (Bis) hergestellt wird. Polyacrylamid-Gele sind im Vergleich zu Stärke- oder Agarosegelen chemisch und mechanisch stabiler. Über die totale Acrylamid-Konzentration läßt sich die Porengröße des Gels exakt und reproduzierbar einstellen. Der Zusatz von Natriumdodecylsulfat (engl. SDS \equiv Sodium Dodecyl Sulfate) zum Gel wurde erstmals von Shapiro beschrieben^[78]. Das anionische Detergenz SDS maskiert die Ladung von Proteinen unter Ausbildung von Mizellen mit einer konstanten Nettoladung. Proteine verlieren unter diesen Bedingungen außerdem ihre Sekundär- und Tertiärstruktur.

Das Gel ist in die zwei Bereiche Sammel- und Trenngel mit unterschiedlichen Porengrößen und pH-Werten unterteilt. Die Proben werden auf das Sammelgel aufgetragen. Hier sind die Poren größer als im Trenngel, so dass die Beweglichkeit nur von der Nettoladung und nicht von der Molekülgröße abhängig ist. Beim Anlegen einer Spannung wandern die Probenmoleküle nach dem Prinzip der Isotachophorese zwischen einem Leitelektrolyt mit hoher Beweglichkeit, hier Chloridionen, und einem terminalen Elektrolyt (Folgeion) mit geringer Beweglichkeit, hier das aus dem Elektrophorespuffer (s.u.) stammende Glycin. Alle Teilchen wandern mit der selben Geschwindigkeit, so dass die Trennung durch die unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit erfolgt. Da die Wanderungsgeschwindigkeiten der Ionen gleich sind, und diese gleichzeitig vom Produkt aus Feldstärke und Ionenmobilität bestimmt werden, ordnen sich die Moleküle unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes nach ihrer Beweglichkeit zwischen dem Leit- und dem Folgeion an und man erhält eine Zonenschärfung. Im dem an das Sammelgel angrenzende Trenngel werden die Moleküle in Abhängigkeit von ihrer Ladung und ihrer Größe getrennt.

4.7.1.2 Gelelektrophoretische Untersuchungen dendritischer Röntgenkontrastmittel

Die Herstellung der Gele (siehe Kapitel 5.1) sowie die anschließende Gelelektrophorese erfolgte an der TU Berlin. Als Elektrophoreseeinheit wurde eine Elektrophoresekammer vom Typ Mighty SmallTM der Fa. Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, eingesetzt.

5 mg der zu untersuchenden dendritischen Röntgenkontrastmittel wurden in 250 µl Probenpuffer und 750 µl bidest. Wasser gelöst und danach jeweils 5 µl dieser Lösungen in die Taschen des Sammelgels gegeben. Der Probenpuffer besteht aus 10 ml 0,5 M Tris/Cl-Lösung (pH 6,8), 1 g SDS (Fa. Fluka Chemie AG, Neu-Ulm), 1,93 g Dithiothreitol (DTT, Fa. Fluka Chemie AG, Neu-Ulm) und 14,3 ml 87 %-igem Glyzerin (Fa. Merck, Darmstadt). Außerdem enthält er noch 0,01 g des Farbstoffs Bromphenolblau (Fa. Riedel-de Häen, Neu-Ulm). Dieser dient zur Sichtbarmachung der Laufmittelfront während der Versuchsdurchführung. Der zum Einsatz kommende Elektrophoresepuffer nach Laemmli^[79] setzt sich aus 15 g Tris, 72 g Glycin sowie 5 g SDS (alle Fa. Fluka Chemie AG, Neu-Ulm), auf 5 l bidest. Wasser aufgefüllt, zusammen.

Neben den Dendrimerproben wurde in einigen Taschen des Sammelgels der Proteinstandard (Proteintestgemisch 4 + 5, Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg) mit aufgetragen. Sodann wurde an der Spannungseinheit vom Typ Power Supply PS300 (Fa. Hoefer Scientific Instruments, San Francisco) für die Dauer von ca. 20 min eine Spannung von 75 V angelegt. Anschließend wurde die Spannung auf 175 V erhöht und die Elektrophorese ca. 60 min durchgeführt. Das Gel wurde danach aus der Kammer genommen und mit bidest. Wasser gründlich gespült. Sodann wurde das Gel für 4 h mit einer Farbstofflösung Colloidal Blue Stain, bestehend aus den beiden Lösungen Stainer A und Stainer B der Fa. NOVEX Electrophoresis GmbH, Frankfurt/M, gefärbt. Über Nacht wurde der Farbstoff aus den protein- und probenfreien Bereichen des Polyacrylamid-Gels durch Schütteln des Gels in einer Entfärbelösung, bestehend aus 10 % Essigsäure, 20 % Methanol und 70 % bidest. Wasser, gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet.

Wie in der Arbeit von Schlichter^[20] gezeigt wurde, ist die Gelelektrophorese eine schnelle Methode zur qualitativen Beurteilung der Reinheit dendritischer Röntgenkontrastmittel. Da aber keine geeigneten dendritischen Standards zur Verfügung stehen, lassen sich die Molmassen nur indirekt über den Vergleich der Wanderungstrecken der zugesetzten Proteine mit denjenigen von Dendrimeren bekannter Struktur und bekannten engen Molmassenverteilungen bestimmen. Dies ermöglicht seinerseits eine Korrelation zwischen der Wanderungstrecke des Proteinstandards und der Wanderungstrecke des unbekanntes dendritischen Röntgenkontrastmittels. Eine solche Korrelation wurde von Buitenhuis^[80] vorgenommen und bildet die Grundlage der elektrophoretischen Molmassenbestimmung am Beispiel des Röntgenkontrastmittels **Dendr-(RR 8)₆₄**.

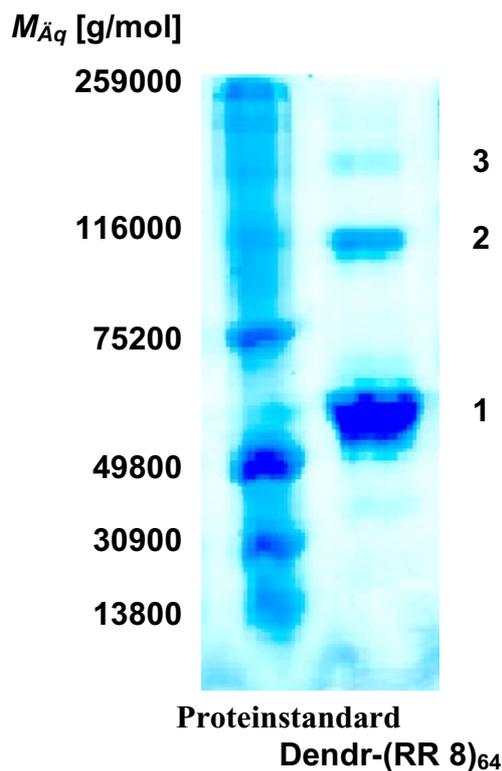


Bild 4.18: Gelelektrophoretische Molmassenbestimmung am Beispiel der Verbindung **Dendr-(RR 8)₆₄**

Aus dem Vergleich der Wanderungstrecke der Proteine des Standards mit den Wanderungstrecken der drei Komponenten der Probe **Dendr-(RR 8)₆₄** lassen sich die Molmassen nach Buitenhuis^[80] bestimmen. Für die Hauptbande, gekennzeichnet mit der Zahl 1, findet man eine Molmasse von $M_{Äq}(1) = 56000$ g/mol. Die beiden weiteren Bestandteile der Probe, mit 2 bzw. 3 gekennzeichnet, weisen Molmassen von $M_{Äq}(2) = 115000$ g/mol bzw. $M_{Äq}(3) = 200000$ g/mol auf.

Nach dem oben genannten Verfahren wurden die in Tabelle 4.18 aufgeführten Molmassen der radiopaken Dendrimere an der TU Berlin bestimmt. Die Hauptbande ist durch die Zahl (1) gekennzeichnet, die Nebenbanden sind mit den Zahlen 2 bzw. 3 indiziert.

Dendrimer	$M_{theoret.}$ [g/mol]	$M_{\ddot{a}q}(1)$ [g/mol]	$M_{\ddot{a}q}(2)$ [g/mol]	$M_{\ddot{a}q}(3)$ [g/mol]
Dendr-(RR 1)₆₄	62279	53000	110000	190000
Dendr-(RR 3)₆₄	62279	57000		
Dendr-(RR 4)₆₄	64074	50000		
Dendr-(RR 5)₆₄	58626	56000		
Dendr-(RR 6)₆₄	63050	50000		
Dendr-(RR 7)₆₄	57603	56000		
Dendr-(RR 8)₆₄	61254	56000	115000	200000

Tab. 4.18: Durch Gelelektrophorese erhaltene Molmassen der dendritischen Röntgenkontrastmittel (nach Buitenhuis^[80])

Bei den beiden Verbindungen **Dendr-(RR 1)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** werden drei deutlich erkennbare Banden erhalten. Dieses Ergebnis stimmt mit den Befunden der Gelpermeationschromatographie überein. Die Proben **Dendr-(RR 1)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** zeigen auch dort eine trimodale Molmassenverteilung, und da der Anteil an höhermolekularen Nebenprodukten mit rund 17 % relativ groß ist, sind diese auch in der Gelelektrophorese gut zu detektieren.

Die restlichen Proben zeigen nur eine signifikante Bande. Eine zweite, den höhermolekularen Verunreinigung zuzuordnende Bande, konnte nach dem Anfärbeprozess nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Vermutlich ist bei den übrigen Proben der deutlich geringere Anteil der höhermolekularen Verunreinigung (ungefähr 4 %) dafür verantwortlich.

Die gefundenen Molmassen $M_{\ddot{a}q}(1)$ der Hauptkomponenten sind alle den aus der GPC bekannten Molmassen ähnlich (vgl. Tabelle 4.5, Kapitel 4.2.2). Bei den beiden Verbindungen **Dendr-(RR 1)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** trifft dies auch auf die beiden höhermolekularen Anteile $M_{\ddot{a}q}(2)$ bzw. $M_{\ddot{a}q}(3)$ zu.

4.7.2 Isoelektrische Fokussierung

4.7.2.1 Theoretische Grundlagen

Das zur Synthese der makromolekularen Röntgenkontrastmittel eingesetzte dendritische POPAM-Grundgerüst *DAB-dendr-(NH₂)₆₄* besitzt 62 tertiäre Aminogruppen. Da dieses Dendrimer unter physiologischen Bedingungen als Polykation vorliegt, muß über die radiopaken Reste ein Ladungsausgleich eingeführt werden. Daher wird in die Molekülstruktur der Triiodaromaten die zweite, für den Ladungsausgleich notwendige Carboxylgruppe integriert (vgl. Kapitel 3.2.2.2). Alle in dieser Arbeit beschriebenen dendritischen Röntgenkontrastmittel sind amphiphile, zwitterionische Moleküle und können mit der Methode der isoelektrischen Fokussierung (IEF) untersucht werden.

Die Moleküle wandern in einem pH-Gradienten unter dem Einfluß eines elektrischen Felds in Richtung von Anode oder Kathode, bis sie den Punkt innerhalb des pH-Gradienten erreichen, an dem ihre Nettoladung null beträgt. Diesen pH-Wert bezeichnet man als „isoelektrischen Punkt (pI)“ der Substanz. Da hier im Molekül keinerlei Ladungen mehr vorhanden sind, hat das angelegte äußere elektrische Feld keinen Einfluß auf die Substanz. Die isoelektrische Fokussierung ist eine Endpunkt-Methode.

Die Kenntnis des pI ist zur Beurteilung der Löslichkeit der Substanz beim physiologischen pH-Wert 7,4 von großer Bedeutung. Da ein Molekül am pI die geringste Löslichkeit hat, sollte dieser möglichst weit vom physiologischen pH-Wert entfernt liegen. Durch Vergleich der pI-Werte verschiedener dendritischer Röntgenkontrastmittel kann gleichzeitig der Einfluß der Seitengruppen auf die Löslichkeit der Verbindungen beurteilt werden.

4.7.2.2 Isoelektrische Fokussierung dendritischer Röntgenkontrastmittel

Die Untersuchung der isoelektrischen Fokussierung einiger dendritischer Röntgenkontrastmittel wurde an der TU Berlin bei 10°C mit Hilfe einer Elektrophoreseinheit des Typs Multiphor®II Electrophoresis System der Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala, durchgeführt. Als Thermostat kam ein Gerät der Fa. Haake, Karlsruhe, bestehend aus einem Wasserbad des Typs Haake C und einer Steuereinheit des Typs Haake F3 digital zum Einsatz.

Die Substanzen werden auf ein Polyacrylamidgel, welches einen pH-Gradienten ausbilden kann, aufgetragen. Grundvoraussetzung für eine reproduzierbare Trennung ist dabei ein stabiler, kontinuierlicher pH-Gradient. Dieser wird entweder beim Anlegen des elektrischen Feldes durch geeignete Trägerampholyte, oder aber durch fest mit dem Gelmedium verbundene immobilisierte, puffernde Gruppen ausgebildet. Hier wurde ein kommerziell erhältlicher Servalyl® Precoate (Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg) auf Basis eines Polyacrylamid-Gels verwendet. Da die Lage der pK-Werte der Trägerampholyte temperaturabhängig ist, muß bei konstanter Temperatur gearbeitet werden.

In der Mitte des Gels wurden die wäßrigen Lösungen der zu untersuchenden Röntgenkontrastmittel sowie ein Proteinstandard (Proteingemisch 9, Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg) mit einer Schablone auf die verschiedenen Spuren aufgetragen.

Die Elektrodenstreifen wurden mit der Anoden- bzw. Kathodenflüssigkeit getränkt, auf das Gel aufgelegt und an die Spannungseinheit angeschlossen. Die Anodenflüssigkeit (Anodenflüssigkeit Nr. 3, Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg) enthält u.a. die sauren Aminosäuren L-Asparaginsäure und L-Glutaminsäure, die Kathodenflüssigkeit (Kathodenflüssigkeit Nr. 10, Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg) besteht u.a. aus den basischen Aminosäuren L-Arginin, L-Lysin sowie Ethylendiamin. Die Messungen wurden ungefähr 2,5 h mit kontinuierlich ansteigender Spannung bis zum Endwert von 3000 V durchgeführt. Als Spannungseinheit diente das auch bei der Gelelektrophorese genutzte Gerät der Fa. Hoefer Scientific Instruments, San Francisco (vgl. 4.7.1.2).

Nach dem Ende der isoelektrischen Fokussierung wurde das Gel für 10 min mit der bei der Gelelektrophorese genannten Entfärbelösung fixiert und anschließend mit bidest. Wasser gespült. Das bei der isoelektrischen Fokussierung eingesetzte Gel wurde analog zur Gelelektrophorese angefärbt und getrocknet, es ist in Bild 4.19 präsentiert.

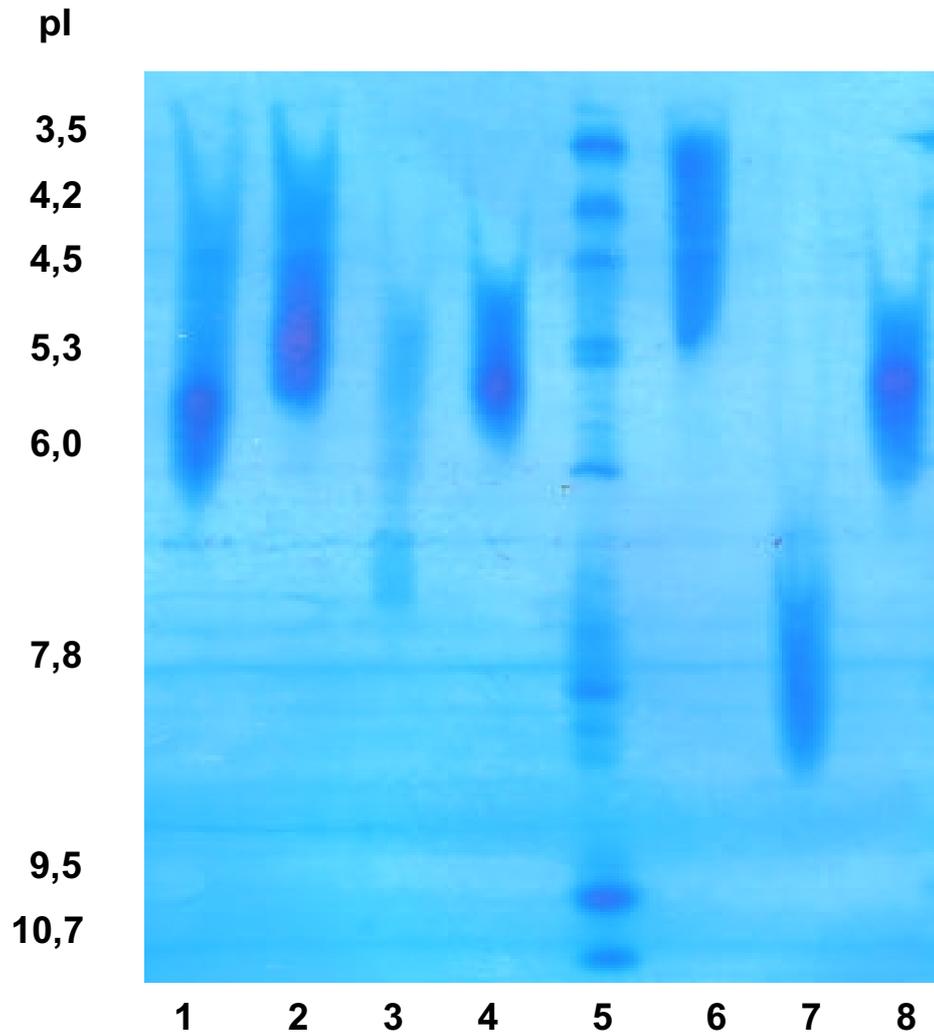


Bild 4.19: Isoelektrische Fokussierung der dendritischen Röntgenkontrastmittel

Im Gegensatz zu den scharfen Banden des Proteinstandards, zeigen alle untersuchten dendritischen Röntgenkontrastmittel bei der isoelektrischen Fokussierung breite Banden. Die aus dem Vergleich mit dem Proteinstandard (Spur 5) experimentell bestimmten isoelektrischen Punkte der Dendrimere sind in Tabelle 4.19 angegeben.

Spur	Substanz	pI
1	Dendr-(RR 3)₆₄	5,7
2	Dendr-(RR 4)₆₄	5,3
3	Dendr-(RR 7)₆₄	5,3 und 7,1
4	Dendr-(RR 5)₆₄	5,5
5	Proteingemisch 9	
6	Dendr-(RR 1)₆₄	4,2
7	Dendr-(RR 8)₆₄	7,8
8	Dendr-(RR 6)₆₄	5,6

Tab. 4.19: Lage der isoelektrischen Punkte

Ein Grund für die breiten Banden könnte die unvollständige Derivatisierung der terminalen Amino-Endgruppen des dendritischen Grundgerüsts mit den triiodierten radiopaken Resten sein. Mit Erhöhung der Generationenzahl eines Dendrimers vergrößert sich die Oberflächendichte an funktionellen Gruppen.

Nur die Probe **Dendr-(RR 8)₆₄** sowie ein Teil der Probe **Dendr-(RR 3)₆₄** wandert im Experiment in Richtung Kathode, alle anderen untersuchten Dendrimere wandern zur Anode. Mit Ausnahme von **Dendr-(RR 7)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** liegen die pI-Werte $4,2 \leq pI \leq 5,7$ genügend weit vom physiologischen pH-Wert entfernt. Bei der Substanz **Dendr-(RR 7)₆₄** beobachtet man eine schwache Nebenbande bei 7,1. Die Probe **Dendr-(RR 8)₆₄** besitzt eine signifikant abgegrenzte Bande bei ungefähr 7,8, was auf den ersten Blick verwunderlich ist, da man dies aufgrund der vorliegenden Molmassenverteilung und minderen Qualität des eingesetzten POPAM-Grundgerüsts auch bei der Probe **Dendr-(RR 1)₆₄** erwarten könnte.

Der radiopake Rest **GRR 8** (bzw. **RR 8** nach Abspaltung der Schutzgruppen) wird bei der Synthese der Verbindung **Dendr-(RR 8)₆₄** über ein aromatisches Carbonsäurechlorid an das dendritische Grundgerüst gebunden. Durch die ortho-ständigen Iodatome ist dieses in seiner Reaktionsfähigkeit sterisch behindert. Daneben ist die Funktionalisierung von Dendrimern höherer Generation (hier Generation 5) aus sterischen Gründen erschwert^[34]. Somit wirken hier zwei sterische Effekte in dieselbe Richtung und verstärken sich gegenseitig, was die

unvollständige Derivatisierung sowohl von DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄ als auch der höhermolekularen Verunreinigungen der Charge ng12351 zur Folge haben könnte. Bedingt durch die größere Anzahl nicht-funktionalisierter primärer Amino-Endgruppen wäre das Produkt **Dendr-(RR 8)₆₄** unter physiologischen Bedingungen nach außen eine polykationische Spezies.

Die beiden sich negativ auswirkenden sterischen Einflüsse könnten auch bei der dem Dendrimer **Dendr-(RR 8)₆₄** strukturell ähnlichen Verbindung **Dendr-(RR 7)₆₄** zu einer teilweise unvollständigen Derivatisierung des POPAM-Grundgerüsts geführt haben. Auch hier behindern die ortho-ständigen Iodatome die Reaktion des Carbonsäurechlorids von **GRR 7** (bzw. **RR 7** nach der Schutzgruppenabspaltung). Allerdings scheint diese unvollständige Derivatisierung nicht so stark wie bei der Probe **Dendr-(RR 8)₆₄** ausgeprägt zu sein, denn der größte Teil der Probe wandert in Richtung Anode, für den ein pI = 5,3 bestimmt wird, der den bei den übrigen Proben gefundenen Werten ähnlich ist.

Die Ursachen für die bei **Dendr-(RR 7)₆₄** beobachteten beiden Banden könnten auch synthetisch bedingt sein. Eine Wiederholung, sowohl der Synthese als auch der isoelektrischen Fokussierung, könnte darüber Klarheit bringen.

Gegenüber **GRR 8** wird der Triiodaromat **GRR 1** (bzw. **RR 1** nach der Schutzgruppenabspaltung) bei der Verbindung **Dendr-(RR 1)₆₄** über die sterisch flexiblere Diglykolsäure-Seitenkette an das dendritische Grundgerüst gebunden. Hierdurch ist die Umsetzung des aktivierten Triiodaromaten mit dem POPAM-Dendrimer deutlich weniger behindert, so dass nach genügend langen Reaktionszeiten eine nahezu quantitative Derivatisierung sowohl von DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄ als auch der höhermolekularen Verunreinigungen der Charge ng12351 erfolgen kann.

4.8 Physikochemische und pharmakologische Untersuchungen

Fünf der synthetisierten dendritischen Röntgenkontrastmittel wurden in der Abteilung „Allgemeine Physikochemie“ der *Schering AG* bezüglich ihrer physikochemischen und pharmakologischen Eigenschaften untersucht. Zur Beurteilung der potentiellen klinischen Anwendbarkeit eines Röntgenkontrastmittels dienen u.a. die in Kapitel 3.1.1 genannten physikochemischen Kriterien Löslichkeit, Viskosität, osmotischer Druck, lipophile bzw. hydrophile Eigenschaft des iodhaltigen Moleküls sowie dessen elektrische Ladung. Die an niedermolekulare Röntgenkontrastmittel gestellten Anforderungen lassen sich generell auch auf makromolekulare, dendritische Röntgenkontrastmittel übertragen. Neben einer hohen Körperverträglichkeit, die in Form der Lethaldosis 50 (LD₅₀-Wert, entspricht der Dosis bei die der Hälfte der Versuchstiere stirbt) angegeben wird, werden an ein solches „blood pool“-Kontrastmittel zusätzliche Anforderungen an den Iodgehalt und an die Fähigkeit zur renalen Ausscheidung durch glomeruläre Filtration innerhalb eines bestimmten Zeitraums gestellt.

In Tabelle 4.20 ist das Anforderungsprofil an ein makromolekulares, dendritisches Röntgenkontrastmittel angegeben, das aus langjährigen Studien der *Schering AG*^[57] hergeleitet worden ist. Der Einfluß dieser wesentlichen Parameter auf die potentielle Eignung solcher Verbindungen wurde bereits ausführlich in Kapitel 3.1.1 besprochen.

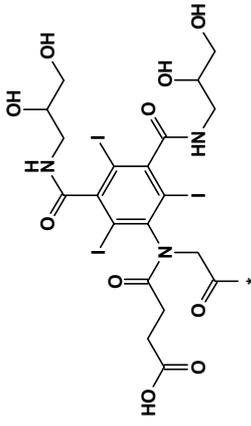
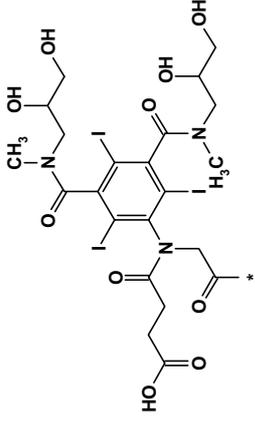
Kriterium	Richtwert
Wasserlöslichkeit	> 100 mg I /ml
Iodgehalt im Makromolekül	> 35 %
Viskosität einer Lösung mit c ≥ 100 mg/ml	< 10 mPa*s (37°C)
Osmolalität einer Lösung mit c ≥ 100 mg I/ml	< 1000 mosm/kg H ₂ O (37°C)
Verträglichkeit (LD ₅₀ -Wert)	> 3 g I/kg
Iod-Konzentration im Plasma	> 2 mg I/ml nach 10 min. p.i
Ausscheidung	Vollständige Ausscheidung nach 14 Tagen
Chemische Stabilität	Hitzesterilisierbarkeit

Tab. 4.20: Anforderungsprofil an ein makromolekulares Röntgenkontrastmittel

Die Untersuchungsergebnisse der Viskositäts-, Osmolalitäts- und Verträglichkeitsstudien sind auf den beiden Folgeseiten in den Tabellen 4.21 und 4.22 zusammengestellt worden. Bei den Verbindungen **Dendr-(RR 4)₆₄** und **Dendr-(RR 7)₆₄** standen keine ausreichenden Substanzmengen für die Durchführung der Tests zur Verfügung. Das Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR 8)₆₄** ist zu wenig wasserlöslich, um für die Untersuchung eine ausreichend konzentrierte Lösung herzustellen. Dieses Verhalten von **Dendr-(RR 8)₆₄** deckt sich mit den Ergebnissen der statischen Lichtstreuung (vgl. Kapitel 4.3.3) und der isoelektrischen Fokussierung (vgl. Kapitel 4.7.3). Die Verbindung **Dendr-(RR 8)₆₄** kennzeichnet sowohl ein deutlich negativer zweiter osmotischer Virialkoeffizient A_2 als auch ein pI, der in der Nähe des physiologischen pH-Werts liegt.

Zur Formulierung von Kontrastmittellösungen ist der durch Elementaranalyse bestimmte Iodgehalt wichtig, der deshalb in die Tabellen 4.21 und 4.22 aufgenommen worden ist. Die Konzentrationen der Testsubstanzen werden in der für Pharmakologen gebräuchlichen Einheit [mg Iod/ml] angegeben.

Die dendritischen Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR 1)₆₄**, **Dendr-(RR 2)₆₄**, **Dendr-(RR 3)₆₄**, **Dendr-(RR 5)₆₄** und **Dendr-(RR 6)₆₄** wurden bei der geforderten Mindestkonzentration von $c = 100$ mg I/ml Wasser untersucht (vgl. Tabelle 4.20). Der Einfluß einer Konzentrationserhöhung auf die gemessene Viskosität wurde darüber hinaus bei den Verbindungen **Dendr-(RR 5)₆₄** und **Dendr-(RR 6)₆₄** studiert. Die dabei erhaltenen Daten sind in der Tabelle 4.22 in separaten Zeilen innerhalb der Spalten 5 und 7 angegeben.

Dendrimer	Radiopaker Rest	Iodgehalt / [%]	Osmolalität / [mosm/kg Wasser]	Viskosität / [mPa*s]	LD ₅₀ (Maus) / [g I/ kg]	Konzentration [mg I/ml]
Dendr-(RR 5)₆₄		35,71	137	2,51	3 - 5	100
Dendr-(RR 6)₆₄		36,22	118	2,52	n.b.	100
				13,09		149

Tab. 4.22: Übersicht II Physikochemische und pharmakologische Untersuchungsergebnisse

Die getesteten Verbindungen **Dendr-(RR 1)₆₄**, **Dendr-(RR 2)₆₄**, **Dendr-(RR 3)₆₄**, **Dendr-(RR 5)₆₄** und **Dendr-(RR 6)₆₄** erfüllen die in Tabelle 4.20 genannten Viskositäts- und Osmolalitätskriterien deutlich. Die Viskosität der Lösungen hat bei der geforderten Mindestkonzentration $c = 100$ mg I/ml maximal einen Wert $\eta = 2,6$ mPa*s. Somit lassen sich diese Röntgenkontrastmittel bei der Mindestkonzentration mit einer ausreichenden Injektionsgeschwindigkeit applizieren.

Gleichzeitig ist jedes der getesteten Röntgenkontrastmittel bei dieser Konzentration mit einer Osmolalität von maximal 240 mosm/kg Wasser, gegenüber dem Blut, dessen Osmolalität bekanntlich 290 mosm/kg Wasser^[24] beträgt, hypoton. Die meisten der heutzutage eingesetzten Kontrastmittel sind dagegen gegenüber dem Blut hyperton^[24].

Von der Verbindung **Dendr-(RR 5)₆₄** wurde eine konzentriertere Lösung der Konzentration $c = 148$ mg I/ml hergestellt. Außerdem wurde eine zweite konzentriertere Lösung der Substanz **Dendr-(RR 6)₆₄** mit $c = 149$ mg I/ml bereitet. Diese beiden letztgenannten Lösungen wurden ausschließlich viskosimetrisch untersucht. Die Viskositäten beider Lösungen liegen mit $\eta \cong 13$ mPa*s bzw. $\eta \cong 17$ mPa*s bereits deutlich oberhalb des Grenzwerts von $\eta = 10$ mPa*s, diese Lösungen könnten nicht mit einer ausreichenden Geschwindigkeit injiziert werden.

Die letale Dosis (LD₅₀) der Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR 1)₆₄**, **Dendr-(RR 3)₆₄** und **Dendr-(RR 5)₆₄** wurde an männlichen Mäusen mit einem Gewicht zwischen 22 und 28 g bestimmt. Hierzu wurden den Tieren, ausgehend von einer Mindestdosis von 1 g I/kg, jeweils in Schritten von 2 g I/kg ansteigende Kontrastmitteldosen verabreicht, bis sämtliche Versuchstiere starben. Die Konzentrationen der Lösungen betrug immer $c = 100$ mg I/ml. Zur Kontrolle wurde einer Gruppe von Tieren eine Kochsalzlösung verabreicht. Aus der Sterblichkeit der Tiere bei ansteigender Kontrastmitteldosis wurde der LD₅₀-Wert ermittelt. Unmittelbar nach dem Tod wurden die Organe der verstorbenen Tiere entnommen und untersucht. Sieben Tagen nach der Applikation der Kontrastmittellösungen wurden auch die überlebenden Tiere getötet und auf Organveränderungen bzw. Anreicherungen der Substanzen innerhalb bestimmter Organe untersucht.

Die Verträglichkeit der beiden Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR 1)₆₄** und **Dendr-(RR 5)₆₄** liegt deutlich oberhalb der geforderten 3 g I/kg Körpergewicht. Mit LD₅₀-Werten zwischen 5 und 7 g I/kg Körpergewicht wurde bei der Substanz **Dendr-(RR 1)₆₄** der höchste Wert aller bisher bei der *Schering AG* untersuchten dendritischen Röntgenkontrastmittel ermittelt.

Die überlebenden Tiere, denen die Verbindung **Dendr-(RR 1)₆₄** verabreicht worden war, zeigten nach sieben Tagen einige Organveränderungen wie z.B. blasse Nieren, gelblich-graue Bereiche in der Leber oder hämorrhagische Lungen. Allerdings zeigte auch ein Tier der Kontrollgruppe einige dieser Symptome, so dass der Befund nicht sicher auf die verabreichte Substanz zurückzuführen ist. Bei Versuchstieren, denen die Verbindung **Dendr-(RR 5)₆₄** verabreicht worden war, sind nach sieben Tagen keine Organveränderungen festgestellt worden.

Die Substanz **Dendr-(RR 3)₆₄** ist im Vergleich zu den beiden zuvor besprochenen Röntgenkontrastmittel mit einem LD₅₀-Wert < 3 g I/kg Körpergewicht deutlich schlechter verträglich. Spätestens 24 h nach der Gabe einer Dosis von 3 g I/kg Körpergewicht starben alle Tiere. Die Applikation einer Dosis von 4 g I/kg Körpergewicht führte sogar zum sofortigen Tod der Versuchstiere. In den Nieren der toten Tiere fanden sich anschließend hohe Konzentrationen des Kontrastmittels wieder.

Die deutliche Differenz zwischen den beiden strukturell sehr ähnlichen Verbindungen **Dendr-(RR 1)₆₄** und **Dendr-(RR 3)₆₄** ist verwunderlich und kann nicht überzeugend begründet werden. Zur Klärung dieses Sachverhaltes wäre eine nochmalige Synthese von **Dendr-(RR 3)₆₄** und anschließende Studien angebracht, um mögliche synthesebedingten Ursachen auszuschließen.

Tabelle 4.23 zeigt die Daten der bei der *Schering AG* durchgeführten Studien zur renalen Eliminierung der drei dendritischen Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR 2)₆₄**, **Dendr-(RR 5)₆₄** und **Dendr-(RR 6)₆₄** an weiblichen Sprague-Dawley-Ratten. Untersucht wurde jeweils die prozentuale Eliminierung der verabreichten Dosis. Der maßgebliche Untersuchungszeitraum ist in runden Klammern angegeben. Diesen Ergebnissen werden die Daten dreier radiopaker Polylysin-Sternpolymere **PL-D₄-PS₁-38**, **PL-D₄-PS₂-62** und **PL-D₈-PS₃-33** vergleichend gegenübergestellt^[81]. Bei allen untersuchten Verbindungen betrug die Konzentration der Kontrastmittellösungen $c = 100$ mg I/ml und den Versuchstieren wurde jeweils eine Dosis

von 400 mg I/kg Körpergewicht verabreicht. Der besseren Vergleichbarkeit wegen sind außerdem die bei der statischen Lichtstreuung dieser sechs Verbindungen gefundenen Molmassen M_w in die Tabelle aufgenommen worden.

Dendrimer	M_w / [g/mol] (SLS)	Renale Eliminierung über Urin / [% der verabreichten Dosis]			Kontrastmittelgehalt der Nieren (24 h p.i.) / [% der verabreichten Dosis]
		(3h)	(24h)	(0-24h)	
Dendr-(RR 2)₆₄	60400	67,3	2,40	69,7	3,97
Dendr-(RR 5)₆₄	46600	79,4	5,05	84,5	1,27
Dendr-(RR 6)₆₄	62300	62,1	7,87	70,0	6,09
PL-D₄-PS₁-38	27000	73,1	5,02	78,1	8,12
PL-D₄-PS₂-62	78700	29,0	6,29	35,2	8,61
PL-D₈-PS₃-33	33900	39,5	4,99	44,5	6,17

Tab. 4.23: Renale Eliminierung einiger makromolekularer Röntgenkontrastmittel
[untersucht an weiblichen Sprague-Dawley-Ratten]

Die Studien zeigen, dass die untersuchten dendritischen Röntgenkontrastmittel überwiegend renal eliminiert werden. Nach 24 h werden mindestens 70 % der verabreichten Dosis im Urin wiedergefunden (vorletzte Spalte). Dennoch unterscheiden sich die einzelnen Wiederfindungsraten deutlich. So zeigen die beiden Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR 2)₆₄** und **Dendr-(RR 6)₆₄** schlechtere renale Eliminierung als die Verbindung **Dendr-(RR 5)₆₄**, bei der über 84 % über die Nieren ausgeschieden werden und sich nach 24 h im Urin wiederfinden.

Die 24 h nach der Injektion noch in der Niere nachweisbaren prozentualen Anteile der Röntgenkontrastmittel sind in der letzten Spalte zusammengestellt. Bei den Verbindungen **Dendr-(RR 2)₆₄** und **Dendr-(RR 6)₆₄** beläuft sich dieser Anteil auf rund 4 bzw. 6 % der verabreichten Dosis, bei der Verbindung **Dendr-(RR 5)₆₄** beträgt er dagegen nur etwa 1 %. Damit ist **Dendr-(RR 5)₆₄** das bis dato am besten renal eliminierbare dendritische Röntgenkontrastmittel.

Während die beiden Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR 2)₆₄** und **Dendr-(RR 6)₆₄** Molmassen von ungefähr $M_w \cong 60000$ g/mol aufweisen, hat das Kontrastmittel **Dendr-(RR 5)₆₄** eine deutlich kleinere Molmasse von $M_w = 46600$ g/mol. Allerdings zeigen die viskosimetrischen Untersuchungen, dass jedes dieser drei Dendrimere ein nahezu identisches hydrodynamisches Volumen von ungefähr $v_\eta \cong 71$ nm³ einnimmt (vgl. Tabelle 4.14, Kapitel 4.5.3). Die unterschiedlichen Eliminierungsraten sollten daher eine Folge der unterschiedlichen Struktur der radiopaken Endgruppen und nicht der Molekülgröße sein.

Die dendritischen Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR 2)₆₄** und **Dendr-(RR 6)₆₄** tragen *N*-Methylaminopropandiol-Seitenketten (vgl. Tabelle 4.21 und 4.22). Eventuell sind diese zusätzlich vorhandenen Methylgruppen für die geringeren Eliminationsraten verantwortlich. Zur Klärung dieses Sachverhaltes sind weitere Studien notwendig.

Die Röntgenkontrastmittel **PL-D₄-PS₁-38**, **PL-D₄-PS₂-62** und **PL-D₈-PS₃-33** basieren auf unterschiedlichen Polylysine-Grundgerüsten, die in einer polymeranalogen Umsetzung mit Triiodaromaten funktionalisiert wurden^[81]. Die Polylysinderivate **PL-D₄-PS₂-62** und **PL-D₈-PS₃-33** zeigen bei analogen Testbedingungen eine schlechtere renale Eliminierung als die untersuchten dendritischen Röntgenkontrastmittel (vgl. Tabelle 4.23). Auch der in den Nieren verbleibende Anteil ist mit ca. 8 % größer als bei den dendritischen Röntgenkontrastmitteln. Im Gegensatz dazu wird das Kontrastmittel **PL-D₄-PS₁-38** deutlich besser renal eliminiert. Aber auch hier befinden sich nach 24 h noch rund 6 % der verabreichten Dosis in den Nieren, die vermutlich auf die Anwesenheit synthetisch bedingter höhermolekularer Spezies zurückzuführen sind. Da diese drei Polylysinderivate dieselbe radiopake Gruppe besitzen, sollten Substituenteneffekte als Ursache für die gefundenen Unterschiede auszuschließen und die Molmasse der vorliegenden Spezies für die bessere Eliminierung verantwortlich sein. Das radiopake Polylysinderivat **PL-D₄-PS₁-38** mit der kleinsten Molmasse von $M_w = 27000$ g/mol wird am besten renal eliminiert. Umgekehrt findet man bei dem radiopaken Polylysinderivat **PL-D₄-PS₂-62** mit der größten Molmasse von $M_w = 58700$ g/mol auch die geringste renale Eliminierung. Die radiopaken Polylysine verhalten sich somit in Lösung ähnlich den normalen, körpereigenen Proteinen. Deren Obergrenze für die glomeruläre Filtration liegt bei einer Molmasse von etwa 70000 g/mol^[82], der Molmasse der Serumalbumine.

Die prinzipielle Eignung radiopaker Dendrimere zum Einsatz in der Röntgendiagnostik konnte in dieser Arbeit deutlich gezeigt werden. Alle untersuchten Verbindungen erfüllen die in bezug auf die Viskosität und Osmolalität gestellten Anforderungen. Erstmals gelang mit der Verbindung **Dendr-(RR 5)₆₄** die Synthese eines vollständig ausscheidbaren Vertreters dieser Substanzklasse. Vermutlich ist hierfür die Erhöhung der Anzahl freier Hydroxygruppen in der Peripherie der Dendrimere verantwortlich. Gegenüber den zuvor bei der *Schering AG* synthetisierten Verbindungen wurde die Anzahl der Hydroxygruppen verdoppelt. Ebenso gelang es, die Verträglichkeit der auf POPAM-Grundgerüsten basierenden dendritischen Röntgenkontrastmittel, insbesondere diejenige der Substanz **Dendr-(RR 1)₆₄**, gegenüber früheren Ansätzen drastisch zu erhöhen. Die Anwesenheit zusätzlicher Ethergruppen könnte dafür verantwortlich sein, wenngleich die vorliegenden Daten für einen Beweis nicht ausreichen.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeines

Chemikalien

Die im Rahmen der Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen Chemikalien wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Alle verwendeten Lösemittel waren von p.a. Qualität. 5-Amino-2,4,6-triiodisophthalsäure (Iodamsäure) **1** wurde aus dem Produktionsbetrieb der *Schering AG*, Berlin erhalten. 5-Amino-2,4,6-triiodisophthalsäurechlorid (Iodamsäuredichlorid) **2** wurden nach einer Vorschrift der *Schering AG* aus **1** synthetisiert. **3a** und **4a** wurden nach einer Vorschrift von Ranganathan et al.^[83] erhalten. 2,3-*O*-Isopropylidenglycerol-1-mesylat **22**^[84] und 1-*N*-Benzylamino-2,3-*O*-Isopropyliden-glycerol **23**^[59] wurden entsprechend der Literaturvorschrift hergestellt.

Analytik

Die Charakterisierung der Verbindungen erfolgte mittels ¹H-NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie. Schmelzpunkte, Glastemperatur und Elementaranalysen sind nur für die radiopaken Dendrimere bestimmt worden.

Sämtliche kernresonanzspektroskopischen und massenspektrometrischen Untersuchungen wurden in der Abteilung „Strukturanalyse“ der *Schering AG* durchgeführt. Die ¹H-NMR-Spektren wurden bei 297 K mit den Geräten AC 300 bzw. AC 400 (Fa. Bruker, Karlsruhe) aufgenommen. Dabei wurde auf das Protonensignal des zugefügten internen Standards TMS kalibriert ($\delta = 0$ ppm) oder es erfolgte eine Kalibrierung auf die Protonensignale des undeuterten Anteils des eingesetzten Lösungsmittels (Referenzwerte: $\delta = 7,24$ ppm ([D₁] CDCl₃), $\delta = 2,49$ ppm ([D₆] DMSO), $\delta = 4,65$ ppm ([D₂] D₂O), $\delta = 3,35$ und $4,78$ ppm ([D₃] CD₃OD))^[85].

FAB-Massenspektren wurden in einer Glycerin-Matrix auf dem Gerät VG-ZAB-E der Firma Micromass, Manchester, gemessen. Zur Ionisierung wurde die Probe mit Cs-Atomen (70 eV) beschossen. Die Messung der EI- und CI-Massenspektren wurde auf einem Autospec

Spektrometer der Firma Fisons Instruments, Manchester, vorgenommen. Die Ionisierungsenergie betrug im Falle der EI-Massenspektrometrie 70 eV. Zur chemischen Ionisation (CI) wurde mit NH_4^+ einer Energie von 70 eV gearbeitet.

Mit dem Gerät Micromas Platform LCZ der Firma Micromass, Manchester, wurden ESI-Massenspektren erhalten. (Quellentemperatur: 100°C, Desolvation Temperatur: 150°C, Gasfluß: 450 l/h, Cone: 20). Die Messung von MALDI-TOF-Massenspektren wurde mit einem VG ToFSpec Spektrometer der Fa. Fisons Instruments mit einem N_2 -Laser der Wellenlänge $\lambda_0 = 337 \text{ nm}$ durchgeführt.

Die IR-spektroskopischen Untersuchungen der dendritischen Röntgenkontrastmittel wurden an der TU Berlin mit einem Gerät des Typs Spectrum One der Fa. Perkin Elmer, Rodgau, durchgeführt. Die Bestimmung der Glasübergangstemperatur erfolgte ebenfalls an der TU Berlin mit Hilfe des Geräts DSC-7 der Fa. Perkin Elmer, die Heiz- und Kühlrate betrug jeweils 10 K/min.

Die Elementaranalysen der dendritischen Röntgenkontrastmittel sowie die Bestimmung des jeweiligen Wassergehalts der Proben wurden im Analysenzentrum der *Schering AG* durchgeführt.

Die bei der statischen und dynamischen Lichtstreuung, der Gelpermeationschromatographie, der Viskosimetrie, der Densitometrie, der Gelelektrophorese und Isoelektrischen Fokussierung eingesetzten Geräte und Lösemittel wurden bereits in den vorangehenden Kapiteln ausführlich besprochen.

Herstellung der Gele für die Elektrophorese

Die in der Gelelektrophorese eingesetzten Gele wurden an der TU Berlin nach folgender Vorschrift hergestellt:

Die Trenngelmischung setzt sich aus 15 ml Acrylamid (30 %)/Bis (0,8 %) (Fa. Biometra, Göttingen), 7,5 ml 1,5 M Tris/Cl-Puffer (Tris \equiv Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg) mit einem pH-Wert von 8,8 sowie 0,3 ml 10 %-ige SDS-Lösung (Fa. Fluka Chemie, Neu-Ulm) und 7,2 ml bidest. Wasser zusammen. Nach der Zugabe von 300 μl 10 %-iger Ammoniumpersulfatlösung (Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg) und 30 μl *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (TEMED, Fa. Merck, Darmstadt) wird die

Copolymerisation gestartet. Nach 10 min ist die Polymerisation abgeschlossen, so dass die Kämme für die Probestaschen des Sammelgels eingesetzt werden können.

Die Sammelgelmischung besteht aus 1,67 ml Acrylamid (30 %)/Bis (0,8 %), 2,5 ml 0,5 M Tris/Cl-Puffer mit einem pH-Wert von 6,8 sowie 0,1 ml 10 %-ige SDS-Lösung und 5,73 ml bidest. Wasser. Die Copolymerisation der Sammelgelmischung wird durch die Zugabe von 100 µl 10 %-iger Ammoniumpersulfatlösung und 10 µl TEMED gestartet.

Die oben beschriebenen Ansatzgrößen reichen für 5 Gele bei Verwendung des Hoefer-MinigelsystemsTM (Fa. Hoeffer Scientific Instruments, San Francisco). Die Gele werden anschließend in Folie gewickelt und im Kühlschrank gelagert. Sie sollten baldmöglichst verwendet werden.

5.2 Synthese der radiopaken Reste

Die Synthese der Triiodaromaten erfolgte unter Beachtung der in Kapitel 3.2.2.2 erläuterten Gesichtspunkten. Daher ist der Syntheseablauf bei vielen der genannten Verbindungen gleich. Diese häufig wiederkehrenden, grundlegenden Syntheseschritte sind im Folgenden als allgemeine Arbeitsvorschriften angegeben. In der Einzelbeschreibung der entsprechend diesen Vorschriften synthetisierten Verbindungen sind daher nur die Ansatzgrößen, eventuelle Abweichungen von den allgemeinen Synthesevorschriften, sowie die Ausbeuten angegeben.

Die Substanzen wurden größtenteils durch Säulenchromatographie an Kieselgel 60 (0,063-0,200 mm (Fa. Merck, Darmstadt) gereinigt. Die detaillierten Bedingungen hierzu sind unter den jeweiligen Vorschriften zu finden. Für die Dünnschichtchromatographie wurden DC-Platten des Typs Kieselgel 60 F₂₅₄ der Fa. Merck, Darmstadt, benutzt. Neben den gemessenen R_F-Werten sind die Laufmittelbedingungen in Klammer angegeben.

Die zur Aufreinigung der dendritischen Röntgenkontrastmittel benutzte Ultrafiltrationsanlage der Firma Millipore Corporation, Bedford Massachusetts, basiert auf dem MinitanTM Ultrafiltration System mit dem Easy Load[®] Pumpenkopf. Zum Einsatz kamen MinitanTM-Platten aus regenerierter Cellulose mit einem cut-off bei 10000 g/mol (Lot.-Nr. ROBN 23490).

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Alkylierung an der 5-Amidogruppe der Triiodaromaten (AAV 1)

Zur Alkylierung an der 5-Amidogruppe der Triiodaromaten werden diese in DMF gelöst. Anschließend wird ein kleiner Überschuß des Alkylierungsmittel (1,2 - 1,5 Äq.) Bromessigsäureethyl- oder Bromessigsäure-*tert*-butylester sowie dessen äquimolare Menge Kaliumcarbonat zugefügt und der Ansatz mehrere Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf wird via DC überwacht. Zur Beseitigung des entstandenen, unlöslichen KBr wird über eine G4-Fritte filtriert und die klare Lösung im Vakuum eingengt. Die weitere Aufreinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur hydrolytischen Spaltung der *tert*-Butylestergruppen (AAV 2)

Für die hydrolytischen Spaltung der *tert*-Butylester-Gruppen werden die Triiodaromaten bei Raumtemperatur in 50 ml Dichlormethan gelöst und anschließend mit 25 ml Trifluoressigsäure versetzt. Die Reaktionskontrolle erfolgt via DC. Nach dem Reaktionsende wird das Lösemittel im Vakuum entfernt. Zur Beseitigung von Trifluoressigsäure-Resten wird der Rückstand insgesamt dreimal mit ca. 40 ml Toluol versetzt und jeweils vollständig eingengt. Das Produkt wird im Ölpumpenvakuum getrocknet und ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Überführung einer Carbonsäure in das korrespondierende Carbonsäurechlorid (AAV 3)

Eine Lösung der Triiodverbindung in Dichlormethan wird bei 0°C mit einem 1,2 - 1,5 fachen Überschuß Oxalylchlorid und 10 Tropfen DMF als Katalysator versetzt. Anschließend wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt und einige Stunden gerührt. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt, das Rohprodukt mehrmals mit ca. 40 ml Toluol zur Beseitigung eventuell vorhandener Oxalylchlorid-Reste versetzt und erneut am Rotationsverdampfer vollständig eingengt. Das Produkt wird abschließend im Ölpumpenvakuum getrocknet und ohne weitere Reinigung gemäß der nachfolgenden *AAV 4* umgesetzt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Derivatisierung der POPAM-Dendrimere mit den aktivierten, geschützten Triiodaromaten. Spaltung der Acetylschutzgruppen und Aufreinigung der Produkte durch Ultrafiltration (AAV 4)

Zur Synthese der radiopaken Dendrimere werden 1 Äq. des POPAM-Dendrimers DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄ in einem Lösemittelgemisch, bestehend aus ca. 10 ml DMF und wahlweise 40 - 50 ml THF oder Dichlormethan sowie 192 Äq. DIPEA, bei 0°C vorgelegt. Nun wird langsam eine Lösung von 96 Äq. des gemäß *AAV 3* als Carbonsäurechlorid aktivierten Triiodaromaten in 30 - 40 ml THF oder wahlweise auch Dichlormethan hinzugefügt. Der Ansatz wird nach der vollständigen Zugabe des Säurechlorids langsam auf Raumtemperatur gebracht und mehrere Tage gerührt.

Anschließend wird die Suspension zur Beseitigung des Diisopropylethylamin-Hydrochlorids filtriert und am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wird in etwas Methanol oder wahlweise auch Ethanol aufgenommen. Durch die Zugabe von 672 Äq. einer 2 N NaOH-Lösung werden die Acetyl- und Ethylesterschutzgruppen bei Raumtemperatur und mehrstündigem Rühren abgespalten. Die Lösung wird mit 2 N HCl-Lösung neutralisiert, filtriert (Nitrocellulosemembran, Porengröße 0,1 µm (Fa. Millipore)) und auf ein Volumen von etwa 2 l verdünnt. Anschließend wird bis zu einer Leitfähigkeit < 10 µS ultrafiltriert und das Retentat gefriergetrocknet.

5-Amino-N,N'-bis(2,3-dihydroxypropyl)-2,4,6-triod-N,N'-dimethyl-isophthalamid (**3b**)

78,12 g (0,74 mol) 1-Methylaminopropan-2,3-diol und 103 ml (0,74 mol) NEt_3 werden in 120 ml DMF vorgelegt. Unter Eiskühlung wird anschließend eine Lösung von 201,20 g (0,34 mol) Iodamsäuredichlorid (**2**) in 750 ml DMF zugetropft und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf wird mittels DC überwacht. Durch Filtration wird der Hydrochlorid-Niederschlag entfernt, die rote Lösung am Rotationsverdampfer eingeeengt und das rote ölige Rohprodukt ohne weitere Reinigung zu **4b** umgesetzt.

Essigsäure-1-acetoxymethyl-2-({3-amino-5-[(2,3-diacetoxypropyl)-methyl-carbamoyl]-2,4,6-triiodbenzoyl}-methyl-amino)-ethylester (**4b**)

Das Rohprodukt **3b** (0,34 mol) wird mit 180 ml (2,23 mol) Pyridin und 211 ml (2,23 mol) Essigsäureanhydrid versetzt und 5 h refluxiert. Nach dem Abkühlen wird die rotbraune Lösung in 1 l eisgekühlte 10 %-ige HCl gegossen und viermal mit 500 ml Essigsäure-ethylester (EtOAc) extrahiert. Dabei ist eine Phasenumkehr zu beobachten, die organische Phase besitzt die höhere Dichte. Anschließend wird die wässrige Phase dreimal mit je 250 ml EtOAc zurück extrahiert. Nach dem Trocknen der vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Aus dem rotbraunen Öl kristallisiert ein Teil des Produktes aus. Durch Umkristallisation aus Isopropanol werden zwei kristalline Produkte K1 (52,20 g, 0,06 mol, 17 %) und K2 (22,80 g, 0,03 mol, 8 %) erhalten, der größte Teil des Produktes befindet sich allerdings noch in der Mutterlauge und wird durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (EtOAc/Hexan 3:1) gewonnen. Die Gesamtausbeute beträgt 183,24 g (0,20 mol, 60 %) **4b** ($R_f = 0,13$ in EtOAc/Hexan 3:1).

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO): δ [ppm] = 2,05 [s, 12H, OC(O)CH_3], 2,80 [s, 6H, $\text{N(CH}_3\text{)CH}_2$], 3,58 [m, 2H, $\text{N(CH}_3\text{)CH}_2$], 3,73 [m, 2H, $\text{N(CH}_3\text{)CH}_2$], 4,20 [m, 2H, CHCH_2OAc], 4,39 [m, 2H, CHCH_2OAc], 5,29 [m, 2H, CH(OAc)CH_2], 5,65 [s, 2H, ArNH_2].

FAB-MS (m/z (%)): 902 (89) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 842 (65) $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}]^+$, 776 (13) $[\text{M}-\text{I}]^+$.

(*tert*-Butoxycarbonylmethoxy)essigsäure (5)

Die Synthese des mono-*tert*-Butylesters der Diglykolsäure erfolgt in Anlehnung an eine Literaturvorschrift von Greenwald^[86]. 60,37 g (0,52 mol) Diglykolsäureanhydrid und 6,45 g (0,05 mol) DMAP werden 16 h in 200 ml (2,10 mol) *tert*-Butanol refluxiert. Das Lösemittel wird im Vakuum beseitigt und das ölige Rohprodukt in Dichlormethan aufgenommen. Mit einer 1 M NaHSO₄-Lösung wird extrahiert und die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet. 77,20 g (0,41 mol, 78 %) (*tert*-Butoxycarbonylmethoxy)essigsäure (**5**) werden als blaßgelbes Öl erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 1,50 [s, 9H, OC(CH₃)₃], 4,13 [s, 2H, OCH₂C(O)], 4,27 [s, 2H, OCH₂C(O)], 10,11 [br, 1H, COOH].

CI-MS (m/z (%)): 208 (100) [M+NH₄⁺]⁺, 191 (22) [M⁺+H]⁺, 152 (90) [M+NH₄-C₄H₉]⁺, 135 (4) [M-C₄H₉]⁺.

(Chlorcarbonylmethoxy)-essigsäure-*tert*-butylester (6)

9,30 ml (110 mmol) Oxalylchlorid werden bei 0°C in 30 ml Dichlormethan gelöst und langsam zu einer Lösung von 17,47 g (92 mmol) (*tert*-Butoxycarbonylmethoxy)essigsäure (**5**) in 20 ml Dichlormethan gegeben. Nach Zusatz von 10 Tropfen DMF wird 2,5 h gerührt und das Rohprodukt anschließend ohne Aufarbeitung umgesetzt.

{[3,5-Bis-(2,3-diacetoxy-propylcarbamoyl)-2,4,6-triiod-phenylcarbamoyl]-methoxy}-essigsäure-*tert*-butylester (**7a**)

Eine Lösung aus 40,22 g (46 mmol) **4a** in 100 ml DMA wird bei 0°C zu dem Rohprodukt von (Chlorcarbonylmethoxy)-essigsäure-*tert*-butylester (**6**) (92 mmol) gegeben. Danach wird 2 h im Eisbad und weitere 36 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösemittelgemisch im Vakuum entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung des gelben, öligen Rohprodukts an Kieselgel (EtOAc/Hexan 4:1) ergibt 32,80 g (31 mmol, 34 %) **7a** in Form eines blassgelben kristallinen Feststoffs ($R_f = 0,12$ in EtOAc/Hexan 3:1).

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO): δ [ppm] = 1,46 [s, 9H, OC(CH₃)₃], 2,05 [s, 12H, OC(O)CH₃], 3,47 [m, 4H, NHCH₂CH], 4,20 [d, 6H, (O)CCH₂OCH₂C(O), CHCH₂OAc], 4,33 [m, 2H, CHCH₂OAc], 5,11 [m, 2H, CH(OAc)CH₂], 8,80 [m, 1H, ArC(O)NH], 8,93 [m, 1H, ArC(O)NH], 10,06 [s, 1H, ArNHC(O)].

ESI-MS (m/z (%)): 1046 (64) [M+H]⁺, 990 (57) [M-C₄H₉]⁺.

{[3,5-Bis[2,3-diacetoxypropyl]-methyl-carbamoyl]-2,4,6-triiod-phenylcarbamoyl}-methoxy}-essigsäure-*tert*-butylester (**7b**)

Eine Lösung aus 15,28 g (81 mmol) **5** in 200 ml DMA wird im Eisbad auf 0°C gekühlt und langsam mit 6,85 ml (81 mmol) Oxalylchlorid versetzt. Sodann wird 3 h im Eisbad gerührt und anschließend portionsweise 31,20 g (35 mmol) **4b** zugegeben. Nach langsamen Erwärmen auf Raumtemperatur rührt der Ansatz 48 h. Danach wird das Lösemittel im Vakuum beseitigt, das gelbe ölige Rohprodukt in 150 ml EtOAc gelöst und viermal mit je 50 ml 1 M NaHCO₃-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und eingengt. Nach der chromatographischen Reinigung an Kieselgel (EtOAc/Hexan 4:1) verbleiben 15,54 g (15 mmol, 41 %) **7b** als gelber Feststoff ($R_f = 0,15$ in EtOAc/Hexan 4:1).

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO): δ [ppm] = 1,47 [s, 9H, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$], 2,06 [s, 12H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$], 2,81 [d, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$], 3,69 [m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$], 4,21 [m, 6H, $(\text{O})\text{CCH}_2\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})$, CHCH_2OAc], 4,49 [m, 2H, CHCH_2OAc], 5,30 [m, 2H, CHCH_2OAc], 10,06 [s, 1H, $\text{ArNHC}(\text{O})$].

FAB-MS (m/z (%)): 1074 (15) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1018 (100) $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9]^+$, 958 (91) $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$.

{[3,5-Bis-(2,3-diacetoxy-propylcarbamoyle)-2,4,6-triiod-phenyl]-(2-*tert*-butoxycarbonyl-methoxy-acetyl)-amino}-essigsäure-ethylester (**8a**)

Die Alkylierung von 32,84 g (31 mmol) **7a** gelöst in 30 ml DMF erfolgt gemäß *AAV 1* mit 5,21 g (38 mmol) K_2CO_3 und 4,17 ml (38 mmol) Bromessigsäureethylester. Das Rohprodukt wird chromatographisch an Kieselgel gereinigt (EtOAc/Hexan 1:1). Es werden 20,10 g (18 mmol, 57 %) **8a** erhalten ($R_f = 0,16$ in EtOAc/Hexan 3:1).

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO): δ [ppm] = 1,21 [d, 3H, OCH_2CH_3], 1,41 [s, 9H, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$], 2,05 [s, 12H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$], 3,51 [m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$], 3,83 [m, 2H, $\text{ArNCH}_2\text{C}(\text{O})$], 4,10 [m, 9H, $(\text{O})\text{CCH}_2\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})$, CHCH_2OAc , OCH_2CH_3], 4,32 [m, 2H, CHCH_2OAc], 5,09 [m, 2H, CHCH_2OAc], 8,78 [m, 2H, $\text{ArC}(\text{O})\text{NH}$].

ESI-MS (m/z (%)): 1153 (22) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1132 (65) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1076 (100) $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9]^+$, 949 (5) $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9-\text{I}]^+$.

{[3,5-Bis-[(2,3-diacetoxy-propyl)-methyl-carbamoyl]-2,4,6-triiod-phenyl]-(2-tert-butoxycarbonylmethoxy-acetyl)-amino}-essigsäureethylester (**8b**)

Die Alkylierung von 15,54 g (15 mmol) **7b** in 100 ml DMF mit 2,1 ml (19 mmol) Bromessigsäureethylester und 2,61 g (19 mmol) K₂CO₃ erfolgt nach *AAV 1*. Der Ansatz rührt 10 h bei 40°C und wird danach aufgearbeitet. Die säulenchromatographische Reinigung des gelben öligen Rückstands an Kieselgel (EtOAc/Hexan 3:1) ergibt 13,25 g (11 mmol, 79 %) des blaßgelben Feststoffs **8b** (R_f = 0,59 in EtOAc).

¹H-NMR (d₆-DMSO): δ [ppm] = 1,22 [t, 3H, OCH₂CH₃], 1,40 [s, 9H, OC(CH₃)₃], 2,06 [s, 12H, OC(O)CH₃], 2,82 [m, 6H, N(CH₃)CH₂], 3,68 [m, 4H, N(CH₃)CH₂], 3,90 [m, 2H, ArNCH₂C(O)], 4,14 [m, 8H, (O)CCH₂OCH₂C(O), OCH₂CH₃, CHCH₂OAc], 4,39 [m, 2H, CHCH₂OAc], 5,29 [m, 2H, CH(OAc)CH₂].

ESI-MS (m/z (%)): 1182 (25) [M+Na]⁺, 1160 (100) [M+H]⁺, 1104 (84) [M-C₄H₉]⁺.

{[3,5-Bis-(2,3-diacetoxy-propylcarbamoyl)-2,4,6-triiod-phenyl]-(2-carboxymethoxy-acetyl)-amino}-essigsäure-ethylester (**9a**)

Die hydrolytische Spaltung der *tert*-Butylestergruppen der Verbindung **8a** erfolgt entsprechend *AAV 2*. Hierbei werden 11,04 g (10 mmol) Ausgangsmaterial eingesetzt und für 14 h in Dichlormethan mit TFA behandelt. Nach der Aufarbeitung werden 11,10 g (10 mmol, 100 %) **9a** als farbloser Feststoff erhalten (R_f = 0,72 in MeOH).

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 1,28 [t, 3H, OCH₂CH₃], 2,11 [s, 12H, OC(O)CH₃], 3,62 [m, 2H, NHCH₂CH], 3,81 [m, 2H, NHCH₂CH], 4,00 [s, 2H, ArNCH₂C(O)], 4,21 [m, 8H, (O)CCH₂OCH₂C(O), OCH₂CH₃, CHCH₂OAc], 4,43 [m, 2H, CHCH₂OAc], 5,26 [m, 2H, CH(OAc)CH₂], 8,30 [br, 2H, ArC(O)NH].

FAB-MS (m/z (%)): 1076 (100) [M+H]⁺, 1016 (10) [M-C₂H₄O₂]⁺, 950 (15) [M-I]⁺.

[[3,5-Bis-[(2,3-diacetoxy-propyl)-methyl-carbamoyl]-2,4,6-triiod-phenyl]-(2-carboxymethoxy-acetyl)-amino]-essigsäureethylester (**9b**)

Nach *AAV* 2 werden 13,25 g (11 mmol) **8b** in Dichlormethan/TFA 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Aufarbeitung verbleiben 14,10 g (11 mmol, 100 %) **9b** ($R_f = 0,58$ in MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 1,29 [t, 3H, OCH_2CH_3], 2,10 [s, 12H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$], 2,97 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$], 3,49 [m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$], 4,15 [m, 10H, $(\text{O})\text{CCH}_2\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})$, OCH_2CH_3 , $\text{ArNCH}_2\text{C}(\text{O})$, CHCH_2OAc], 4,48 [m, 2H, CHCH_2OAc], 5,46 [m, 2H, $\text{CH}(\text{OAc})\text{CH}_2$], 9,63 [br, 1H, COOH].

FAB-MS (m/z (%)): 1104 (37) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1044 (6) $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$, 978 (13) $[\text{M}-\text{I}]^+$, 852 (3) $[\text{M}-2\text{I}]^+$.

[[3,5-Bis-(2,3-diacetoxy-propylcarbamoyl)-2,4,6-triiod-phenyl]-(2-chlorcarbonylmethoxy-acetyl)-amino]-essigsäureethylester (**10a**)

Gemäß *AAV* 3 werden 11,10 g (9,8 mmol) **9a** gelöst in 100 ml Dichlormethan mit Hilfe von 1,10 ml (13,7 mmol) Oxalylchlorid und 10 Tropfen DMF in das korrespondierende Carbonsäurechlorid überführt. Dazu wird eine Stunde im Eisbad und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Aufarbeitung verbleiben 10,62 g (9,7 mmol, 99 %) **10a** als farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 1,26 [t, 3H, OCH_2CH_3], 2,09 [s, 12H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$], 3,61 [m, 2H, NHCH_2CH], 3,81 [m, 2H, NHCH_2CH], 3,98 [s, 2H, $\text{ArNCH}_2\text{C}(\text{O})$], 4,21 [m, 8H, $(\text{O})\text{CCH}_2\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})$, OCH_2CH_3 , CHCH_2OAc], 4,42 [m, 2H, CHCH_2OAc], 5,25 [m, 2H, $\text{CH}(\text{OAc})\text{CH}_2$], 7,29 [m, 2H, $\text{ArC}(\text{O})\text{NH}$].

{[3,5-Bis-[(2,3-diacetoxy-propyl)-methyl-carbamoyl]-2,4,6-triiod-phenyl]-(2-chlorocarbonylmethoxy-acetyl)-amino}-essigsäureethylester (**10b**)

14,10 g (13,0 mmol) **9b** werden in 75 ml Dichlormethan gelöst und mit 1,18 ml (13,7 mmol) Oxalylchlorid und 10 Tropfen DMF entsprechend der *AAV* 3 in das Säurechlorid überführt. Der Ansatz rührt eine Stunde im Eisbad bei 0°C, danach 12 h bei Raumtemperatur. Nach der Aufarbeitung verbleiben 13,20 g (11,0 mmol, 89 %) **10b** als gelber kristalliner Feststoff.

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 1,27 [t, 3H, OCH₂CH₃], 2,10 [s, 12H, OC(O)CH₃], 2,98 [s, 6H, N(CH₃)CH₂], 3,49 [m, 4H, N(CH₃)CH₂], 4,16 [m, 10H, (O)CCH₂OCH₂C(O), OCH₂CH₃, ArNCH₂C(O), CHCH₂OAc], 4,49 [m, 2H, CHCH₂OAc], 5,44 [m, 2H, CH(OAc)CH₂].

Ethoxycarbonylmethoxy-essigsäure (**11**)

In Analogie zu der von Okada et al. ^[87] beschriebenen Synthese wird der Monoethylester der Diglykolsäure synthetisiert. Dazu werden 45,14 g (0,35 mol) Diglykolsäureanhydrid mit 20,40 ml (0,35 mol) abs. Ethanol versetzt, 2 h refluxiert und anschließend 10 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Trocknen des blassgelben öligen Produkts werden 57,70 g (0,35 mol, 100 %) **11** erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 1,30 [t, 3H, OCH₂CH₃], 4,28 [m, 6H, (O)CCH₂OCH₂C(O), OCH₂CH₃], 9,36 [s, 1H, COOH].

EI-MS (m/z (%)): 163 (100) [M+H]⁺, 117 (54) [M-C₂H₆O]⁺.

(Chlorcarbonylmethoxy)-essigsäureethylester (12)

38,10 ml (0,53 mol) Thionylchlorid werden langsam zu 57,70 g (0,35 mol) **11** getropft und der Ansatz 5 h refluxiert. Das überschüssige Thionylchlorid wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt durch Destillation gereinigt (Sdp.: 64-69°C/0,1 mbar). Die Umsetzung ergibt 59,00 g (0,33 mol, 93 %) **12**.

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 1,30 [t, 3H, OCH₂CH₃], 4,25 [m, 6H, (O)CCH₂OCH₂C(O), OCH₂CH₃].

{[3,5-Bis-(2,3-diacetoxy-propylcarbamoyl)-2,4,6-triiod-phenylcarbamoyl]-methoxy}-essigsäureethylester (13a)

Bei 0°C werden 8,60 ml (102 mmol) Oxalylchlorid in 30 ml Dichlormethan gelöst und langsam eine Lösung von 16,54 g (102 mmol) **11** hinzu zugetropft. Nach der Zugabe von 10 Tropfen DMF wird erst 3 h im Eisbad gerührt und dann zu dem Rohprodukt **12** eine Lösung von 44,53 g (51 mmol) **4a** in 100 ml DMF gegeben. Der Ansatz rührt 48 h bei RT und wird durch DC überwacht. Am Rotationsverdampfer wird das Lösemittelgemisch entfernt und das Rohprodukt chromatographisch an Kieselgel gereinigt (EtOAc/Hexan 1:1). Es werden 37,18 g (36 mmol, 71 %) **13a** erhalten (R_f = 0,08 in EtOAc/Hexan 3:1).

¹H-NMR (d₆-DMSO): δ [ppm] = 1,22 [t, 3H, OCH₂CH₃], 2,04 [s, 12 H, OC(O)CH₃], 3,48 [m, 4H, NHCH₂], 4,16 [m, 6H, OCH₂CH₃, CHCH₂OAc], 4,32 [d, 4H, C(O)CH₂OCH₂C(O)], 5,10 [m, 2H, CH₂(OAc)], 8,78 [m, 1H, ArC(O)NH], 8,93 [m, 1H, ArC(O)NH], 10,07 [s, 1H, ArNHC(O)].

ESI-MS (m/z (%)): 1018 (100) [M+H]⁺.

{[3,5-Bis-[(2,3-diacetoxy-propyl)-methyl-carbamoyl]-2,4,6-triiod-phenylcarbamoyl]-methoxy}-essigsäureethylester (**13b**)

In 100 ml Dichlormethan werden 12,00 g (67 mmol) **12** gelöst und bei 0°C eine Lösung aus 40,00 g (44 mmol) **4b** in 100 ml DMF dazu getropft und 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Lösung im Vakuum eingeeengt, der Rückstand in etwas EtOAc aufgenommen und chromatographisch an Kieselgel gereinigt (EtOAc/Hexan 2:1 bis EtOAc/Hexan 3:1). Die Ausbeute beträgt 15,28 g (14,6 mmol, 33 %) **13b** ($R_f = 0,04$ in EtOAc/Hexan 3:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 1,31 [t, 3H, OCH_2CH_3], 2,09 [m, 12H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$], 2,94 [m, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$], 3,46 [m, 2H, $\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$], 4,11 [m, 2H, $\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$], 4,29 [m, 8H, OCH_2CH_3 , $(\text{O})\text{CCH}_2\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})$, CHCH_2OAc], 4,51 [m, 2H, CHCH_2OAc], 5,45 [m, 2H, $\text{CH}(\text{OAc})\text{CH}_2$], 8,80 [d, 1H, $\text{ArNHC}(\text{O})$].

ESI-MS (m/z (%)): 1046 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

{[3,5-Bis-(2,3-diacetoxy-propylcarbamoyl)-2,4,6-triiod-phenyl]-2-(ethoxycarbonyl-methoxy-acetyl)-amino}-essigsäure-*tert*-butylester (**14a**)

Entsprechend *AAV 1* werden 37,18 g (36 mmol) **13a** mit 7,60 g (55 mmol) K_2CO_3 und 8,10 ml (55 mmol) Bromessigsäure-*tert*-butylester 48 h bei 40°C umgesetzt. Das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (EtOAc/Hexan 1:1 bis EtOAc/Hexan 3:1). Die Ausbeute beträgt 27,36 g (25 mmol, 67 %) **14a** ($R_f = 0,18$ in EtOAc/Hexan 3:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 1,26 [t, 3H, OCH_2CH_3], 1,47 [s, 9H, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$], 2,10 [s, 12H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$], 3,70 [m, 4H, $\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2$], 4,15 [m, 10H, $\text{ArNCH}_2\text{C}(\text{O})$, OCH_2CH_3 , $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})$, CHCH_2OAc], 4,40 [m, 2H, CHCH_2OAc], 5,24 [m, 2H, $\text{CH}(\text{OAc})\text{CH}_2$], 6,28 [br, 1H, $\text{ArC}(\text{O})\text{NH}$], 7,15 [br, 1H, $\text{ArC}(\text{O})\text{NH}$].

ESI-MS (m/z (%)): 1132 (100) [M+H]⁺, 1076 (24) [M-C₄H₉]⁺.

[{3,5-Bis-[(2,3-diacetoxy-propyl)-methyl-carbamoyl]-2,4,6-triiod-phenyl}-(2-ethoxycarbonylmethoxy-acetyl)-amino]-essigsäure-*tert*-butylester (**14b**)

Eine Lösung von 15,28 g (15 mmol) **13b** in 40 ml DMF wird nacheinander mit 2,63 g (19 mmol) K₂CO₃ und 2,79 ml (19 mmol) Bromessigsäure-*tert*-butylester versetzt und 16 h gemäß *AAV 1* bei Raumtemperatur gerührt. Nach der chromatographischen Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (EtOAc/Hexan 3:1) beträgt die Ausbeute 9,25 g (8 mmol, 53 %) **14b** (R_f = 0,16 in EtOAc/Hexan 3:1).

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 1,27 [t, 3H, OCH₂CH₃], 1,46 [s, 9H, OC(CH₃)₃], 2,09 [m, 12H, OC(O)CH₃], 2,94 [d, 6H, N(CH₃)CH₂], 3,44 [m, 2H, N(CH₃)CH₂], 4,05 [m, 2H, N(CH₃)CH₂], 4,19 [m, 10H, ArNCH₂C(O), OCH₂CH₃, (O)CCH₂OCH₂C(O), CHCH₂OAc], 4,50 [m, 2H, CHCH₂OAc], 5,43 [m, 2H, CH(OAc)CH₂].

ESI-MS (m/z (%)): 1182 (8) [M+Na]⁺, 1160 (100) [M+H]⁺, 1104 (10) [M-C₄H₉]⁺, 1034 (2) [M-I]⁺.

[{3,5-Bis-(2,3-diacetoxy-propylcarbamoyl)-2,4,6-triiod-phenyl}-(2-ethoxycarbonylmethoxy-acetyl)-amino]-essigsäure (**15a**)

13,68 g (12 mmol) **14a** werden 14 h analog zu *AAV 2* in Dichlormethan/TFA gerührt und so in die korrespondierende Carbonsäure überführt. Die Ausbeute beträgt 14,20 g (12 mmol, 100 %) **15a** (R_f = 0,61 in MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO): δ [ppm] = 1,20 [t, 3H, OCH_2CH_3], 2,04 [s, 12H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$], 3,47 [m, 4H, $\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2$], 3,95 [s, 2H, $\text{ArNCH}_2\text{C}(\text{O})$], 4,11 [m, 8H, OCH_2CH_3 , $(\text{O})\text{CCH}_2\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})$, CHCH_2OAc], 4,32 [m, 2H, CHCH_2OAc], 5,10 [m, 2H, $\text{CH}(\text{OAc})\text{CH}_2$], 8,72 [m, 2H, $\text{ArC}(\text{O})\text{NH}$].

FAB-MS: (m/z (%)): 1076 (52) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 950 (10) $[\text{M}-\text{I}]^+$.

[{3,5-Bis-(2,3-diacetoxy-propyl)-methyl-carbamoyl]-2,4,6-triiod-phenyl}-(2-ethoxycarbonylmethoxy-acetyl)-amino]-essigsäure (**15b**)

Zur Spaltung der *tert*-Butylestergruppen werden 9,25 g (8 mmol) **14b** analog zu *AAV* 2 in Dichlormethan/TFA 16 h gerührt. Die Umsetzung ergibt 9,90 g (8 mmol, 100 %) des Produkts **15b** ($R_f = 0,63$ in MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 1,28 [t, 3H, OCH_2CH_3], 2,10 [s, 12H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$], 2,99 [d, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$], 3,48 [m, 2H, $\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$], 4,05 [m, 2H, $\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$], 4,21 [m, 8H, $\text{ArNCH}_2\text{C}(\text{O})$, OCH_2CH_3 , $(\text{O})\text{CCH}_2\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})$, CHCH_2OAc], 4,49 [m, 2H, CHCH_2OAc], 5,45 [m, 2H, $\text{CH}(\text{OAc})\text{CH}_2$].

ESI-MS (m/z (%)): 1126 (5) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1104 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

([{3,5-Bis-(2,3-diacetoxy-propylcarbamoyl)-2,4,6-triiod-phenyl]-chlorcarbonylmethyl-carbamoyl}-methoxy)-essigsäureethylester (**16a**)

Nach *AAV* 3 werden 14,20 g (12 mmol) der Carbonsäure **15a** in das korrespondierende Carbonsäurechlorid überführt. Als Produkt werden 13,31 g (12 mmol, 100 %) **16a** erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 1,25 [t, 3H, OCH_2CH_3], 2,10 [s, 12H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$], 3,60 [m, 2H, NHCH_2CH], 3,80 [m, 2H, NHCH_2CH], 4,13 [m, 10H, $\text{ArNCH}_2\text{C}(\text{O})$, $(\text{O})\text{CCH}_2\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})$, CHCH_2OAc , OCH_2CH_3], 4,41 [m, 2H, CHCH_2OAc], 5,24 [m, 2H, $\text{CH}(\text{OAc})\text{CH}_2$], 7,20 [m, 2H, $\text{ArC}(\text{O})\text{NH}$].

[[{3,5-Bis-[(2,3-diacetoxy-propyl)-methyl-carbamoyl]-2,4,6-triiod-phenyl]-chlorcarbonylmethyl-carbamoyl]-methoxy]-essigsäureethylester (**16b**)

9,90 g (8 mmol) **15b** werden 16 h mit 1,20 ml (13 mmol) Oxalylchlorid/10 Tropfen DMF gemäß *AAV* 3 behandelt. Nach der Aufarbeitung beträgt die Ausbeute 9,41 g (8 mmol, 100 %) **16b**.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 1,29 [t, 3H, OCH_2CH_3], 2,11 [s, 12H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$], 2,98 [d, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$], 3,51 [m, 2H, $\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$], 4,03 [m, 2H, $\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$], 4,23 [m, 8H, $\text{ArNCH}_2\text{C}(\text{O})$, OCH_2CH_3 , $(\text{O})\text{CCH}_2\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})$, CHCH_2OAc], 4,49 [m, 2H, CHCH_2OAc], 5,48 [m, 2H, $\text{CH}(\text{OAc})\text{CH}_2$].

N-[3,5-Bis-(2,3-diacetoxy-propylcarbamoyl)-2,4,6-triiod-phenyl]-bernsteinsäureethylester (**17a**)

Bei 0°C werden 11 ml (78 mmol) Bernsteinsäureethylesterchlorid zu einer Lösung von 33,00 g (38 mmol) **4a** in 250 ml DMF gegeben. Der Ansatz rührt 2 d bei Raumtemperatur dann wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird in 300 ml EtOAc aufgenommen, mehrmals mit einer 1 M NaHSO_4 -Lösung extrahiert und die organische Phase anschließend über Na_2SO_4 getrocknet. Die säulenchromatographische Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (EtOAc/Hexan 3:1) ergibt 20,55 g (21 mmol, 55 %) **17a** ($R_f = 0,08$ in EtOAc/Hexan 3:1).

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO): δ [ppm] = 1,19 [dt, 3H, OCH_2CH_3], 2,03 [s, 12H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$], 2,61 [m, 4H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$], 3,50 [m, 4H, NHCH_2CH], 4,06 [m, 2H, OCH_2CH_3], 4,20 [m, 2H, CHCH_2OAc], 4,32 [m, 2H, CHCH_2OAc], 5,10 [m, 2H, $\text{CH}(\text{OAc})\text{CH}_2$], 8,79 [m, 1H, $\text{ArC}(\text{O})\text{NH}$], 8,90 [m, 1H, $\text{ArC}(\text{O})\text{NH}$], 10,05 [s, 1H, $\text{ArNHC}(\text{O})$].

FAB-MS (m/z (%)): 1002 (15) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-{3,5-Bis-[(2,3-diacetoxy-propyl)-methyl-carbamoyl]-2,4,6-triiod-phenyl}-
bernsteinsäureethylester (**17b**)

Eine Lösung aus 52,70 g (59 mmol) **4b** in 250 ml DMF wird bei 0°C mit 10,85 ml (77 mmol) Bernsteinsäureethylesterchlorid versetzt und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen des Lösemittels bleibt ein blassgelbes öliges Produkt zurück, das chromatographisch an Kieselgel gereinigt wird (EtOAc/Hexan 2:1). Es werden 40,78 g (40 mmol, 68 %) **17b** erhalten ($R_f = 0,06$ in EtOAc/Hexan 4:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 1,26 [dt, 3H, OCH_2CH_3], 2,10 [d, 12H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$], 2,77 [m, 4H, $(\text{O})\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$], 2,95 [m, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$], 3,16 [m, 2H, $\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$], 3,45 [m, 2H, $\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$], 4,21 [m, 4H, CHCH_2OAc , OCH_2CH_3], 4,51 [m, 2H, CHCH_2OAc], 5,45 [m, 2H, $\text{CH}(\text{OAc})\text{CH}_2$], 8,20 [t, 1H, $\text{ArNHC}(\text{O})$].

FAB-MS (m/z (%)): 1030 (40) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 970 (27) $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$.

N-[3,5-Bis-(2,3-diacetoxy-propylcarbamoyl)-2,4,6-triiod-phenyl]-*N*-*tert*-butoxy-carbonylmethyl-bernsteinsäureethylester (**18a**)

Nach *AAV 1* werden 20,55 g (21 mmol) **17a** in 200 ml DMF gelöst und 3,19 g (23 mmol) K₂CO₃ hinzugefügt. Nach der Zugabe von 3,41 ml (23 mmol) Bromessigsäure-*tert*-butylester wird der Ansatz 2 d bei Raumtemperatur gerührt. Die chromatographische Reinigung des gelben Rohprodukts an Kieselgel (EtOAc/Hexan 3:1) ergibt 18,36 g (17 mmol, 81 %) **18a** (R_f = 0,2 in EtOAc/Hexan 3:1).

¹H-NMR (d₆-DMSO): δ [ppm] = 1,20 [t, 3H, OCH₂CH₃], 1,43 [s, 9H, OC(CH₃)₃], 2,04 [s, 12H, OC(O)CH₃], 2,29 [m, 2H, C(O)CH₂CH₂C(O)], 2,56 [m, 2H, C(O)CH₂CH₂C(O)], 3,53 [m, 4H, NCH₂CH], 3,87 [d, 2H, ArNCH₂C(O)], 4,04 [m, 2H, OCH₂CH₃], 4,19 [m, 2H, CHCH₂OAc], 4,33 [m, 2H, CH(OAc)CH₂], 5,11 [m, 2H, CHCH₂OAc], 8,72 [m, 1H, ArC(O)NH], 8,87 [m, 1H, ArC(O)NH].

ESI-MS (m/z (%)): 1116 (100) [M+H]⁺, 1060 (15) [M-C₄H₉]⁺.

N-{3,5-Bis-[(2,3-diacetoxy-propyl)-methyl-carbamoyl]-2,4,6-triiod-phenyl}-*N*-*tert*-butoxycarbonylmethyl-bernsteinsäureethylester (**18b**)

Die Alkylierung von 40,78 g (40 mmol) **17b** in 200 ml DMF erfolgt gemäß *AAV 1* mit 7,05 g (51 mmol) K₂CO₃ und 7,54 ml (51 mmol) Bromessigsäure-*tert*-butylester. Der Ansatz wird 2 d bei Raumtemperatur gerührt. Nach der säulenchromatographische Reinigung des gelblich öligen Rohprodukts an Kieselgel (EtOAc/Hexan 3:1) werden 40,94 g (36 mmol, 90 %) **18b** erhalten (R_f = 0,27 in EtOAc/Hexan 4:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 1,28 [dt, 3H, OCH_2CH_3], 1,46 [dd, 9H, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$], 2,10 [s, 12H, $\text{O}(\text{O})\text{CCH}_3$], 2,38 [m, 2H, $(\text{O})\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$], 2,64 [m, 2H, $(\text{O})\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$], 2,95 [m, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$], 3,48 [m, 2H, $\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$], 4,08 [m, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$, OCH_2CH_3 , $\text{ArNCH}_2\text{C}(\text{O})$], 4,24 [m, 2H, CHCH_2OAc], 4,51 [m, 2H, CHCH_2OAc], 5,44 [m, 2H, $\text{CH}(\text{OAc})\text{CH}_2$].

ESI-MS (m/z (%)): 1144 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1088 (42) $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9]^+$.

N-[3,5-Bis-(2,3-diacetoxy-propylcarbamoyl)-2,4,6-triod-phenyl]-*N*-carboxymethyl-bernsteinsäureethylester (**19a**)

Die hydrolytische Spaltung der tert-Butylester der Verbindung **18a** wird gemäß *AAV 2* durchgeführt. Hierzu werden 18,36 g (17 mmol) **18a** für die Dauer von 16 h in Dichlormethan mit TFA behandelt. Nach der Aufarbeitung beträgt die Ausbeute 17,90 g (17 mmol, 100 %) des schwach gelb gefärbten Produkts **19a** ($R_f = 0,70$ in MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 1,25 [t, 3H, OCH_2CH_3], 2,10 [s, 12H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$], 2,40 [m, 2H, $(\text{O})\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$], 2,63 [m, 2H, $(\text{O})\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$], 3,59 [m, 2H, NHCH_2CH], 3,81 [m, 2H, NHCH_2CH], 4,11 [m, 4H, OCH_2CH_3 , $\text{ArNCH}_2\text{C}(\text{O})$], 4,27 [m, 2H, CHCH_2OAc], 4,43 [m, 2H, CHCH_2OAc], 5,25 [m, 2H, $\text{CH}(\text{OAc})\text{CH}_2$], 6,92 [m, 1H, $\text{ArC}(\text{O})\text{NH}$], 7,56 [m, 1H, $\text{ArC}(\text{O})\text{NH}$], 8,56 [br, 1H, COOH].

FAB-MS (m/z (%)): 1060 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1014 (38) $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9]^+$, 934 (34) $[\text{M}-\text{I}]^+$, 806 (11) $[\text{M}-2\text{I}]^+$.

N-{3,5-Bis-[(2,3-diacetoxy-propyl)-methyl-carbamoyl]-2,4,6-triiod-phenyl}-*N*-carboxymethyl-bernsteinsäureethylester (**19b**)

Entsprechend *AAV* 2 werden 40,94 g (36 mmol) **18b**, gelöst in Dichlormethan, für die Dauer von 16 h mit TFA behandelt. Nach der Aufarbeitung verbleiben 39,10 g (36 mmol, 100 %) **19b** in Form eines blaugelben Feststoffs ($R_f = 0,74$ in MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 1,25 [dt, 3H, OCH_2CH_3], 2,11 [s, 12H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$], 2,65 [m, 4H, $(\text{O})\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$], 2,96 [m, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$], 3,49 [m, 2H, $\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$], 4,28 [m, 8H, $\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$, OCH_2CH_3 , $\text{ArNCH}_2\text{C}(\text{O})$, CHCH_2OAc], 4,50 [m, 2H, CHCH_2OAc], 5,45 [m, 2H, $\text{CH}(\text{OAc})\text{CH}_2$], 9,85 [br, 1H, COOH].

ESI-MS (m/z (%)): 1110 (5) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1088 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-[3,5-Bis-(2,3-diacetoxy-propylcarbamoyl)-2,4,6-triiod-phenyl]-*N*-chlorocarbonylmethyl-bernsteinsäureethylester (**20a**)

Wie bei *AAV* 3 beschrieben werden 17,90 g (17 mmol) **19a** mit 2,16 ml (26 mmol) Oxalylchlorid und 10 Tropfen DMF versetzt. In der Kälte wird 2 h, dann weitere 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Aufarbeitung werden 17,70 g (17 mmol, 100 %) **20a** als schwach gelb gefärbter Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 1,27 [t, 3H, OCH_2CH_3], 2,10 [s, 12H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$], 2,41 [m, 2H, $(\text{O})\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$], 2,64 [m, 2H, $(\text{O})\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$], 3,62 [m, 2H, NHCH_2CH], 3,81 [m, 2H, NHCH_2CH], 4,09 [m, 4H, OCH_2CH_3 , $\text{ArNCH}_2\text{C}(\text{O})$], 4,28 [m, 2H, CHCH_2OAc], 4,43 [m, 2H, CHCH_2OAc], 5,24 [m, 2H, $\text{CH}(\text{OAc})\text{CH}_2$], 7,58 [m, 2H, $\text{ArC}(\text{O})\text{NH}$].

N-{3,5-Bis-[(2,3-diacetoxy-propyl)-methyl-carbamoyl]-2,4,6-triiod-phenyl}-*N*-chlorcarbonylmethyl-bernsteinsäureethylester (**20b**)

19,50 g (18 mmol) **19b** werden nach *AAV* 3 mit 1,90 ml (22 mmol) Oxalylchlorid und 10 Tropfen DMF in das korrespondierende Säurechlorid überführt. Dazu wird der Ansatz erst 2 h in der Kälte und danach 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung ergibt 18,73 g (17 mmol, 94 %) **20b**.

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 1,28 [t, 3H, OCH₂CH₃], 2,10 [s, 12H, OC(O)CH₃], 2,59 [m, 4H, (O)CCH₂CH₂C(O)], 2,97 [m, 6H, N(CH₃)CH₂], 3,49 [m, 2H, N(CH₃)CH₂], 4,26 [m, 8H, N(CH₃)CH₂, OCH₂CH₃, ArNCH₂C(O), CHCH₂OAc], 4,50 [m, 2H, CHCH₂OAc], 5,45 [m, 2H, CH(OAc)CH₂].

N-(3,5-Bis-chlorcarbonyl-2,4,6-triiod-phenyl)-bernsteinsäureethylester (**21**)

Bei 0°C werden 70,00 g (0,12 mmol) **2** in 150 ml DMA gelöst, 33,50 ml (0,24 mol) Bernsteinsäureethylesterchlorid zugegeben und 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird anschließend filtriert und im Vakuum eingeeengt. Durch Umkristallisation des Rohprodukts aus EtOAc werden 78,30 g (0,11 mol, 90 %) **21** als beige gefärbter Feststoff erhalten (*R_f* = 0,56 in EtOAc/Hexan 3:1).

¹H-NMR (d₆-DMSO): δ [ppm] = 1,20 [t, 3H, OCH₂CH₃, ³J = 6,0 Hz], 2,64 [m, 4H, (O)CCH₂CH₂C(O)], 4,09 [q, 2H, OCH₂CH₃, ³J = 6,0 Hz], 10,25 [d, 1H, ArNHC(O)].

FAB-MS (m/z (%)): 724 (30) [M+H]⁺.

4-Brommethyl-2,2-dimethyl-[1,3]dioxolan (**24**)

Die Synthese erfolgt entgegen der Literaturvorschrift^[88] in Anlehnung an ein von Rapoport^[89] beschriebenes Verfahren. Hierzu werden 75,00 g (0,57 mol) Solketal und 163,71 g (0,62 mol) Triphenylphosphin in 450 ml Dichlormethan gelöst. Im Eisbad wird die Lösung auf 0°C gekühlt und anschließend portionsweise 111,09 g (0,62 mol) *N*-Bromsuccinimid (NBS) zugegeben. Der Ansatz rührt 2 d bei Raumtemperatur, dann wird Dichlormethan am Rotationsverdampfer entfernt und das dunkelrote ölige Rohprodukt mit Diethylether versetzt. Durch Filtration wird der Triphenylphosphinoxid-Niederschlag beseitigt, mehrmals mit Ether gewaschen und die vereinigte Etherphase am Rotationsverdampfer eingeeengt. Durch Destillation (Sdp. 35°C / $5,2 \cdot 10^{-1}$ mbar) wird das Rohprodukt gereinigt. Es werden 53,62 g (0,28 mol, 49 %) 4-Brommethyl-2,2-dimethyl-[1,3]-dioxolan (**24**) erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 1,38 [s, 3H, C(CH₃)₂], 1,45 [s, 3H, C(CH₃)₂], 3,33 [dd, 1H, CHBr], 3,44 [dd, 1H, CHBr], 3,87 [dd, 1H, OCHCH(O)], 4,13 [dd, 1H, OCHCH(O)], 4,35 [m, 1H, CH(O)CH₂O].

CI-MS (m/z (%)): 195 (100) [M+H]⁺, 117 (29) [M-Br]⁺.

Benzyl-bis-(2,2-dimethyl-[1,3]dioxolan-4-ylmethyl)-amin (**25**)

243,16 g (1,10 mol) **23** werden in 600 ml Acetonitril gelöst und 152,21 g (1,10 mol) K₂CO₃ zugefügt. Nach der Zugabe von 142,88 g (0,73 mol) **24** wird 10 h refluxiert. Der Ansatz wird filtriert und im Vakuum eingeeengt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel (EtOAc/Hexan 1:1 + 0,5 % NEt₃). Die Ausbeute beträgt 179,98 g (0,54 mol, 74 %) **25** (R_f = 0,73 in MeCl₂/MeOH 10:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 1,36 [s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,44 [s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 2,74 [d, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CHR})_2$], 3,67 [dd, 2H, CHCH_2O], 3,83 [s, 2H, $\text{C}_{\text{benzyl}}\text{H}_2$], 4,04 [dd, 2H, CHCH_2O], 4,26 [m, 2H, $\text{CH}(\text{O})\text{CH}_2\text{O}$], 7,29 [m, 5H, ArH].

CI-MS (m/z (%)): 336 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Bis-(2,2-dimethyl-[1,3]dioxolan-4-ylmethyl)-amin (**26**)

Bei Raumtemperatur werden 31,32 g (0,46 mol) **25** in 450 ml Methanol gelöst. Unter N_2 -Atmosphäre werden sodann 3,13 g Pd-Kohle zugegeben, N_2 gegen H_2 ausgetauscht und der Ansatz 24 h unter H_2 -Atmosphäre gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgt via DC. Nach dem Ende der Reaktion wird die Pd-Kohle durch Filtration abgetrennt und die klare gelbe Lösung im Vakuum eingeeengt. Die chromatographische Reinigung an Kieselgel ($\text{MeCl}_2/\text{MeOH}$ 10:1) ergibt 109,00 g (0,44 mol, 96 %) **26** ($R_f = 0,48$ in $\text{MeCl}_2/\text{MeOH}$ 10:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 1,36 [s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,47 [s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 3,00 [m, 2H, NCH_2CH], 3,30 [m, 2H, NCH_2CH], 3,77 [dd, 1H, CHCH_2O], 3,83 [dd, 1H, CHCH_2O], 4,14 [dd, 2H, CHCH_2O], 4,59 [m, 2H, $\text{CH}(\text{O})\text{CH}_2\text{O}$].

CI-MS (m/z (%)): 246 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-{3-[Bis-(2,2-dimethyl-[1,3]dioxolan-4-ylmethyl)-carbamoyl]-5-chlorcarbonyl-2,4,6-triiod-phenyl}-bernsteinsäureethylester (**27**)

In 100 ml DMF werden 30,10 g (42 mmol) **21** und 6,9 ml (50 mmol) NEt_3 gelöst, die Lösung anschließend auf 0°C gekühlt und eine Lösung von 10,20 g (42 mmol) **26** in 50 ml DMF dazu getropft. Der Ansatz wird 16 h bei Raumtemperatur gerührt und danach das entstandene Hydrochlorid über eine G3-Fritte abgetrennt.

Die Lösung wird am Rotationsverdampfer eingengt und das Rohprodukt durch eine Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (EtOAc/Hexan 1:1 bis EtOAc/Hexan 1:2). Die Ausbeute beträgt 13,40 g (14 mmol, 33 %) **27** ($R_f = 0,39$ in EtOAc/Hexan 3:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 1,35 [m, 15H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$, OCH_2CH_3], 2,76 [m, 4H, $(\text{O})\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$], 3,42 [m, 2H, NCH_2CHR], 3,70 [m, 2H, NCH_2CHR], 4,02 [m, 2H, CHCH_2O], 4,11 [m, 4H, OCH_2CH_3 , CHCH_2O], 4,40 [m, 1H, $\text{CH}(\text{O})\text{CH}_2\text{O}$], 4,63 [m, 1H, $\text{CH}(\text{O})\text{CH}_2\text{O}$], 8,68 [br, 1H, ArNH].

ESI-MS (m/z (%)): 933 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 875 (18) $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_6\text{O}]^+$.

[(3,5-Bis-chlorcarbonyl-2,4,6-triiod-phenylcarbamoyle)-methoxy]-essigsäureethylester (**28**)

18,96 g (105 mmol) **11** werden in 50 ml Dichlorethan gelöst und mit 7,60 ml (126 mmol) Thionylchlorid sowie 10 Tropfen DMF versetzt. Der Ansatz wird anschließend 1,5 h refluxiert und danach weitere 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt, zweimal 40 ml Dichlormethan zugegeben und nochmals eingengt. Zu dem Säurechlorid **12** wird nun eine Lösung von 50,00 g (84 mmol) **2** in 100 ml DMF zugegeben und der Ansatz 8 h bei 80°C gerührt. Die chromatographische Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (Toluol 100 %) ergibt 46,85 g (63 mmol, 75 %) **28** ($R_f = 0,53$ in EtOAc/Hexan 3:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 1,29 [dt, 3H, OCH_2CH_3], 4,27 [m, 6H, OCH_2CH_3 , $(\text{O})\text{CCH}_2\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})$], 9,02 [s, 1H, $\text{ArNHC}(\text{O})$].

FAB-MS (m/z (%)): 740 (20) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

{{3-[Bis-(2,2-dimethyl-[1,3]dioxolan-4-ylmethyl)-carbamoyl]-5-chlorcarbonyl-2,4,6-triiod-phenylcarbamoyl}-methoxy)-essigsäureethylester (**29**)

Eine Lösung von 25,01 g (34 mmol) **28** in 80 ml DMF wird im Eisbad auf 0°C gekühlt und dazu eine Lösung aus 8,29 g (34 mmol) **26** und 4,69 ml (34 mmol) NEt₃ in 120 ml DMF getropft. Im Eisbad wird weitere 2 h und danach 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Hydrochlorid-Niederschlag wird durch Filtration entfernt und die Lösung im Vakuum eingengt. Die säulenchromatographische Reinigung des bräunlichen Rohprodukts an Kieselgel (EtOAc/Hexan 1:1) ergibt 9,40 g (10 mmol, 29 %) **29** (R_f = 0,34 in EtOAc/Hexan 3:1).

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 1,40 [m, 15H, C(CH₃)₂, OCH₂CH₃], 3,58 [m, 4H, N(CH₂CHR)], 3,99 [dd, 4H, CH(O)CH₂O], 4,16 [dd, 4H, CH(O)CH₂O], 4,18 [m, 6H, OCH₂CH₃, (O)CCH₂OCH₂C(O)], 4,41 [m, 1H, CH(O)CH₂O], 4,63 [m, 1H, CH(O)CH₂O], 8,91 [br, 1H, ArNHC(O)].

ESI-MS (m/z (%)): 949 (100) [M+H]⁺, 891 (17) [M-C₃H₆O]⁺.

5.3 Synthese der dendritischen Röntgenkontrastmittel

Dendr-(RR 1)₆₄

Gemäß *AAV 4* werden 0,72 g (0,1 mmol) DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄ der Charge ng 12351 zusammen mit 3,4 ml (19,9 mmol) DIPEA in 80 ml DMF gelöst und bei 0°C eine Lösung des Säurechlorids **10a** (9,7 mmol) in 60 ml Dichlormethan zugetropft. Nach dem allmählichen Erwärmen auf Raumtemperatur wird der Ansatz 10 d gerührt und anschließend gemäß der o.g. Vorschrift aufgearbeitet. Zur Abspaltung der Schutzgruppen wird das Primärprodukt in 60 ml Methanol gelöst, mit einer Lösung aus 2,73 g (68,3 mmol) NaOH in 40 ml Wasser versetzt und 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Rohprodukt durch eine Ultrafiltration aufgereinigt. Nach der Gefriertrocknung des Retentats verblieben 4,22 g (0,06 mmol, 64 % bezogen auf DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄) des Kontrastmittels **Dendr-(RR 1)₆₄**.



(62278,61 + x H₂O)

C_{ber.}: 31,94 H_{ber.}: 3,70 N_{ber.}: 7,15 I_{ber.}: 39,12

C_{gef.}: 31,10 H_{gef.}: 4,23 N_{gef.}: 6,94 I_{gef.}: 39,02

H₂O (KF, in %): 2,64

¹H-NMR (D₂O): δ [ppm] = 1,90 [br, 28H, NCH₂CH₂CH₂NHC(O)TIA, NCH₂CH₂CH₂N, NCH₂CH₂CH₂CH₂NH], 3,15 [br, 25H, *dendr*-CH₂NHC(O)TIA], 3,40 [br, 25H], 3,58 [br, 10H], 3,68 [br, 18H], 3,77 [br, 15H], 4,04 [br, 20H], 4,21 [br, 28H].

FT-IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3262 m, (CO-NH, -OH), 2927 m, (C-H), 1647 s (CO-NH), 1564 m (CO-NH), 1554 m, 1437 m (C-H), 1370 m, 1271 m (C-O), 1118 m (C-O), 1044 m (Ar-I), 983 w.

DSC (Einwaage: 2,39 mg): T_g = 61,33°C.

Dendr-(RR 2)₆₄

Korrespondierend zu *AAV 4* werden 0,85 g (0,12 mmol) DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄ Charge ng 98751 in 20 ml DMF und 50 ml THF gelöst, mit 3,92 ml (23,10 mmol) DIPEA versetzt und dazu langsam 80 ml einer Lösung aus 13,20 g (11,40 mmol) **10b** in THF getropft. Nach 2 h wird das Eisbad entfernt und weitere 8 d bei Raumtemperatur gerührt. Nach der ersten Aufarbeitung gemäß *AAV 4* wird das Rohprodukt in 50 ml Methanol gelöst, 40 ml (80,00 mmol) 2 N NaOH zur Spaltung der Schutzgruppen zugefügt und 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird gemäß *AAV 4* verfahren.

Nach der Ultrafiltration und der Gefriertrocknung verbleiben 3,65 g (0,057 mmol, 48 % (bezogen auf DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄) des radiopaken Dendrimers **Dendr-(RR 2)₆₄** in Form eines farblosen Feststoffs.



(64074,04 + x H₂O)

C_{ber.}: 33,44 H_{ber.}: 4,0 N_{ber.}: 6,95 I_{ber.}: 38,03

C_{gef.}: 32,89 H_{gef.}: 4,65 N_{gef.}: 6,90 I_{gef.}: 35,33

H₂O (KF, in %): 3,07

¹H-NMR (D₂O): δ [ppm] = 1,98 [br, 27H, NCH₂CH₂CH₂NHC(O)TIA, NCH₂CH₂CH₂N, NCH₂CH₂CH₂CH₂NH], 2,81 [br, 20H] 3,04 [br, 29H], 3,24 [br, 26H, *dendr*-CH₂NHC(O)TIA], 3,38 [br, 18], 3,53 [br, 22H], 3,67 [br, 12H], 3,79 [br, 20H], 4,13 [br, 47H].

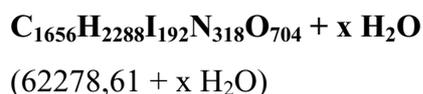
FT-IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3344 m, (CO-NH, -OH), 2932 m, (C-H), 1622 s (CO-N(CH₃)), 1523 m (CO-N(CH₃)), 1404 m (C-H), 1276 m (C-O), 1132 m (C-O), 1044 m (Ar-I), 981 w.

DSC (Einwaage: 1,26 mg): T_g = 66,20°C.

Dendr-(RR 3)₆₄

0,91 g (0,13 mmol) DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄, Charge ng 98751 werden zusammen mit 4,1 ml (24 mmol) DIPEA in 50 ml THF sowie 10 ml DMF gelöst und auf 0°C gekühlt. Nach *AAV 4* wird nun in der Kälte eine Lösung von 13,31 g (12,00 mmol) **16a** in 60 ml THF langsam dazu gegeben und der Ansatz langsam auf Raumtemperatur gebracht. Nach 6 Tagen wird entsprechend *AAV 4* aufgearbeitet.

Nach dem Lösen des Rohprodukts in 100 ml Methanol und der Zugabe von 42 ml (84 mmol) 2 N NaOH werden die Schutzgruppen innerhalb von 16 h abgespalten. Die Aufreinigung des Produkts durch Ultrafiltration sowie die Gefriertrocknung ergeben 4,20 g (0,07 mmol, 53 % (bezogen auf DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄)) des radiopaken Dendrimers **Dendr-(RR-3)₆₄**.



C _{ber.} :31,94	H _{ber.} : 3,70	N _{ber.} : 7,15	I _{ber.} : 39,12
C _{gef.} : 31,96	H _{gef.} : 4,43	N _{gef.} : 7,20	I _{gef.} : 36,42
H ₂ O (KF, in %):	2,73		

¹H-NMR (D₂O): δ [ppm] = 1,98 [br, 46H, NCH₂CH₂CH₂NHC(O)TIA, NCH₂CH₂CH₂N, NCH₂CH₂CH₂CH₂NH], 2,65 [br, 36H] 3,10 [br, 20H], 3,29 [br, 24H, *dendr*-CH₂NHC(O)TIA], 3,46 [br, 12H], 3,57 [br, 15H], 3,73 [br, 18H], 3,79 [br, 17H], 4,10 [br, 21H], 4,27 [br, 25H].

FT-IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3264 m, (CO-NH, -OH), 2932 m, (C-H), 1647 s (CO-NH), 1594 m (CO-NH), 1412 m (C-H), 1318 w, 1268 m (C-O), 1117 m (C-O), 1045 s (Ar-I), 983 w.

DSC (Einwaage: 1,40 mg): T_g = 68,70°C.

Dendr-(RR 4)₆₄

Zu einer Lösung von 0,63 g (0,09 mmol) DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄, Charge ng 98751 in 50 ml THF und 10 ml DMF werden 2,87 ml (16,80 mmol) DIPEA gegeben. Entsprechend *AAV 4* werden anschließend 9,41 g (8,4 mmol) **16b**, gelöst in 50 ml THF, langsam zugetropft. Der Ansatz rührt 14 d bei Raumtemperatur. Nach der ersten Aufarbeitung gemäß *AAV 4* wird das Rohprodukt in 50 ml Ethanol gelöst. Durch Zusatz von 29,4 ml (59 mmol) 2 N NaOH-Lösung werden die Schutzgruppen verseift, danach wird wie unter *AAV 4* beschrieben weiter verfahren. Es werden 0,40 g (0,01 mmol, 11 % (bezogen auf DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄)) des dendritischen Röntgenkontrastmittels **Dendr-(RR 4)₆₄** erhalten.



(64074,04 + x H₂O)

C_{ber.}:33,44 H_{ber.}: 4,00 N_{ber.}: 6,95 I_{ber.}: 38,03

C_{gef.}: 32,03 H_{gef.}: 4,67 N_{gef.}: 6,69 I_{gef.}: 34,58

H₂O (KF, in %): n.b.

¹H-NMR (D₂O): δ [ppm] = 1,95 [br, 30H, NCH₂CH₂CH₂NHC(O)TIA, NCH₂CH₂CH₂N, NCH₂CH₂CH₂CH₂NH], 2,90 [br, 49H] 3,10 [br, 20H], 3,27 [br, 9H], 3,46 [br, 22H], 3,67 [br, 15H], 3,84 [br, 23H], 4,04 [br, 15H] 4,21 [br, 20H].

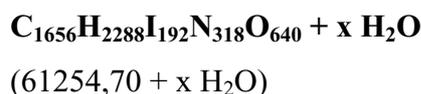
FT-IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3332 m, (CO-N(CH₃), -OH), 2929 m, (C-H), 1622 s (CO-N(CH₃)), 1521 m (CO-N(CH₃)), 1407 s (C-H), 1318 m, 1269 m (C-O), 1128 s (C-O), 1042 s (Ar-I), 981 w.

DSC (Einwaage: 1,98 mg): T_g = 71,20°C.

Dendr-(RR 5)₆₄

1,23 g (0,17 mmol) DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄, Charge ng 98751 und 7 ml (41 mmol) DIPEA werden entsprechend der *AAV 4* in 40 ml DMF gelöst und langsam eine Lösung von 17,70 g (17,00 mmol) des Säurechlorids **20a** in 100 ml THF hinzu getropft. Der Ansatz rührt danach 14 d bei Raumtemperatur. Das Rohprodukt wird anschließend in 75 ml Methanol aufgenommen, mit 58 ml (116 mmol) 2 N NaOH versetzt und 2 d bei Raumtemperatur zur Spaltung der Acetyl- bzw. Ethylesterschutzgruppen gerührt.

Das Rohprodukt wird durch Ultrafiltration gereinigt, nach der Gefriertrocknung verbleiben 5,45 g (0,09 mmol, 52 % (bezogen auf DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄)) des dendritischen Röntgenkontrastmittels **Dendr-(RR 5)₆₄**.



C _{ber.} :32,47	H _{ber.} : 3,76	N _{ber.} : 7,27	I _{ber.} : 39,78
C _{gef.} : 31,83	H _{gef.} : 4,42	N _{gef.} : 6,95	I _{gef.} : 35,69
H ₂ O (KF, in %):	2,40		

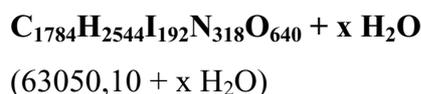
¹H-NMR (D₂O): δ [ppm] = 1,90 [br, 36H, NCH₂CH₂CH₂NHC(O)TIA, NCH₂CH₂CH₂N, NCH₂CH₂CH₂CH₂NH], 2,46 [br, 34H] 3,08 [br, 43H], 3,44 [br, 24H], 3,64 [br, 27H], 3,82 [br, 22H], 4,00 [br, 16H], 4,30 [br, 17H].

FT-IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3264 m, (CO-NH, -OH), 2927 m, (C-H), 1647 s (CO-NH), 1554 m (Ar_{C=C}, CO-NH), 1398 s (C-H), 1250 m (C-O), 1113 m (C-O), 1042 m (Ar-I), 985 m.

DSC (Einwaage: 3,04 mg): T_g = 78,37°C.

Dendr-(RR 6)₆₄

1,26 g (0,18 mmol) DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄, Charge ng 98751 und 5,85 ml (34 mmol) DIPEA werden in 100 ml THF/10 ml DMF gelöst und nach *AAV 4* langsam mit 100 ml einer Lösung von 18,73 g (17 mmol) **20b** in THF versetzt. Nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur rührt der Ansatz 14 Tage. Gemäß *AAV 4* wird aufgearbeitet und das Rohprodukt sodann in 100 ml Ethanol gelöst. Nach der Zugabe von 59,5 ml (119 mmol) 2 N NaOH wird 24 h zur Spaltung der Schutzgruppen gerührt. Die weitere Aufreinigung des Produkts geschieht durch Ultrafiltration. Das Retentat wurde aufkonzentriert und gefriergetrocknet. Es werden 5,60 g (0,09 mmol, 51 % bezogen auf DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄) des dendritischen Röntgenkontrastmittels **Dendr-(RR 6)₆₄** erhalten.



C _{ber.} : 33,99	H _{ber.} : 4,07	N _{ber.} : 7,06	I _{ber.} : 38,64
C _{gef.} : 33,79	H _{gef.} : 5,06	N _{gef.} : 7,08	I _{gef.} : 36,22
H ₂ O (KF, in %):	2,58		

¹H-NMR (D₂O): δ [ppm] = 1,87 [br, 29H, NCH₂CH₂CH₂NHC(O)TIA, NCH₂CH₂CH₂N, NCH₂CH₂CH₂CH₂NH], 2,37 [br, 25H], 2,97 [br, 24H], 3,17 [br, 10H], 3,38 [br, 30H], 3,60 [br, 14H], 3,73 [br, 21H], 3,98 [br, 12H], 4,18 [br, 12H].

FT-IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3263 m, (CO-N(CH₃), -OH), 2957 m, (C-H), 1627 s (CO-N(CH₃)), 1575 m, 1532 m (CO-N(CH₃)), 1404 s (C-H), 1269 m (C-O), 1223 m, 1138 w, 1041 s (Ar-I).

DSC (Einwaage: 2,03 mg): T_g = 71,36°C.

Dendr-(RR 7)₆₄

Entsprechend *AAV 4* werden 13,40 g (14,00 mmol) **27** in 70 ml THF gelöst und bei 0°C langsam zu einer Lösung von 1,05 g (0,15 mmol) DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄, Charge ng 98751 und 4,8 ml (28,00 mmol) DIPEA in 60 ml THF und 10 ml DMF getropft. Nach 14 d wird aufgearbeitet, der Rückstand mit 50 ml Methanol und 49 ml (98,00 mmol) 2 N NaOH zur Spaltung der im Primärprodukt vorhandenen Ethylester versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 2 N HCl zur Spaltung der verbliebenen Acetonide Lösung auf pH 1,5 angesäuert und 24 h gerührt. Die weitere Aufarbeitung erfolgt gemäß *AAV 4*. Durch Ultrafiltration wird das Rohprodukt gereinigt, nach der Gefriertrocknung verbleiben 0,49 g (0,01 mmol, (6% bezogen auf DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄)) des dendritischen Röntgenkontrastmittels **Dendr-(RR 7)₆₄** in Form eines farblosen Feststoffs.



(57603,36 + x H₂O)

C_{ber.}: 31,86 H_{ber.}: 3,67 N_{ber.}: 6,18 I_{ber.}: 42,30

C_{gef.}: 29,32 H_{gef.}: 4,38 N_{gef.}: 5,28 I_{gef.}: 35,37

H₂O (KF, in %): n.b.

¹H-NMR (D₂O): δ [ppm] = 1,26 [br, 81H, NCH₂CH₂CH₂NHC(O)TIA, NCH₂CH₂CH₂N, NCH₂CH₂CH₂CH₂NH], 2,05 [s, 8 H], 2,21 [s, 41H], 2,70 [br, 88H, NCH₂CH₂CH₂NHC(O)TIA, NCH₂CH₂CH₂N, NCH₂CH₂CH₂CH₂NH], 3,18 [q, 55H], 3,54 [br, 120H], 4,05 [m, 37H], 4,56 [m, 3H], 4,67 [br, 38H], 5,01 [m, 19H].

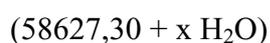
FT-IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3329 m, (CO-NH, O-H), 2933 m, (C-H), 1619 s (CON(CH₃)), 1566 m (CO-NH), 1404 m (C-H), 1354 m, 1173 m, 1108 m (C-O), 1038 s (Ar-I), 924 w.

DSC (Einwaage: 2,94 mg): T_g = 79,53°C.

Dendr-(RR 8)₆₄

0,74 g (0,10 mmol) DAB-dendr-(NH₂)₆₄, Charge ng 12351 und 3,4 ml (19,90 mmol) DIPEA werden in 20 ml DMF und 60 ml THF gelöst und langsam unter Beachtung der *AAV 4* mit einer Lösung von 9,40 g (9,90 mmol) **29** in 100 ml THF versetzt. Nach 14 d wird gemäß der oben genannten Arbeitsvorschrift aufgearbeitet. Die im Primärprodukt vorhandenen Ethylesterschutzgruppen werden nun bei Raumtemperatur durch Lösen in 80 ml Methanol und der Zugabe von 2 N NaOH innerhalb von 24 h gespalten. In Abwandlung zu *AAV 4* wird die säurekatalysierte Spaltung der vorhandenen Acetonidschutzgruppen durch Ansäuern der Lösung mit 2 N HCl auf pH 1,5 initiiert und 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Neutralisation wird wie unter *AAV 4* beschrieben weitergearbeitet.

Nach der Gefriertrocknung des Retentats der Ultrafiltration werden 3,75 g (0,06 mmol, (62 % bezogen auf DAB-dendr-(NH₂)₆₄)) des Röntgenkontrastmittels **Dendr-(RR 8)₆₄** erhalten.



C _{ber.} : 31,30	H _{ber.} : 3,60	N _{ber.} : 6,07	I _{ber.} : 41,56
C _{gef.} : 30,79	H _{gef.} : 4,29	N _{gef.} : 5,76	I _{gef.} : 37,97
H ₂ O (KF, in %):	2,32		

¹H-NMR (D₂O): δ [ppm] = 1,39 [br, 13H], 1,99 [br, 28H, NCH₂CH₂CH₂NHC(O)TIA, NCH₂CH₂CH₂N, NCH₂CH₂CH₂CH₂NH], 3,10 [br, 30H], 3,39 [br, 23H], 3,62 [m, 54H], 3,80 [m, 14H], 4,04 [br, 10H], 4,27 [br, 21H], 4,47 [br, 11H].

FT-IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3263 m, (CO-NH, O-H), 2957 m, (C-H), 1618 s (CO-NH), 1542 m (CO-NH), 1522 m, 1436 m, 1353 m, 1249 m (C-O), 1116 m (C-O), 1042 s (Ar-I).

DSC (Einwaage: 1,67 mg): T_g = 47,64°C.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden acht wasserlösliche dendritische Röntgenkontrastmittel **Dendr-(RR N)₆₄**, N = 1 - 8 durch polymeranaloge Umsetzung verschiedener Triiodaromaten mit dem POPAM-Dendrimer DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄ synthetisiert. Die Molekülstruktur der Triiodaromaten sollte die physikochemischen und pharmakologischen Eigenschaften der dendritischen Endprodukte derart beeinflussen, dass diese dem geforderten Anforderungsprofil entsprechen. Sämtliche radiopaken Triiodaromaten besitzen vier Hydroxygruppen sowie zwei Carboxylgruppen, wovon eine der amidischen Bindungsbildung an das dendritische Grundgerüst dient. Durch die in der Molekülstruktur einiger Triiodaromaten vorhandene zusätzliche Ethergruppe sollte eine weitere Verbesserung der Verträglichkeit erreicht werden.

Die dendritischen Endprodukte wurden mit den üblichen polymeranalytischen Methoden charakterisiert:

Die Molmassen und Molmassenverteilungen wurden durch GPC erhalten. Die Proben **Dendr-(RR 2)₆₄** bis **Dendr-(RR 6)₆₄** haben eine bimodale Molmassenverteilung, die beiden Produkte **Dendr-(RR 1)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** sogar eine trimodale Molmassenverteilung. Die Moleküle der Hauptfraktionen aller acht Dendrimere zeichnen sich durch ein fast identisches Elutionsvolumen aus und besitzen folglich ein ähnliches hydrodynamisches Volumen. Die experimentell bestimmten Molmassen M der Hauptfraktionen stimmen mit Ausnahme von **Dendr-(RR 5)₆₄** mit dem theoretischen Molmassenwert $M_{theoret.}$ gut überein. Für die Nebenkomponenten 2 bzw. 3 sind dagegen um die Faktoren 2 bis 4 größere Molmassen gefunden worden. Wie HPLC und GPC-Untersuchungen zweier verschiedener Chargen des POPAM-Dendrimers DAB-*dendr*-(NH₂)₆₄ ergaben, sind die gefundenen Molmassenverteilungen der Endprodukte auf die unterschiedliche Qualität der eingesetzten dendritischen Grundgerüste zurückzuführen.

Außer bei den beiden trimodal verteilten Proben **Dendr-(RR 1)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** werden durch statische Lichtstreuung und GPC ähnliche Molmassen ermittelt. Bei den beiden genannten Verbindungen werden als Konsequenz des deutlich größeren Anteils höhermolekularer Nebenprodukte größere Molmassen gefunden. Die experimentell bestimmten zweiten osmotischen Virialkoeffizienten A_2 sind mit Ausnahme von **Dendr-(RR 3)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** positiv. Letztgenannte Verbindung besitzt einen

ausgeprägten negativen zweiten osmotischen Virialkoeffizienten A_2 . Da die Teilchendurchmesser der untersuchten radiopaken Dendrimere deutlich kleiner als die Wellenlänge des eingestrahnten Lichts sind, können die mittleren quadratischen Trägheitsradien der dendritischen Verbindungen nicht bestimmt werden.

Die Diffusionskoeffizienten D und hydrodynamischen Radien r_h der vier Dendrimere **Dendr-(RR 1)₆₄**, **Dendr-(RR 5)₆₄**, **Dendr-(RR 6)₆₄** und **Dendr-(RR 8)₆₄** sind durch dynamische Lichtstreuung bestimmt worden. Die Diffusionskoeffizienten unterscheiden sich wenig voneinander, die hydrodynamischen Radien bewegen sich im Bereich um $r_h = 3$ nm.

Einige radiopake Dendrimere wurden mit Hilfe der Rotationsviskosimetrie untersucht. Dabei zeigen alle Verbindungen im gewählten Konzentrationsbereich *Newtonsches* Fließverhalten. Allerdings ist die Methode für die weitere Auswertung zu unempfindlich. Zur Bestimmung der Viskositätszahlen $[\eta]$ wurden die dendritischen Röntgenkontrastmittel mittels Kapillarviskosimetrie vermessen und das Auswerteverfahren nach Schulz-Blaschke angewendet. Mit Hilfe des *Einsteinschen* Viskositätsgesetzes für kompakte, kugelförmige Teilchen lassen sich die hydrodynamischen Radien r_η bestimmen. Sie stimmen mit den durch dynamische Streulichtmessung gewonnenen hydrodynamischen Radien r_h befriedigend überein.

Die partiellen spezifischen Volumina sind über die Densitometrie erhältlich. Unter Berücksichtigung der experimentell bestimmten Molmassen lassen sich die scheinbaren Molekülvolumina v_m und Molekülradien r_m berechnen. Durch Vergleich der experimentell gefundenen Radien r_η und r_m kann auf den Anteil der Lösungsmittelmoleküle an dem viskosimetrisch ermittelten hydrodynamischen Volumen geschlossen werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Beurteilung der Produktqualität dendritischer Röntgenkontrastmittel bietet die Gelelektrophorese. Alle untersuchten Proben zeigen breite Banden, daneben sind teilweise auch die höhermolekularen Anteile sichtbar. Da keine geeigneten dendritischen Standards zur Verfügung standen, konnte lediglich die Größenordnung der Molmassen ermittelt werden.

Die synthetisierten dendritischen Röntgenkontrastmittel sind zwitterionische Spezies. Daher kann die isoelektrische Fokussierung zur Bestimmung der isoelektrischen Punkte angewendet werden. Lediglich bei der Verbindung **Dendr-(RR 8)₆₄** liegt der pI in der Nähe des physiologischen pH-Wertes.

Wie physikochemische Untersuchungen gezeigt haben, erfüllen alle getesteten Substanzen die geforderten Kriterien zur Anwendung in der Röntgendiagnostik. Die pharmakologischen

Studien belegen außerdem die Fähigkeit zur renalen Eliminierung der Substanzen. Insbesondere bei der Verbindung **Dendr-(RR 5)₆₄** ist diese exzellent. Sie ist das bis dato am besten ausscheidbare dendritische Röntgenkontrastmittel. Ebenso liegt die Verträglichkeit dieser Verbindung deutlich oberhalb der geforderten Grenze. Die Verbindung **Dendr-(RR 1)₆₄** zeigt sogar eine noch bessere Verträglichkeit. Allerdings steht keine detaillierte Ausscheidungsstudie dieser Substanz zur Verfügung.

Die vorliegenden physikochemischen und pharmakologischen Daten bestätigen die grundsätzliche Eignung der synthetisierten radiopaken Dendrimere für die Röntgendiagnostik. Möglicherweise können die neuartigen Triiodaromaten in Zukunft auch mit der nächst niedrigeren Dendrimergeneration **DAB-dendr-(NH₂)₃₂** umgesetzt werden. Dies würde die Synthesekosten bei geeignetem Eigenschaftsprofil der radiopaken Produkte erheblich reduzieren und das Herstellungsverfahren konkurrenzfähig machen. In zukünftigen Arbeiten sollte versucht werden, die radiopaken Reste auch über Harnstoffbindungen an das dendritische Grundgerüst zu koppeln oder in den Triiodaromaten Carboxylgruppen durch Sulfonsäuregruppen zu ersetzen. Eventuell lässt sich die Verträglichkeit der dendritischen Endprodukte durch diese strukturellen Änderungen weiter steigern.

7 Anhang

7.1 Liste häufig verwendeter Abkürzungen und Symbole

α	Polarisierbarkeit
A_2, A_3	Zweiter, dritter osmotischer Virialkoeffizient
br	breites NMR-Signal
c	Massenkonzentration in Gramm pro Kubikzentimeter Lösemittel
δ	chemische Verschiebung
d	Teilchendurchmesser
d	Duplett
d	engl. day \equiv Tag
D	Diffusionskoeffizient
(dn/dc)	spezifisches Brechungsindexinkrement, vereinfacht Brechungsinkrement
D_4/D_8	DAB- <i>dendr</i> -(NH ₂) ₄ / DAB- <i>dendr</i> -(NH ₂) ₈
ϵ	Dielektrizitätskonstante
engl.	Englisch
$\dot{\gamma}$	Scherrate, Geschwindigkeitsgefälle
Gl.	Gleichung
Γ	Linienverbreiterung
η	Viskosität der Lösung
η_0	Viskosität des Lösemittels
$[\eta]$	Grenzviskositätszahl, Viskositätszahl oder Staudinger-Index
η_{rel}	relative Viskosität
η_{sp}	spezifische Viskosität
i.v.	intravenös
J	Kopplungskonstante
k_B	Boltzmann-Konstante
k_d	Verteilungskoeffizient
k_H	Huggins-Konstante
k_{SB}	Schulz-Blaschke-Konstante

K	optische Konstante
K^*	Kapillarkonstante
KF	Karl-Fischer-Titration
λ_0	eingestrahlte Wellenlänge
LS-	Lichtstreu-
n.b.	nicht bestimmt
m	Geradensteigung
m	Multiplett
M	Molmasse
$M_{\ddot{A}q.}$	Äquivalentmolmasse
M_w	massengemittelte Molmasse
$M_{theoret.}$	theoretische Molmasse
min	Minuten
m/z	Masse/Ladung-Verhältnis
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
n	Brechungsindex
$P(\theta)$	Debye-Streufunktion
pI	isoelektrischer Punkt
p.i.	post Injektion, nach der Injektion
PL	Polylysin
PAMAM	Poly(amidoamin)
POPAM	Poly(propylenimin)
ppm	parts per million
PS	Polystyrol
θ	Beobachtungswinkel
ρ_0	Dichte des Lösemittels
ρ	Dichte der Lösung
r_h	hydrodynamischer Radius
r_η	hydrodynamischer Radius (viskosimetrisch)
r_m	scheinbarer Molekülradius (densitometrisch)
$\langle r^2 \rangle$	mittleres Quadrat des Trägheitsradius
$\sqrt{\langle r^2 \rangle}$	mittlerer quadratischer Trägheitsradius

$R(\theta)$	Rayleigh-Verhältnis
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
s	Singulett
τ	Schubspannung
t	Zeit
t	Triplett
T	Temperatur
T_g	Glasübergangstemperatur
\bar{v}_2	partiell spezifisches Volumen
V_2	partiell Molvolumen
v_h	hydrodynamisches Volumen
v_η	hydrodynamisches Volumen (viskosimetrisch)
v_m	scheinbares Molekülvolumen (densitometrisch)

Ac	Acetyl
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
CI	Chemische Ionisation
DAB	1,4-Diaminobutan
DC	Dünnschichtchromatographie
<i>dendr</i>	Dendrimer
DIPEA	Diisopropylethylamin (Hünig Base)
DMA	N,N-Dimethylacetamid
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	Differential Scanning Calorimetrie
DTPA	Diethylentriamino-pentaessigsäure
DTT	Dithiothreitol
EI	Elektronenstoß Ionisation
ESI	Elektrospray Ionisation
EtOAc	Essigsäureethylester
Fa.	Firma

FAB	Fast Atom Bombardment
GPC	Gelpermeationschromatographie
GRR	geschützter radiopaker Rest
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
in vivo	im lebenden Organismus
IR	Infrarot
LD ₅₀	lethale Dosis 50
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Deionisation/Ionisation-Time of Flight
MALLS	Multi Angle Laser Light Scattering
MeCl ₂	Dichlormethan
Mesyl	Methansulfonyl
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PAMAM	Poly(amidoamin)
PET	Positron Emission Tomography
POPAM	Poly(propylenimin)
PPh ₃	Triphenylphosphin
RI	Brechungsindexdetektor
RR	radiopaker Rest
UF	Ultrafiltration
UV	Ultraviolett
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SEC	Size Exclusion Chromatography
SLS	statische Lichtstreuung
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
tBu	<i>tert</i> -Butyl
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran

7.2 Erläuterung der medizinischen Fachausdrücke

Quellen:

- Roche Lexikon Medizin, Urban & Fischer Verlag München, 4. Auflage 1999.
- E. Mutschler, *Arzneimittelwirkungen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1997.

Albumine

Gut wasserlöslicher, stark hydratisierter, schwer aussalzbarer, kohlenhydratfreier Eiweißkörper von elliptischer Gestalt u. Molmasse ca. 66 000; mit starkem Anteil an schwefelhaltigen Aminosäuren, isoelektrischem Punkt von 4,6 u. mit ampholytischem Verhalten. Als Serumalbumin (50–60% der Serumproteine und damit deren Hauptfraktion; ist es als gut ionenbindendes Protein Hauptträger des kolloidosmotischen (onkotischen) Druckes im Gefäßsystem und Trägerstoff für wasserunlösliche, physiologische und unphysiologische, endo- und exogene Stoffe (Fettsäuren, Kationen [Mg^{2+} , Ca^{2+}], Spurenelemente, Vitamine, Metaboliten/Pharmaka und toxische Stoffe.

Angiographie

Röntgenologische Darstellung der Blutgefäße durch Injektion eines nierengängigen Kontrastmittels und anschließende Anfertigung schneller, programmierter Aufnahmeserien (Angiogramme).

Angiokardiographie

Röntgendarstellung der großen Herzgefäße u. der Herzbinnenräume durch Injektion eines wasserlöslichen positiven Kontrastmittels (i.v. oder – mittels eines venös eingeführten Herzkatheters – in ein herznahe Gefäß oder in eine Herzhöhle) mit nachfolgender Anfertigung einer Bildserie.

blood-pool	Blutspeicher, -depot. Ein Blutkreislaufgebiet, das Blutmengen für eine plötzl. Steigerung des Blutbedarfs bereitzuhalten vermag.
Bradykardie	Langsame – regelmäßige oder unregelmäß. – Herzschlagfolge (< 50 Kontraktionen/min).
Computer-Tomographie	Bildgebendes, röntgendiagnostisches Verfahren, bei dem der menschliche Körper Schicht für Schicht durchstrahlt wird. Zum Bildaufbau wird ein Computer eingesetzt. Ermöglicht die Darstellung minimaler Dichteunterschiede (z.B. Gewebeveränderungen, Tumoren). Die Messeinrichtung (schnell rotierende Röntgenröhre mit einem etwa bleistiftstarken Strahlenbündel, Szintillationszähler mit nachgeschaltetem Photomultiplier) ermittelt das Strahlenschwächungsprofil der betreffenden Schicht durch lineare Abtastung (»Seitenriß«) aus jeweils leicht verändertem Winkel (insges. mind. 180°), so dass ca. 100 000 Messwerte anfallen, aus denen eine Ortsverteilung der Schwächungswerte errechnet und in ein Fernsehbild umgesetzt wird, wobei zweckmäßige Kontraststeigerung den Informationsgehalt erhöht. Weitere Vorteile: keine Überlagerung durch andere Schichten, abgestufte Weichteildarstellung auch ohne Kontrastmittel, quantitative Bildauswertung anhand der – am Bildrand angegebenen – Schwächungswerte, schnelle Information. Die CT hat in der Röntgendiagnostik eine Reihe invasiverer Verfahren weitgehend verdrängt.
Diurese	Harnbildung bzw. Harnausscheidung.
Dosis letalis 50	Mittlere letale Dosis, bei der 50 % der Versuchstiere sterben.
Endothelmembran	Zellschicht an der Innenseite/ fläche der Blut- und Lymphgefäße.

Extrazellulärer Raum	Gesamtheit der die Extrazellularflüssigkeit enthaltenden Körperbereiche.
Extrazellularflüssigkeit	Gesamtheit der außerhalb der Körperzellen im Extrazellularraum befindlichen Körperflüssigkeit. Das Volumen ergibt sich aus den Untereinheiten Blutplasma, interstitielle Flüssigkeit u. Lymphe, Flüssigkeit des transzellulären Raumes u. der extrazellulären Räume des festen Bindegewebes, der Knorpel u. Knochen.
Extravasation	Austritt aus den Blut- oder Lymphgefäßen.
Glomerulus	Kleines Gefäß- oder Nervenbündel der Nierenrinde als knäuelbildende Kapillarschleife des arteriellen Wundernetzes der Niere, an das sie mit einer zu- und abführenden Arteriole (= Arteriola glomerularis afferens bzw. efferens = Vas afferens bzw. efferens; angeschlossen ist.
Glomerulusfiltrat	An den Nierenglomeruli abgepreßte und in die Lichtung der Nierenkanälchen (Tubuli) abfließende »Primär« oder »Vorharn« als nahezu eiweißfreies Ultrafiltrat des Blutes, gebildet an der Basalmembran des Glomerulus, die nur für Stoffe mit einer Molmasse < 5000 vollständig durchlässig ist, größere (6–10 nm) teilweise u. große (> 10 nm Durchmesser, z.B. Plasmaproteine) ganz zurückhält.
hämorrhagisch	Zu Blutungen führend, mit Blutungen einhergehend.
hyperton	Einen höheren osmotischen Druck als das Blut aufweisend.
hypoton	Einen niedrigeren osmotischen Druck als das Blut aufweisend.
intravasal/ intravaskulär	In einem oder in ein Blut- oder Lymphgefäß.

intravenös	In einer oder in eine Vene.
Lymphographie	Röntgenologische Darstellung von Lymphgefäßen und –knoten.
Myelographie	Röntgenkontrastdarstellung des Wirbelkanals (u. seines Inhalts) mit Hilfe eines positiven oder negativen Röntgenkontrastmittels.
opak	Undurchsichtig, nicht durchsichtig, lichtundurchlässig.
Plasmaproteine	Im Blutplasma vorhandene Proteine mit vielfältigen Funktionen, z.B. Transport schlecht wasserlöslicher Bestandteile (z.B. Steroidhormone, Lipide), körpereigene Abwehr (Immunglobuline, Komplementsystem), Blutgerinnung u.a.m.
radiopak	Engl. radiopaque ≡ röntgenpositiv; für Röntgenstrahlen undurchlässig sein, im Röntgenbild einen Kontrastschatten gebend.
renal	Zur Niere gehörend, die Niere betreffend.
szintillieren	Funkeln, leuten, flimmern.
Szintillation	Lichtblitze beim Auftreffen radioaktiver Strahlung auf fluoreszierende Stoffe
Szintillationskamera	Gammakamera; ein mit stehendem Detektor (mit Kollimator) ausgestattetes Szintigraphiegerät, mit dem die von Szintillationskristallen des Gerätes gelieferten Szintillationen, mittels Photomultiplier in Stromstöße umgesetzt, auf einem Oszillographen ortstreu dargestellt und photographisch zum »Szinti-Photo« summiert oder aber auf Magnetband gespeichert werden. Die damit mögliche Aufzeichnung in rascher Bildfolge ermöglicht die Erfassung von Aktivitätsänderungen über die Zeit.

Tomograph	Gerät zur Aufnahme röntgenologischer Schichtaufnahmen.
Thorax	Brustkorb.
Thrombose	Blutgerinnung mit Blutpfropfbildung innerhalb der Blutgefäße.
Urographie	Röntgenologische Darstellung der ableitenden Harnwege nach intravenöser Gabe einer relativ kleinen Menge eines röntgenpositiven Kontrastmittels.

7.3 Lebenslauf

Daten zur Person

Name: Markus Schäfer
Geburtsdatum: 23. August 1969
Geburtsort: Heidelberg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1976-1980 Grund- und Hauptschule in Waibstadt
1980-1989 Adolf-Schmitthenner-Gymnasium Neckarbischofsheim
Abschluß: Abitur

Wehrdienst

10/1989 – 09/1990 Grundwehrdienst bei der Luftwaffenwerft 41 in Mosbach

Hochschulausbildung

10/1990 – 04/1998 Chemiestudium an der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg, Abschluß als Diplom-Chemiker
Diplomarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. H.
Vahrenkamp, Thema der Diplomarbeit:
*„N,N-Bis-(2-pyridylmethyl)-N-(2-mercaptobenzyl)amin
als Modelligand für zinkhaltige Enzyme“*

08/1998 – 06/2002 Promotion unter der Leitung von Prof. Dr. J. Springer
(Institut für Chemie, TU Berlin)
Thema der Promotion:
*„Synthese und Charakterisierung radiopaker
Dendrimere zur Anwendung in der Röntgendiagnostik“*

Berufstätigkeit

Seit 08/2002 beschäftigt als International Study Manager bei der
ALTANA Pharma AG

8 Literaturverzeichnis

- [1] A. K. Kern, M. Stein, *Dtsch. Apoth. Ztg.* **1991**, *131*, 1405 - 1413.
- [2] U. Speck, *Kontrastmittel*, Springer Verlag Berlin Heidelberg, 3. Auflage **1991**, 8 - 25.
- [3] E. Haschek, T. Lindenthal, *Ein Beitrag zur praktischen Verwertung der Photographie nach Röntgen*, **1896**, *Wien Klin Wochenschr.* *9*, 63 - 64.
- [4] H. J. Maurer, *Geschichtlicher Überblick über die Entwicklung iodierter Röntgenkontrastmittel* von P. E. Peters, E. Zeitler (Hrsg.), *Röntgenkontrastmittel*, Springer Verlag Berlin Heidelberg **1991**, 1 - 4.
- [5] E. Mutschler, *Arzneimittelwirkungen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart **1997**, 553 - 557.
- [6] W. Krause, N. Hackmann-Schlichter, F. K. Maier, R. Müller, *Dendrimers in Diagnostics*, *Top. Curr. Chem.* **2000**, *210*, 261 - 308.
- [7] J.-M. Idée, M. Port, P. Robert, I. Raynal, P. Prigent, A. Dencausse, S. Le Greneur, I. Tichowsky, G. Le Lem, P. Bourrinet, T. Mugel, S. Benderbous, L. Devoldere, R. Bourbouze, D. Meyer, B. Bonnemain, C. Corot, *Invest. Radiol.* **2001**, *36*, 41 - 49.
- [8] R. Eloy, C. Corot, J. Belleville, *Clin. Mat.* **1991**, *7*, 89 - 197.
- [9] D. Doucet, D. Meyer, C. Chambon, B. Bonneman, *Invest. Radiol.* **1991**, *26*, 53 - 54.
- [10] M. Sovak, J. G. Douglass, R. C. Terry, J. W. Brown, F. Bakir, T. S. Wasden, *Invest. Radiol. (Suppl. 2)* **1994**, *29*, 271 - 274.
- [11] W. Krause, D. Nitecki, F. K. Maier, G. Schuhmann-Giampieri, W. R. Press, P. Muschik, S. Biancalana, WO 9640760, Eur. Patent 0835259 *Iodine-containing peptides and their use as X-ray contrast media*.
- [12] G. R. Newkome, C. N. Moorefield, F. Vögtle, *Dendritic Molecules: Concepts, Syntheses, Perspectives*, VCH Weinheim, **1996**.
- [13] A. W. Bosman, H. M. Janssen, E. W. Meijer, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1665 - 1688.
- [14] D. A. Tomalia, H. Baker, J. R. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, *Polym. J. (Tokyo)* **1985**, *17*, 117 - 132.
- [15] D. A. Tomalia, H. Baker, J. R. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, *Macromolecules* **1986**, *19*, 2466 - 2468.
- [16] E. M. M. de Brabander-van den Berg, E. W. Meijer, *Angew. Chem.* **1993**, *103*, 1370-1372; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1308 - 1311.

- [17] M. Fischer, F. Vögtle, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 934-955; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 884 - 905.
- [18] W. Krause, F. K. Maier, M. Bauer, G. Schuhmann-Giampieri, W.-R. Press, Schering AG, *Kaskadenmoleküle mit Iodaromaten*, Offenlegungsschrift DE 4344464 A1, **1995**.
- [19] W. Krause, D. Nitecki, F. K. Maier, G. Schuhmann-Giampieri, W. R. Press, P. Muschik, S. Biancalana, WO 9640760, Eur. Patent 0835259 *Iodine-containing peptides and their use as X-ray contrast media*.
- [20] N. Schlichter, *Dissertation* FU Berlin **1996**.
- [21] U. Speck, *Kontrastmittel*, Springer Verlag Berlin Heidelberg, **1991**, 36 - 58.
- [22] U. Speck, *Kontrastmittel*, Springer Verlag Berlin Heidelberg, **1991**, 99 - 107.
- [23] U. Speck, *Kontrastmittel*, Springer Verlag Berlin Heidelberg, **1991**, 84 - 98.
- [24] U. Speck, *Kontrastmittel*, Springer Verlag Berlin Heidelberg, **1991**, 26 - 29.
- [25] M. Kormano, P. B. Dean, *Radiology* **1976**, *121*, 379 - 382.
- [26] V. S. Trubetskoy, G. S. Gazelle, G. L. Wolf, V. P. Torchilin, *J. Drug Target* **1997**, *4*, 381 - 388.
- [27] E. W. Buhleier, W. Wehner, F. Vögtle, *Synthesis* **1978**, 155 - 158.
- [28] G. R. Newkome, Z.-Q. Yao, G. R. Baker, K. J. Gupta, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2003 - 2004.
- [29] C. Wörner, R. Mülhaupt, *Angew. Chem.* **1993**, *103*, 1367 - 1370; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1306 - 1308.
- [30] E. M. M. de Brabander-van den Berg, A. Nijenhuis, M. Mure, J. Keulen, R. Reintjens, F. Vandenbooren, B. Bosman, R. de Raat, T. Frijns, S. v. d. Wal, M. Castelijns, J. Put, E. W. Meijer, *Macromol. Symp.* **1994**, *77*, 51 - 62.
- [31] C. J. Hawker, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7638 - 7647.
- [32] C. J. Hawker, J. M. J. Fréchet, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 1010 - 1013.
- [33] J. C. Hummelen, J. L. J. van Dongen, E. W. Meijer, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1489 - 1493.
- [34] H. Frey, K. Lorenz, C. Lach, *Chem. unserer Zeit* **1996**, *2*, 75 - 85.
- [35] A. Topp, B. J. Bauer, Ty. J. Prosa, R. Scherrenberg, E. J. Amis, *Macromolecules* **1999**, *32*, 8923 - 8931.
- [36] H.-G. Elias, *An Introduction to Polymer Science*, VCH Weinheim **1997**, 24 - 27.
- [37] M. D. Lechner, K. Gehrke, E. H. Nordmeier, *Makromolekulare Chemie*, Birkhäuser Verlag Basel, Boston, Berlin **1996**, 13 - 14.

-
- [38] J. F. G. A. Jansen, E. M. M. de Brabander-van den Berg, E. W. Meijer, *Science* **1994**, 266, 1226 - 1229.
- [39] J. F. G. A. Jansen, E. W. Meijer, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 4417 - 4418.
- [40] P. Miklis, T. Çagin, W. A. Goddard, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 7458 - 7462.
- [41] H. Brunner, *J. Organomet. Chem.* **1995**, 500, 39 - 46.
- [42] P. B. Rheiner, H. Sellner, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 2027 - 2032.
- [43] J.-J. Lee, W. T. Ford, J. A. Moore, Y. Li, *Macromolecules* **1994**, 27, 4632 - 4634.
- [44] M. T. Reetz, G. Lohmer, R. Schwickardi, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 1559 - 1562; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1526 - 1529.
- [45] R. Roy, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, 6, 692 - 702.
- [46] T. K. Lindhorst, C. Kieburg, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 2083 - 2086; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1953 - 1956.
- [47] B. Colonna, V. D. Harding, S. A. Nepogodiev, F. M. Raymo, N. Spencer, J. F. Stoddart, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 1244 - 1254.
- [48] P. R. Ashton, S. E. Boyd, C. L. Brown, S. A. Nepogodiev, E. W. Meijer, H. W. I. Peerlings, J. F. Stoddart, *Chem. Eur. J.* **1997**, 3, 974 - 984.
- [49] E. C. Wiener, M. W. Brechbiel, H. Brothers, R. L. Magin, O. A. Gansow, D. A. Tomalia, P. C. Lauterburg, *Magn. Reson. Med.* **1994**, 31, 1 - 8.
- [50] E. C. Wiener, M. W. Brechbiel, O. A. Gansow, G. Foley, P. C. Lauterbur, *Polym Mater. Sci. Eng.* **1997**, 77, 193 - 194.
- [51] H. Kobayashi, N. Sato, S. Kawamoto, T. Saga, A. Hiraga, T. L. Hague, T. Ishimori, J. Konishi, K. Togashi, M. W. Brechbiel, *Bioconjugate Chem.* **2001**, 12, 100 - 107.
- [52] B. Radüchel, H. Schmitt-Willich, J. Platzek, W. Ebert, T. Frenzel, B. Misselwitz, H. J. Weinmann, 216th ACS National Meeting, Boston **1998**, August 23 - 27.
- [53] J. Tacke, G. Adam, H. Classen, A. Mühler, R. W. Günther, *J. Magn. Reson. Imaging* **1997**, 7, 678 - 682.
- [54] M. Y. Su, A. Mühler, X. Lao, O. Nalcioglu, *Magn. Reson. Med.* **1998**, 39, 259 - 269.
- [55] G. Adam, A. Mühler, E. Spüntrup, J. M. Neuerburg, M. Kilbinger, H. Bauer, L. Fücezi, W. Küpper, R. W. Günther, *Invest. Radiol.* **1996**, 31, 267 - 274.
- [56] W. Krause, F. K. Maier, M. Bauer, G. Schuhmann-Giampieri, W.-R. Press, Schering AG, *Kaskadenmoleküle mit Iodaromaten*, Offenlegungsschrift DE 4344464 A1, **1995**.
- [57] Schering AG, Berlin unveröffentlichte Ergebnisse.

- [58] R. B. Greenwald, A. Pendri, C. D. Conover, C. Lee, Y. H. Choe, C. Gilbert, A. Martinez, J. Xia, D. Wu, M. Hsue, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 551 - 562.
- [59] M. Lemaire, F. Posadra, J.-G. Gourcy, G. Jeminet, *Synthesis* **1995**, 627 - 629.
- [60] F. S. Gibson, M. S. Park, H. Rapoport, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7503 - 7507.
- [61] M. D. Lechner, K. Gehrke, E. H. Nordmeier, *Makromolekulare Chemie*, Birkhäuser Verlag Basel **1996**, 295 - 299.
- [62] J. Springer, *Methoden zur Bestimmung von Molmassen und Molmassenverteilungen*, aus Becker/ Braun *Kunststoff-Handbuch*, Bd. 1 Die Kunststoffe, Carl Hanser Verlag München **1990**.
- [63] W. W. Yau, J. J. Kirkland, D. D. Bly, *Modern Size Exclusion Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, New York **1979**.
- [64] H.-G. Elias, *An Introduction to Polymer Science*, VCH Weinheim **1997**, 32 - 34.
- [65] Y. Mengerink, E. M. M. de Brabander, S. J. Van der Wal, *J. Chromatogr. A.* **1996**, *730*, 75 - 81.
- [66] H.-G. Elias, *An Introduction to Polymer Science*, VCH Weinheim, **1997**, 170 - 175.
- [67] M. D. Lechner, K. Gehrke, E. H. Nordmeier, *Makromolekulare Chemie*, Birkhäuser Verlag Basel, Boston, Berlin **1996**, 237 - 256.
- [68] J. Springer, *Einführung in die Theorie der Lichtstreuung verdünnter Lösungen großer Moleküle*, Applied Research Laboratories **1970**, 7 - 29.
- [69] P. Kratochvíl, *Classical Light Scattering from Polymer Solutions*, *Polymer Science Library 5*, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam **1987**, 77 - 92.
- [70] W. Burchard, *Chimia* **1985**, *39*, 10 - 18.
- [71] M. D. Lechner, K. Gehrke, E. H. Nordmeier, *Makromolekulare Chemie*, Birkhäuser Verlag Basel **1996**, 264 - 268.
- [72] B. J. Berne, R. Pecora, *Dynamic Light Scattering*, Wiley, New York **1976**.
- [73] I. B. Rietveld, J. A. M. Smit, *Macromolecules* **1999**, *32*, 4608 - 4614.
- [74] H. D. Dörfler, *Grenzflächen und Kolloidchemie*, VCH Weinheim **1994**, Kap. 15.
- [75] R. Scherrenberg, B. Coussens, P. van Vliet, G. Edouard, J. Brackman, E. de Brabander, K. Mortensen, *Macromolecules* **1998**, *31*, 456 - 461.
- [76] O. Kratky, H. Leopold, H. Stabinger, *Z. angew. Phys.* **1969**, *27*, 273 - 277.
- [77] R. Westermeier, *Electrophoresis in Practice*, VCH Weinheim **1997**.
- [78] A. L. Shapiro, E. Viñuela, J. V. Maizel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *28*, 815 - 822.

-
- [79] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, 227, 680 - 685.
- [80] J. Buitenhuis, TU Berlin, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [81] M. Selimovic, *Synthese und Charakterisierung von dendritischen Polylysinen für die Anwendung in der Röntgendiagnostik*, Dissertation TU Berlin **2001**.
- [82] E. Mutschler, *Arzneimittelwirkungen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 7. Auflage **1997**, 561 - 565.
- [83] K. M. R. Pillai, G. Diamantidis, L. Duncan, R. S. Ranganathan, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 1344 - 1350.
- [84] F. S. Gibson, M. S. Park, H. Rapoport, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 7503 - 7507.
- [85] M. Hesse, H. Meier, B. Zeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme Verlag Stuttgart, New York, **1995**.
- [86] R. B. Greenwald, A. Pendri, C. D. Conover, C. Lee, Y. H. Choe, C. Gilbert, A. Martinez, J. Xia, D. Wu, M. Hsue, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 551 - 562.
- [87] T. Terasawa, T. Okada, *J. Org. Chem.* **1977**, 42, 1163 - 1169.
- [88] S. Sugai, H. Ikawa, Y. Hasegawa, S. Yoshida, T. Kutsuma, S. Akaboshi, *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, 32, 967 - 976.
- [89] M. A. Williams, H. Rapoport, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 1151 - 1158.