

Dendritische Polymere

Reversible Vernetzung von hyperverzweigten Polymeren: eine Strategie zur kombinatorischen Dekorierung multivalenter Gerüste**

Michael Barth, Rainer Fischer, Roland Brock und
Jörg Rademann*

Funktionale Polymere im Nanometerbereich können biomedizinische Prozesse wie die Immunisierung, Transfektion, Adhäsion und Wirkstoff-Aufnahme steuern.^[1] Multivalente Gerüste, darunter lineare oder verzweigte Polymere und Dendrimere, waren besonders nützlich in solchen Anwendungen.^[2] Die Polymere wurden für die mehrfache Präsentation einzelner Liganden zur Verstärkung schwach affiner Bindungen verwendet.^[3] Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass dendritische Strukturen *in vivo* wesentlich stabiler gegen Proteolyse waren als die entsprechenden monovalenten Liganden.^[4]

[*] Prof. Dr. J. Rademann
Medizinische Chemie
Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-9479-3280
E-mail: rademann@fmp-berlin.de
und

Institut für Chemie
Freie Universität Berlin
Takustraße 3, 14195 Berlin (Deutschland)

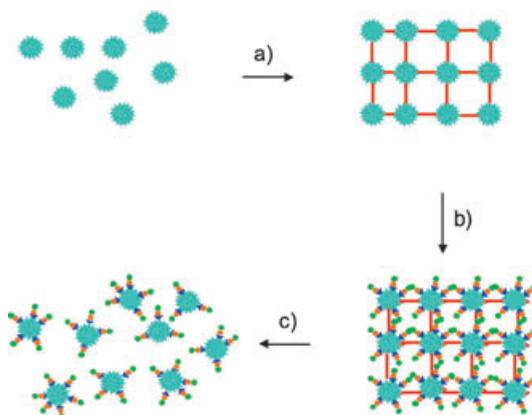
Dipl.-Chem. M. Barth
Institut für Organische Chemie
Eberhard Karls Universität Tübingen
Auf der Morgenstelle 18, 72076 Tübingen (Deutschland)
Dipl.-Biochem. R. Fischer, Dr. R. Brock
Interfakultäres Institut für Zellbiologie
Eberhard Karls Universität Tübingen
Auf der Morgenstelle 15, 72076 Tübingen (Deutschland)

[**] Wir danken der DFG für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit (Graduiertenkolleg „Chemie in Interphasen, Projekt 6“, Stipendium für M.B.) und Dr. Volker Braig (BASF AG) für die Durchführung der Gelpermeationschromatographie.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Während einfache, nichtdekorierte Polymere leicht zugänglich sind,^[5] ist die Synthese chemisch modifizierter Polymere mit spezifischer biologischer Aktivität sehr viel aufwändiger. Die Synthese an löslichen Polymeren wurde zwar eingehend untersucht,^[6] erwies sich aber in den meisten Fällen wegen der mühsamen Aufarbeitung und der geringen Ausbeuten als ineffizient. Die einzige praktikable Methode in diesem Bereich ist gegenwärtig die Konjugation der Polymere mit vorgeformten kleinen Molekülen; allerdings sind die Konjugationstechniken auf wenige Kupplungsreaktionen beschränkt und ermöglichen keine starke Variation der Polymerdekoration und -beladung. Für systematische Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen, z.B. bei der biologischen Optimierung von Polymerwirkstoffen, wird die Herstellung und Variation von dekorierten multivalenten Gerüsten mit erhöhtem Durchsatz durch parallele oder kombinatorische Methoden erforderlich sein.

Hier wird eine Strategie vorgestellt, die bisherige Probleme bei der Polymermodifizierung eliminiert und einen flexiblen Zugang zu komplex dekorierten Gerüsten eröffnet (Schema 1). Verzweigte Polymere wurden unter Bildung



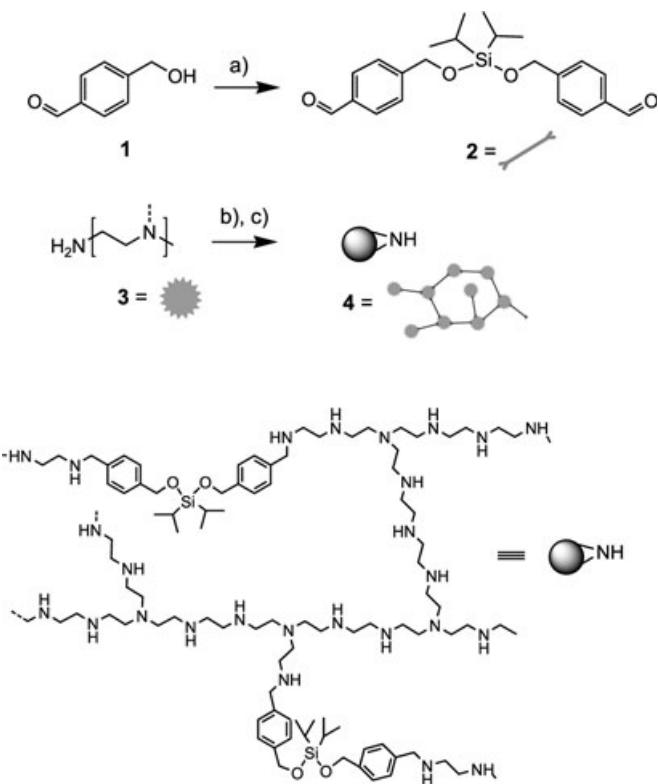
Schema 1. Reversibel vernetzte, hyperverzweigte Polymere ermöglichen die leichte Festphasendekorierung von makromolekularen Strukturen: a) Hochverzweigtes PEI wird zu einem quellfähigen Harz vernetzt, das als robustes Trägermaterial bei der Polymer-unterstützten Synthese fungiert. b) In einer mehrstufigen Festphasensynthese können komplexe Moleküle aufgebaut werden. c) Die Zersetzung des Harzes erfolgt durch die Spaltung der Vernetzermoleküle.

eines quellbaren Polymerharzes vernetzt, das sich als robustes Trägermaterial für die Festphasensynthese eignet (Schema 1, oben). Mithilfe der einfachen Polymer-unterstützten Synthese wurde in mehreren Stufen auf jedem Makromolekül eine Reihe identischer Zielmoleküle aufgebaut. Anschließend wurden die Vernetzereinheiten des polymeren Trägers gespalten und so die dekorierten Polymergerüste freigesetzt. (Schema 1, unten).

Stark verzweigtes Polyethylenimin (PEI) wurde als ideales Ausgangsmaterial zur Herstellung eines reversibel vernetzten Harzes gewählt.^[16,17] PEI wurde bereits als hyperverzweigte Verbindung in mehreren biologischen Anwendungen, z.B. in der In-vivo-Transfektion, angewendet.^[7] Kürzlich wurde gezeigt, dass PEIs gut für den Aufbau ultra-hochbeladener Polymerträger (Ultraharze) geeignet sind, die in der

organischen Synthese und als Polymerreagentien verwendet wurden.^[8–10]

Die Spaltung des Vernetzermoleküls muss streng orthogonal verlaufen, um ein robustes Trägermaterial aus reversibel vernetzten, hyperverzweigten Polymeren zu erhalten. Die Wahl fiel auf den Dialdehyd **2** mit einer Dialkoxy-silanfunktion. Reversibel vernetzte Harze wurden durch Polykondensation von stark verzweigtem PEI (**3**; $M_n = 10000$, $M_w = 25000$, Polydispersität = 2.5) mit **2** erhalten (Schema 2). Die



Schema 2. Der Vernetzer **2** wurde ausgehend von **1** synthetisiert und zur Konstruktion der polymeren Träger **4** verwendet. a) Diisopropylchlorosilan, Pyridin, 1 h, 60 °C. b) **2**, THF, 4 h, RT. c) Natriumborhydrid, THF/MeOH 2:1, 16 h, RT.

Konzentrationen von PEI und **2** waren entscheidend zum Erreichen einer homogenen Vernetzung und hoher Ausbeuten. Das Harz **4** wurde durch ^1H -MAS-NMR-Spektroskopie, FT-ATR-IR-Spektroskopie und Elementaranalyse charakterisiert (MAS = magic angle spinning, ATR = attenuated total reflection). Seine Zersetzung erfolgte durch die Spaltung der Silicium-Sauerstoff-Bindungen im Vernetzermolekül mit Säure (50% Trifluoressigsäure in Dichlormethan, 2 h) oder mit Fluorid (1M Tetrabutylammoniumfluorid in THF, 2 h). Die vollständige Zersetzung wurde durch Gelpermeationschromatographie (GPC) nachgewiesen, die ein PEI-Produkt mit dem gleichen M_n -Wert wie das Ausgangspolymer zeigte (Abbildung 1).

Das Harz **4** wurde in der Festphasensynthese eingesetzt (Schema 3). Die Peptidsynthese wurde direkt auf den sekundären Aminen des Trägers durchgeführt, wodurch das Harz **5** erhalten wurde. Alternativ dazu wurden die Peptidsequenzen

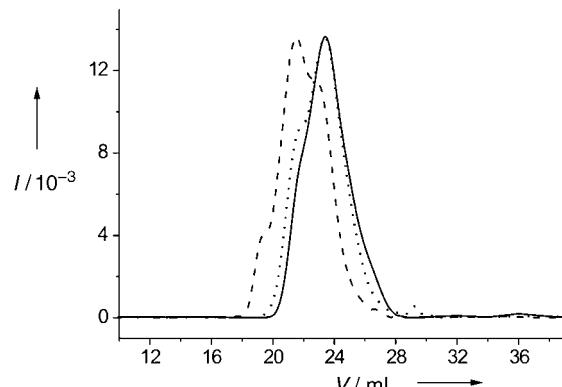


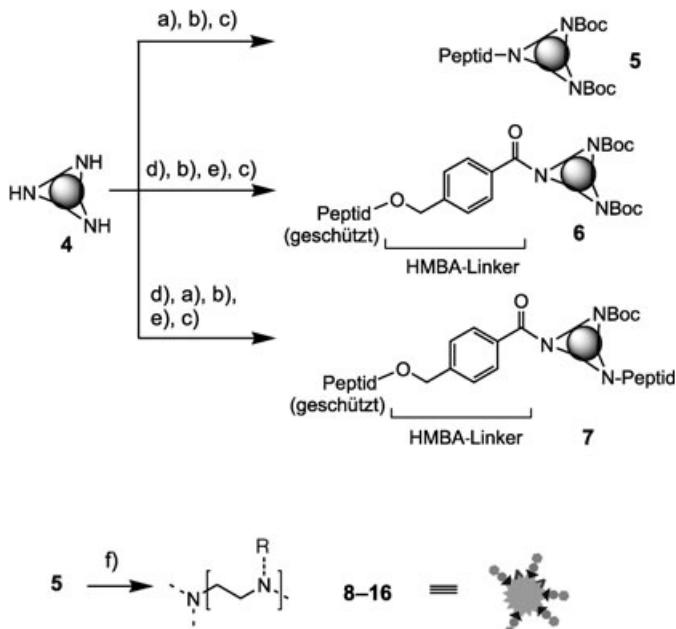
Abbildung 1. GPC von a) dem Ausgangsmaterial PEI (3; $M_n = 10\,000$, $M_w = 25\,000$, durchgezogene Linie), b) PEI aus der Zersetzung von reversibel vernetztem Harz 4 (gepunktete Linie) und c) peptiddekorierter PEI-Polymer 8 ($M_n = 24\,000$, $M_w = 75\,000$, gestrichelte Linie). V: Elutionsvolumen, I: Intensität des Detektorsignals.

an einem 4-Hydroxymethylbenzoësäure(HMBA)-Linker (Harz 6) aufgebaut. Dieser basenlabile Linker ermöglicht die orthogonale Abspaltung der geschützten Peptide vom Harz 6, ohne die Integrität des Harzes zu gefährden, und darüber hinaus die Abspaltung von entschützten Peptiden von den freigesetzten multivalent dekorierten Gerüsten, was von Nutzen für analytische Zwecke oder für spezielle In-vivo-Anwendungen ist. In einer dritten Variante wurde nur ein kleiner Teil der freien Amine mit dem HMBA-Linker gekuppelt, um während der Peptidsynthese durch Teilabspaltung eine analytische Überwachung zu ermöglichen (Harz 7).

Der Peptidgehalt der multivalent dekorierten Gerüste wurde durch die Kupplung einer sub-stoichiometrischen Menge des Linkers oder der ersten Aminosäure mit dem Harz 4 eingestellt; die übrigen sekundären Amine des Polymerrückgrates wurden mithilfe von Boc-Anhydrid geschützt. Benzotriazolyltetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU) wurde zur Aktivierung der Fmoc-Aminosäuren verwendet. Der Syntheseverlauf konnte durch den Kaiser-Test oder die Abspaltung und Entschützung des Endproduktes verfolgt werden.

Um die Eignung des Konzeptes zu demonstrieren, wurden potenziell bioaktive, dekorierte multivalente Gerüste synthetisiert (Tabelle 1). Zu den ausgewählten Peptiden gehören Sequenzen für das intrazelluläre Targeting (dekorierte Gerüste 8 und 9),^[11] B- und T-Zellepitope für die Vakzinierung (10–14) und ein Peptid, das für die Unterbrechung molekulärer Wechselwirkungen bei der Apoptoseregulierung im Cytoplasma beschrieben worden ist (15).^[12] Diese Auswahl repräsentiert ein breites Spektrum an biologischen und biomedizinischen Anwendungen.

Die Harze 5, 6 und 7 wurden unter sauren Bedingungen gespal-



Schema 3. Reversibel vernetztes Harz 4 wurde bei der Synthese von dekorierten, multivalenteren Gerüsten verwendet. a) Fmoc-AS, TBTU, HOBT, DIPEA, DMF. b) Di-*tert*-butyldicarbonat, DIPEA, DMF, 2 × 2 h, RT. c) Peptidsynthese mit Fmoc-Strategie. d) 4-[Acetoxy]methylbenzoësäure, TBTU, HOBT, DIPEA, DMF, 4 h, RT. e) 0.1 M Natriummethanolat in MeOH, 0.5 h, RT. f) 95% Trifluoressigsäure, 2.5% Triisopropylsilan, 2.5% Wasser, 4 h, RT; R = ungeschütztes Peptid, H oder Verzweigung. Boc = *tert*-Butyloxycarbonyl, Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl.

ten (95% Trifluoressigsäure, 2.5% Triisopropylsilan, 2.5% Wasser, 4 h), wobei die Seitenkettenbeschützungsgruppen der Aminosäuren ebenfalls entfernt wurden. Zur Aufarbeitung der dekorierten Polymere konnten Routineverfahren aus der Peptidsynthese verwendet werden. Die wiederholte Fällung der peptidfunktionalisierten Polymere in kaltem Diethylether lieferte reine, dekorierte Polymergerüste und entfernte die nichtflüchtigen Reste der Trityl- und der 2,2,4,6,7-Penta-methyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl(Pbf)-Schutzgruppe, was NMR-spektroskopisch belegt wurde (siehe Hintergrundinformationen).

Tabelle 1: Synthese dekorierten multivalenter Gerüste mit potenziell bioaktiven Peptidsequenzen.

Dekoriertes Gerüst	Sequenz	Harz	Beladung [mmol g ⁻¹]	$M_p^{[a]}$ [g mol ⁻¹]	Reinheit (214 nm) [%]	$M_n^{[b]}$ [g mol ⁻¹]	Kopien pro PEI-Molekül
8	Fluo-PKKRKV	5	1.6	—	—	30 000	16
9	ANWTGPKKRKV	5	1.6	—	—	32 000	16
10	EQPRKFG	5	3.0	—	—	35 000	40
11	MAYPRISVNNG	6	1.8	1234.6	82.5	32 000	18
12	QSQPQPPHPTPYWIG	6	1.8	1745.8	84.3	41 000	18
13	KVSTLPAITLKLGGKG	6	1.8	1595.9	82.5	38 500	18
14	QSQPQPPHPTPYWIG	7	2.2	1745.8	88.3	48 000	22
15	AVPIAQKK(Fluo)G	7	2.2	1088.7 ^[c]	88.3 ^[c]	38 000	22
16	KQAIPVAK(Fluo)G	7	2.2	1088.7 ^[c]	86.6 ^[c]	38 000	22

[a] Masse des Peptidmethylesters. [b] Masse des Produktes. [c] Masse und Reinheit von AVPIAQKK(Dde)G-OMe und KQAIPVAK(Dde)G-OMe. Fluo = 5(6)-Carboxyfluorescein

Um die Anwendbarkeit der so erhaltenen, peptiddekorierten Polymergerüste in biologischen Systemen zu prüfen, wurde die zelluläre Aufnahme durch konfokale Mikroskopie lebender Zellen untersucht. Eingesetzt wurde das dekorierte Gerüst **8**, das die Fluorescein-markierte Kernlokalisierungssequenz Fluo-PKKRKV trägt. HeLa-Zellen wurden mit **8** (400 nm) zwei Stunden lang bei 37°C inkubiert. Sowohl eine deutliche vesikuläre Anfärbung als auch eine homogene Lokalisation in Cytoplasma und Zellkern wurden beobachtet (Abbildung 2). Die vesikuläre Anfärbung colokalisiert mit

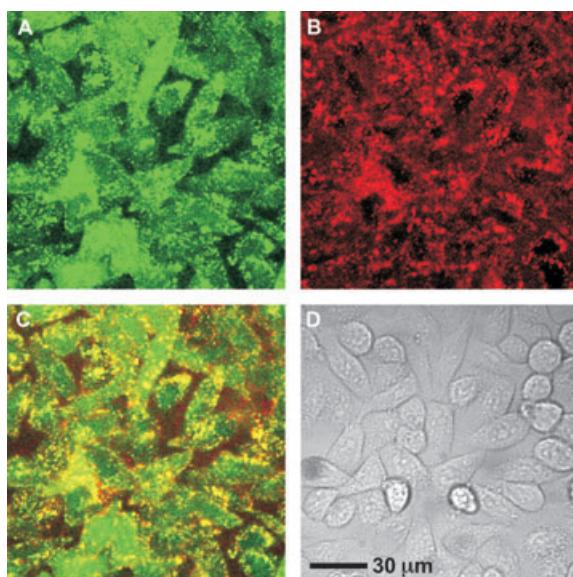


Abbildung 2. HeLa-Zellen wurden in serumfreiem Medium mit dem Fluorescein-markierten peptiddekorierten Dendrimer **8** (400 nm) und AlexaFluor-647-Dextran (10 µm) 2 h inkubiert, gewaschen und mit konfokaler Mehrkanal-Laserscanning-Mikroskopie untersucht. A) Fluoresceinfluoreszenz, B) AlexaFluor-647-Dextran-Fruoreszenz, C) Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle, D) Transmissionsabbildung.

hochmolekularen Dextranen (10000 Da), die bekanntlich durch Flüssigphasenendocytose internalisiert werden.^[13] Die beobachtete subzelluläre Verteilung ist typisch für eine Aufnahme durch Endocytose, gefolgt von einer Freisetzung aus den endosomalen Kompartimenten. Die Lokalisation in Cytoplasma und Zellkern konnte durch Inkubierung mit Bafilomycin A1 inhibiert werden, einem hochpotenten und selektiven Inhibitor der vakuolären H⁺-ATPasen (siehe Hintergrundinformationen).^[14] Die Homogenität der Aufnahme bezogen auf die gesamte Zellpopulation sowie die zelluläre Toxizität von **8** wurden mittels Durchflusscytometrie untersucht. Im Ergebnis führte bereits eine geringe Konzentration von **8** (50 nm) zu einer homogenen Inkorporierung in die Zellpopulation.^[15] Es wurde auch bei höheren Konzentrationen (bis 1 µm) keine Toxizität beobachtet (Daten in den Hintergrundinformationen).

Reversibel vernetzte Harze aus hyperverzweigten Polymeren sind leistungsfähige neue Werkzeuge zur Herstellung dekorierter multivalenter Gerüste. Durch die Verwendung von Festphasenmethoden kann die vorteilhafte Polymerunterstützte Synthese mit der erleichterten Reaktionskon-

trolle konventioneller Synthesen verbunden werden. Analytik ist sowohl am Harz (on-bead) wie auch in Lösung (off-bead) möglich. Die Verwendung dieser Harze macht den Einsatz kombinatorischer Methoden wie der Parallelsynthese, Automatisierung und Split-and-Mix-Operationen zur Dekoration von makromolekularen Strukturen möglich. Es konnte hier gezeigt werden, dass die erhaltenen multivalente Gerüste für Anwendungen in Zellsystemen geeignet sind. So wurde **8** homogen in die gesamte Zellpopulation inkorporiert. In weiteren Studien muss dieses Konzept nun bei der Entwicklung und Optimierung biologisch aktiver Polymere eingesetzt werden, die Funktionen im Cytoplasma oder in spezifischen Organellen eukaryontischer Zellen ausüben.

Experimentelles

Synthese von **4**: Polyethylenimin ($M_n = 10000$, $M_w = 25000$, 1.25 g) wurde in THF (6.1 mL) gelöst und schnell mit einer Lösung von **2** (0.495 g, 1.29 mmol) in THF (4.6 mL) versetzt. Nach einer Minute bildete sich das Polymer. Nach 4 h wurde das Polymer zerstoßen, mit THF gewaschen und in THF/MeOH (2:1, 24 mL) suspendiert. Natriumborhydrid (0.097 g, 2.56 mmol) wurde zugegeben und die Suspension 16 h bei RT geschüttelt. Das Polymer wurde mit THF und MeOH gewaschen, durch ein Sieb gedrückt (400-µm-Poren), mit MeOH und CH₂Cl₂ gewaschen und im Vakuum zum Harz **4** getrocknet (1.5 g, 89%). Elementaranalyse: C 55.6, H 9.7, N 21.0. ¹H-MAS-NMR (400 MHz, MeOD, Rotationsfrequenz 4500 Hz): $\delta = 0.9\text{--}1.2$ (m, Isopropyl, rel. Integral 16.7), 2.2–3.0 (m, PEI-CH₂, 100), 3.72 (br.s, sec-N-CH₂-Aryl, 2.52), 4.56 (br.s, *tert*-N-CH₂-Aryl, 0.53) 7.2–7.5 ppm (br.s, H_{Ar}, 6.51). FT-ATR-IR: $\tilde{\nu} = 815, 1063, 1090, 1461, 1572, 2815, 2932, 3277 \text{ cm}^{-1}$.

Generelle Vorschrift zur Synthese von peptiddekorierten Polymergerüsten: Fmoc-Glycin (446 mg, 1.5 mmol) wurde mit TBTU (482 mg, 1.5 mmol), *N*-Hydroxybenzotriazol (HOBT; 230 mg, 1.5 mmol) und *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA; 257 µL, 1.5 mmol) in DMF auf Harz **4** (100 mg) gekuppelt. Nach 4 h wurde das Harz mit DMF und CH₂Cl₂ gewaschen und im Vakuum getrocknet. Freie Amine auf dem Harz wurden mit Di-*tert*-butyldicarbonat (1.1 g, 5 mmol) und DIPEA (1.7 mL, 10 mmol) in DMF (2 × 2 h) bei RT geschützt. Die Abwesenheit primärer und sekundärer Amine wurde durch den Kaiser- und den Chloranil-Test nachgewiesen. Die Beladung des Harzes wurde photospektrometrisch durch die Abspaltung der Fmoc-Gruppe vom Harz bestimmt.

Peptide wurden mit der Fmoc-Strategie synthetisiert, dabei wurden je vier Äquivalente der Aminosäure (bezogen auf die Ursprungsbeladung mit der ersten Aminosäure), TBTU, HOBT und DIPEA in DMF verwendet (90 min). Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe wurde mit 20% Piperidin in DMF (2 × 8 min) durchgeführt. Die Vollständigkeit der Acylierungen wurde durch den Kaiser-Test bestimmt.

Die Zersetzung des Harzes und zugleich die Entschützung der Aminosäureseitenketten wurde durch Versetzen mit 95% Trifluoressigsäure (TFA), 2.5% H₂O und 2.5% Triisopropylsilan für 4 h bei RT erreicht. Die Lösung wurde filtriert und der Filter mit TFA gewaschen. Die Lösungsmittel der gesammelten Filtrate wurden im Vakuum entfernt. Nach der Fällung mit kaltem Diethylether (viermal) wurden die löslichen peptiddekorierten Polymergerüste lyophilisiert (*tert*-Butanol/Wasser 4:1).

Eingegangen am 5. Mai 2004,
veränderte Fassung am 23. August 2004
Online veröffentlicht am 2. Februar 2005

Stichwörter: Festphasensynthesen · Kombinatorische Chemie · Peptide · Polymere · Wirkstoff-Aufnahme

-
- [1] a) R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 347–360; b) U. Boas, P. M. H. Heegaard, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 43–63;
 - c) M. J. Cloninger, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 742–748;
 - d) S.-E. Stiriba, H. Frey, R. Haag, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1385–1390; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1329–1334.
 - [2] J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 5409–5413.
 - [3] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908–2953; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2755–2794.
 - [4] L. Bracci, C. Falciani, B. Lelli, L. Lozzi, Y. Runci, A. Pini, M. G. De Montis, A. Tagliamonte, P. Neri, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46590–46595.
 - [5] a) G. R. Newcome, C. N. Moorefield, F. Vögtle, *Dendrimers and Dendrons*, Wiley-VCH, Weinheim **2001**; b) *Dendrimers and other dendritic Polymers* (Hrsg.: J. M. J. Fréchet, D. A. Tomalia), Wiley, Chichester, **2001**.
 - [6] Ursprünglich wurden lösliche Polymere mit Polyolen umgesetzt:
 - a) M. Mutter, E. Bayer, *Angew. Chem.* **1974**, *86*, 101–102; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1974**, *13*, 88–89; b) E. Bayer, A. Geckeler, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1974**, 1671–1674; c) R. Haag, A. Sunder, A. Hebel, S. Roller, *J. Comb. Chem.* **2002**, *4*, 112–119.
 - [7] K. Aoki, S. Furuhata, K. Hatanaka, M. Maeda, J.-S. Remy, J.-P. Behr, M. Terada, T. Yoshida, *Gene Ther.* **2001**, *8*, 508–514.
 - [8] M. Barth, J. Rademann, *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 340–349.
 - [9] J. Rademann, M. Barth, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3087–3090; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2975–2978.
 - [10] M. Barth, S. T. Ali Shah, J. Rademann, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 8703–8709.
 - [11] D. A. Jans, C.-Y. Xiao, M. H. C. Lam, *Bioessays* **2000**, *22*, 532–544.
 - [12] C. R. Arnt, M. V. Chiorean, M. P. Heldebrant, G. J. Gores, S. H. Kaufmann, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 44236–44243.
 - [13] C. Plank, B. Oberhauser, K. Mechtler, C. Koch, E. Wagner, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 12918–12924.
 - [14] a) E. J. Bowman, A. Siebers, K. Altendorf, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 7972–7976; b) T. Merdan, K. Kunath, D. Fischer, J. Kopecek, T. Kissel, *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 140–147.
 - [15] Zum Vergleich: Kürzlich wurden 50 µM eines Fluorophor-markierten trimeren Peptides verwendet, um eine detektierbare Inkorporation in HeLa-Zellen zu erreichen: J. Fernandez-Carneado, M. J. Kogan, S. Castel, E. Giralt, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1847–1850; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1811–1814.
 - [16] Die Zersetzung eines makroskopischen Polymers zu einer modifizierten, multivalennten Struktur, die in diesem Artikel beschrieben wird, ist klar von den zahlreichen Arbeiten über enzymatisch oder chemisch gespaltene Dendrimere zu unterscheiden: „Spaltbare Dendrimere“ werden in ihre monomeren Bausteine zerlegt und verlieren dabei ihren multivalennten Charakter. Zwei aktuelle Beispiele über getriggerte Dendrimer-spaltungen: a) F. M. H. de Groot, C. Albrecht, R. Koekkoek, P. H. Beusker, H. W. Scheeren, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4628–4632; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4490–4494; b) J. R. Amir, N. Pessah, M. Shamis, D. Shabat, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4632–4636; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4494–4499.
 - [17] Polyethylenimin wurde gewählt, da es das günstigste kommerziell erhältliche Ausgangspolymer war. Im Prinzip sollte die Vorschrift für andere verzweigte Polyamine und für Amindendrimere in gleicher Weise anwendbar sein.