

**Entwicklung und Anwendung eines zellspezifischen Transfektionsvektors auf
Peptidbasis**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

-Dr. rer. nat.-

vorgelegt von:

Thies Dirksmeyer

geboren in Essen

vorgelegt der

Fakultät für Chemie der Universität Duisburg-Essen, Campus Essen

2022

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/78134

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20230627-141747-5

Alle Rechte vorbehalten.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst habe. Bei der Abfassung der Dissertation wurden nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet. Des Weiteren erkläre ich, dass keine Promotionsverfahren in diesem oder einem anderen Fach endgültig gescheitert sind und dass die vorliegende Dissertation nur in diesem Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Thies Dirksmeyer

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse wurden von Februar 2019 bis März 2022 unter der Betreuung von Dr. Christoph Hirschhäuser und Prof. Dr. Carsten Schmuck an der Fakultät für Chemie der Universität Duisburg-Essen angefertigt.

Erstgutachter: Dr. C. Hirschhäuser

Zweitgutachter: Prof. Dr. M. Giese

Vorsitzender: Prof. Dr. E. Hasselbrink

Tag der Disputation: 24.02.2023

Danksagung

Im folgenden möchte ich mich bei den Personen bedanken, die dazu beigetragen haben, meine Promotion mit dieser Arbeit zu beenden.

Zu Beginn möchte ich mich bei Prof. Dr. Carsten Schmuck bedanken für die Möglichkeit in der Gruppe des Arbeitskreises diese Arbeit zu beginnen. Leider bist du schon zu früh von uns gegangen, um das Ende der Arbeit noch miterleben zu können. Dennoch haben wir versucht deine Ideen umzusetzen und deinen Vorstellungen Best möglichst gerecht zu werden. Ich hoffe, dass diese Arbeit deinem Vorbild entspricht.

Mein größter Dank gilt Dr. Christoph Hirschhäuser, der mich in seine Gruppe aufgenommen, betreut und beraten hat. Danke, dass du mir und auch alle anderen Personen, die von dem Schicksalsschlag betroffen waren geholfen hast. Des Weiteren möchte ich dir dafür danken, dass du mir viel Freiheit in der Gestaltung meiner Arbeit gelassen hast und ich immer eine offene Tür für Fragen und Probleme vorfinde.

Vielen Dank für alles!

Ich möchte mich auch sehr herzlich bei Prof. Dr. Michael Giese bedanken, der die Übernahme des Zweitgutachtens übernommen hat. Des Weiteren gilt die besonderer Dank für die organisatorischen Aufgaben, die du für den Arbeitskreis übernommen hast und dennoch immer offen für Fragen und Hilfestellungen jeglicher Art warst. Vielen Dank für die netten und offenen Gespräche „zwischen Tür und Angel“.

Vielen Dank gilt auch Jun.-Prof. Dr. Jens Voskuhl für deine Freundschaft und die Zeit die wir in den letzten drei Jahren zusammen verbracht haben.

Ich möchte mich auch sehr herzlich bei Prof. Dr. Jochen Niemeyer bedanken, für die organisatorischen Tätigkeiten, die du in der vierten Etage übernommen hast. Besonderer Dank gilt dir für die Übernahme des Antrags auf das Promotionsstipendium. Ohne dich hätte ich sicherlich nicht am Arbeitskreis promovieren können.

Mein persönlicher Dank gilt des Weiteren all meinen Arbeitskollegen und Mitpromovierenden, die mir stets geholfen haben. Hierbei möchte ich mich bei den Personen bedanken, die die mittäglichen Gespräche deutlich erheitert haben und eine feste Gemeinschaften bilden, die ich jetzt Freunde nenne. Dr. Marcel Klein-Hitpaß möchte ich sehr für die Korrektur der Arbeit danken, für Freundschaft und nette Unterhaltungen im Laboralltag.

Ich möchte mich auch bei den Mitgliedern des Arbeitskreises Knauer bedanken für die nette Zusammenarbeit mit Dr. Cecilia Vallet und Paul Stahl.

Vielen Dank auch an dieser Stelle an Elisabeth Verheggen, die mir die Verantwortung für die Betreuung von drei auszubildenden Chemielaboranten übertragen hat, eine Aufgabe

an der ich persönlich wachsen durfte. Besonderer Dank gilt Rieke Wegener für die tolle Zusammenarbeit.

Ich möchte mich auch bei meinen Eltern Irmgard und Dr. Thomas Dirksmeyer für die gesamte Unterstützung während meines Studiums und der Promotion bedanken. Ohne euch wäre all dies nicht möglich gewesen und ich wäre nicht der, der ich jetzt bin.

Ich möchte mich auch von ganzem Herzen bei Isabel bedanken für viel Geduld und Beistand. Ich weiß, dass es oft stressig und nervenaufreibend war in der letzten Jahren. Ich weiß, dass du immer auf meiner Seite bist und will dich für immer an meiner Seite wissen. Dankeschön

I INHALTSVERZEICHNIS

I	INHALTSVERZEICHNIS	I
II	ABKÜRZUNGEN	III
1	EINLEITUNG	1
1.1	Therapeutika auf Peptidbasis	1
1.2	Grundlagen der Gentransfektion	2
1.2.1	Mechanismen der Gentransfektion	3
1.2.2	Beispiele für Transfektionsvektoren	5
1.3	Entwicklungen zu einer gesteigerten Zellspezifität	16
1.4	Zellspezifische Gentransfektion	22
1.4.1	Zellselektivität durch ROS und Transferrin	22
1.4.2	Erhöhung der Zellspezifität durch Konjugation mit Folsäure	24
1.4.3	Zellselektive Transfektion durch RGD-Label	25
1.4.4	Zellspezifische Gentransfektion durch Biotin	27
2	AUFGABENSTELLUNG	30
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	36
3.1	Auslotung und Analyse von Struktur-Wirkungsbeziehungen	36
3.1.1	Evaluation des ersten Prototypen	36
3.1.2	Synthese von ausgewählten Peptiden zur Evaluation von Struktur-Wirkungsbeziehungen	46
3.2	Synthese und erste Tests des finalen Vektors	41
3.2.1	Optimierung des Biotinlabels	64
3.3	Re-evaluation bisheriger Ergebnisse durch Änderung der Probenvorbereitung	68
3.3.1	Anpassung der Probenvorbereitung	68
3.3.2	Physikochemische Evaluation der Probenvorbereitung	69
3.4	Optimierung des Transfektionsprotokolls und abschließende Ergebnisse des zellselektiven Vektors	41
3.4.1	Selektive Transfektion ausgewählter Zelllinien	80

Inhaltsverzeichnis

3.4.2	Toxizitätsstudien von 41 an ausgewählten Zelllinien	81
3.4.3	Ausweitung der Transfektionsexperimente	83
3.4.4	Bestätigung für eine Biotin Rezeptor abhängige Aufnahme	84
3.4.5	Synthese der Negativkontrolle 45	85
3.4.6	Erste Transfektionsergebnisse von 45	87
3.4.7	Vergleich physikochemischer Eigenschaften	88
3.4.8	Ermittlung der Toxizität von 45	90
3.4.9	Gesamte Transfektionsergebnisse von 41 und 45	91
3.4.10	Fazit	93
4	ZUSAMMENFASSUNG	94
5	SUMMARY	101
6	EXPERIMENTELLER TEIL	107
6.1	Materialien und Methoden	107
6.1.1	Chemische Analysen und physikochemische Messungen	107
6.1.2	Analysen und Messungen mit biologischer Relevanz	109
6.2	Synthese	111
6.2.1	Peptidsynthesen	111
6.2.2	Synthesen der Linkereinheiten	123
6.2.3	Synthesen von weiteren Projekten	127
	LITERATURVERZEICHNIS	144
7	ANHANG	151

II ABKÜRZUNGEN

Ac.	Acetyliert
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AFM	Rasterkraftmikroskopie
AK	Arbeitskreis
analyt.	Analytisch
aq	wässrig
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
BR	Biotinrezeptor
CaPO ₄	Calciumphosphat Nanopartikel
c _{min}	Minimale Konzentration
CPP	<i>engl. Cell penetrating peptide</i>
cRGD	Cyclisches RGD
ctDNA	Kalbthymus DNA
Da	Dalton
DCM	Dichlormethan
DiPEA	Diisopropylethylamin
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMEM	<i>engl. Dulbeccos modified eagle medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxynukleinsäure
DOX	Doxorubicin
dsDNA	Doppelstrang DNA
EB	Ethidiumbromid
EGFR	<i>engl. Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EPR	<i>engl. enhanced permeability and retention</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al	und andere
Exc.	Anregung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FR	Folsäure-Rezeptor
FT-IR	Fourier-transformiertes Infrarotspektroskopie
GCP	Guanidino-Carbonyl-Pyrrol
h	Stunden
HIV	Humanes Immundefizienz Virus

Abkürzungen

HPLC	Hochleistungschromatographie
ICCE	Imaging Center Campus Essen
M	Molar
MeOH	Methanol
min	Minuten
MPLC	<i>engl. Medium Pressure Liquid Chromatography</i>
mRNA	Messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
NEt ₃	Triethylamin
NLS	<i>engl. Nuclear Localization Signal</i>
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
PAMAM	Polyamidoamin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pDNA	Plasmid-DNA
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenamin
PES	Phenazin Ethyl Sulfat
PLL	Poly-L-Lysin
ppm	<i>engl. parts per million</i>
prep	Präparativ
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
RP	Umkehrphase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur (25 °C)
T7	Peptid: HAIYPRH
TAT	Transaktivator für Transkription
Tf	Transferrin
TfR	Transferrin-Rezeptor
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TREN	Tris(2-aminoethyl)amine
ü.N.	über Nacht (16 h)

1 EINLEITUNG

1.1 Therapeutika auf Peptidbasis

Obwohl die Todeszahlen für Krebserkrankungen durch eine bessere Diagnostik und Behandlung sinken^[1] sind diese weiterhin ein Hauptgrund für den frühzeitigen Tod von Menschen in großen Teilen der Welt.^[2] Ein klassisches medizinisches Vorgehen führt nicht nur zu einer Bekämpfung der Krankheit, sondern auch zu Verletzungen gesunden Gewebes.^[3] Eine gezielte Umgehung apoptotischer Mechanismen erschwert die körpereigene Abwehr^[4], was eine spezielle Behandlung notwendig macht.^[5] Bei der Entwicklung von Therapeutika dieser Art können verschiedene molekulare Ansätze als Grundlage dienen, wobei ein stark wachsender Teil auf Peptiden beruht.^[6]

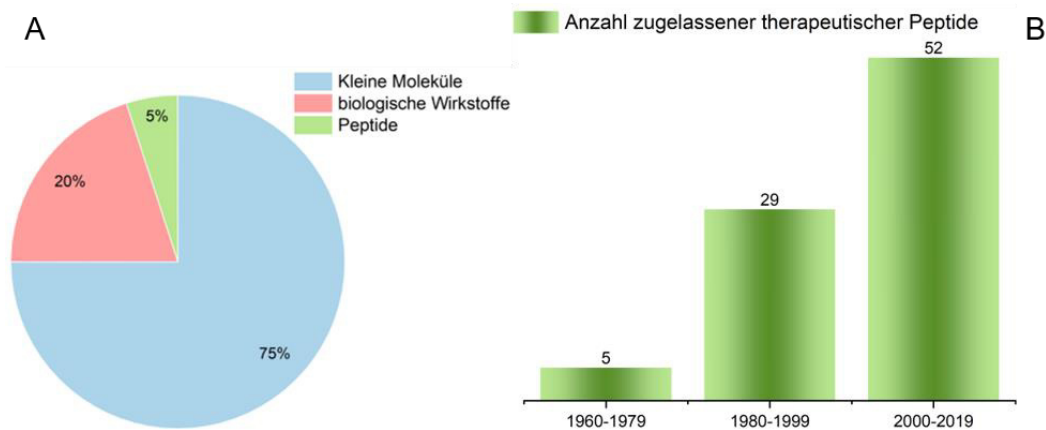


Abbildung 1-1. A) Marktwertanteile allgemeiner Therapeutika; B) Trendentwicklung der zugelassenen therapeutischen Peptide der letzten 50 Jahre; bearbeitet nach Muttenthaler *et al.*^[6]

Wie in **Abbildung 1-1** gezeigt beruht zwar nur ein kleiner Teil bis heute auf Peptidbasis, was für einen Marktwert von 1.2 Milliarden € jedoch einen hohen absoluten Wert ergibt.^[6] Nach der Entwicklung der Festphasenpeptidsynthese durch Merrifield (1963)^[7] wuchs der Anteil der therapeutischen Peptide stark an, was in Teil B der Grafik dargestellt wird.^{[6][8]}

Die Behandlung von Krebs ist mit peptidischen Therapeutika möglich, bei denen jedoch die gezielte Behandlung der Krebszellen weiterhin eine Herausforderung darstellt^[9]. Eine Variante ist das Einbringen von DNA in Zellen, was als Gentransfektion bezeichnet wird.^[10] Das genetische Material kann das Wachstum und das Überleben der Krebszellen beeinflussen und eine Behandlung ermöglichen.^[11] Hierbei ist ein spezielles Ziel nicht alle Zellen im Körper zu behandeln, sondern nur sehr spezifisch die Krebszellen. Um eine Therapie von Krebszellen zu ermöglichen können eine Vielzahl biochemischer Eigenschaften genutzt werden.^[12,13]

1.2 Grundlagen der Gentransfektion

Als Gentransfektion wird der Transport von genetischem Material über die Zellmembran in eukaryotische Zellen bezeichnet.^[14] Hierfür können sowohl Desoxyribonukleinsäuren als auch Ribonukleinsäuren (aus dem englischen DNA und RNA) verwendet werden. Beide sind aus Ribosen aufgebaut, welche über Phosphorsäureester miteinander verknüpft sind. Die 3D-Struktur der DNA, welche von Watson und Crick postuliert wurde, besteht aus einer α -Doppelhelix, wobei die vier Nukleinbasen, Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander wechselwirken (**Abbildung 1-2**).^[15]

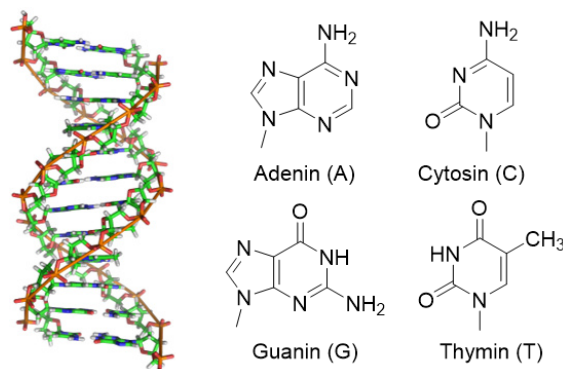


Abbildung 1-2. Darstellung der DNA-Helix und Strukturformeln der vier Nukleinbasen.^[16]

Der Transport von genetischem Material in eine Zelle ist allerdings nicht ohne Hilfe möglich, da zwei Mechanismen dies verhindern. Zum einen ist die DNA, bedingt durch die freien Phosphatgruppen, unter physiologischen Bedingungen, negativ geladen.^[17] Da die Zellmembran ebenfalls ein negatives Oberflächenpotential aufweist, kommt es zur elektrostatischen Abstoßung.^[18,19] Zum anderen kann DNA in der Zelle abgebaut werden, wobei nur eine geringe Halbwertszeit von etwa einer Stunde gemessen werden kann.^[20] Ein Transport zum Zellkern ist ohne Hilfsmittel in dieser Zeit nicht möglich, da die DNA, in Abhängigkeit ihrer Größe, sich nicht durch Diffusion frei bewegen kann.^[21] Aus diesen Gründen können tierische Zellen nicht spontan transfiziert werden. An diesem Punkt greift die Gentransfektion ein, die einen Transport von genetischem Material ermöglicht.^[22,23] Die daraus entstehenden Möglichkeiten für den medizinischen Fachbereich sollen dabei im Folgenden dargestellt werden.^[23]

Durch die Aussicht, DNA zuverlässig in Zellen zu transferieren, könnten erblich bedingte Krankheiten schon von Beginn an behandelt werden.^[24] Die Gabe von Medikamenten zur symptomatischen Therapie würde damit überflüssig werden, da das fehlende oder nicht korrekt abgelesene genetische Material ersetzt werden könnte.^[25] Die daraus entstehende Kausaltherapie für Erkrankungen dieser Art wäre eine Möglichkeit Gentherapie zum Patientenwohl einzusetzen. Im Bereich dieser Behandlungsmethodik können jedoch zwei verschiedene Vorgehensweisen unterschieden werden. Zum einen das, wie bereits

erwähnte, Ersetzen von DNA-Fragmenten, aus denen mittels Transkription und Translation Proteine synthetisiert werden. Grund für die Erkrankung wäre demnach, dass entsprechende Gene nicht, nur gering, oder falsch in diesen Prozess eingebunden werden. Eine Verringerung der Symptomatik oder eine Heilung der Krankheit ist damit folglich möglich.^[26] Um dies zu ermöglichen muss in einem Fall die DNA (z.B. dsDNA oder Plasmide) in den Zellkern der Zellen transportiert werden. Zu ähnlichen Zwecken wird RNA (z.B. mRNA) verwendet, da so kein Kerntransport notwendig ist. Dieses Konzept wurde erfolgreich bei der Entwicklung eines Impfstoffes gegen das SARS-Cov2 Virus eingesetzt.^[27] Das Potenzial dieses Prinzips wurde durch die schnelle Entwicklung und Zulassung des Wirkstoffes deutlich gezeigt.^[28]

Zum anderen besteht die Möglichkeit das Expressieren von Genomen durch therapeutische Gene zu verhindern.^[29] In diesem Fall bindet die therapeutische DNA an zuvor identifizierte Genregionen im Zellkern und kann somit eine gezielte Inhibition ermöglichen. Eben diese Technik kann für die Behandlung von Krebs, aber auch bei anderen dysregulatorischen Erkrankungen eingesetzt werden.^[11,30]

1.2.1 Mechanismen der Gentransfektion

Zum Transport genetischen Materials in tierische Zellen stehen mehrere Möglichkeiten zu Verfügung, welche in diesem Abschnitt beschrieben werden. Ein Krankheitserreger, dessen Existenz von einem erfolgreichen Transport von DNA (Transduktion) abhängt, ist das Virus. Die Übertragung des viralen Genoms in z.B. menschliche Zellen wird entweder durch Endozytose (SV40) oder durch Zellfusion (HIV) ermöglicht.^[31] Die im Anschluss freigesetzte DNA oder RNA inseriert, nach dem Transport in den Zellkern, in das genetische Material des Wirts. Im lytischen Zyklus werden Viren vervielfältigt und freigesetzt oder warten im lysogenen Zyklus, nach Insertion in die Wirts-DNA, auf eine Aktivierung.^[17] Eine Verwendung in der Gentherapie wurde entsprechend an vielen Beispielen getestet.^[32] In diesem Zusammenhang wird das gewünschte Gen in die Vektor DNA bzw. RNA integriert und somit ein potentieller Carrier synthetisiert. Um eine Reproduktion des Vektors in der Zielzelle zu vermeiden werden entsprechende Bestandteile aus dem Vektor entfernt.^[33] Da Viren als Krankheitserreger eine Immunreaktion auslösen führte dies in der Vergangenheit zu Problemen bei Therapieversuchen.^[34] Durch die Bildung von Antikörpern als Abwehrreaktion auf die Infektion, kann der Körper selbst die Therapie behindern. Sollte es schon zuvor zu einem Kontakt mit entsprechenden Viren gekommen sein, kann es auch zu einer Immunisierung kommen, bei der das Immunsystem schneller aktiviert wird.^[35] Ein Therapieerfolg kann somit nicht ermöglicht werden. In bereits durchgeführten klinischen Studien im Bezug auf die Transduktion mit viralen Vektoren, führte die starke Immunreaktion der Patienten zu lebensbedrohlichen Lagen.^[36]

Wie aus diesen Problematiken erkennbar ist, birgt dieses Vorgehen eine Gefahr für die Patienten. Des Weiteren ist auch die Herstellung von viralen Vektoren aufwändig und teuer. Eine Massenproduktion ist daher oftmals schwierig oder mit hohen finanziellen Hürden belegt.^[37]

Im Gegensatz dazu ist die nicht-virale Gentransfektion nicht an bereits bestehende Systeme gebunden und kann daher flexibel auf die jeweiligen Bedürfnisse angepasst werden.^[29] Wie bereits erwähnt ist es nicht möglich die „nackte“ DNA für diese Zwecke zu verwenden, weshalb diese maskiert werden muss. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Methoden entwickelt, um einen Transport der DNA zu ermöglichen.

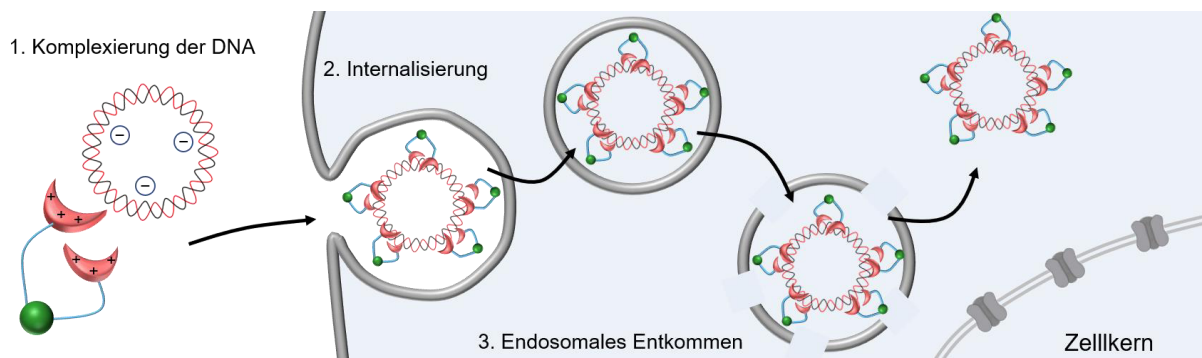


Abbildung 1-3. Verlauf der Gentransfektion eines Plasmid mit Hilfe eines Transfektionsvektors.

Eine grundlegende Eigenschaft von vielen nicht-viralen Transfektionsvektoren ist, dass diese durch elektrostatische Wechselwirkung mit dem Phosphatrückgrat der DNA interagieren.^[38] Die negative Ladung kann durch positive Ladungen am Vektor kompensiert werden (**Abbildung 1-3**). Das so komplexierte genetische Material weist nun nicht nur mehr eine positive Gesamtladung auf, sondern wird auch kondensiert. Die entstehenden Partikel werden je nach Eigenschaft des verwendeten Transfektionsvektors mit unterschiedlichen Begriffen beschrieben. Im einfachen Fall werden diese als Polyplexe bezeichnet und können durch z.B. Endozytose in die Zelle aufgenommen werden, wo nach Abkapseln der Zellmembran das Endosom entsteht. Durch H^+ -Pumpen auf der Oberfläche der Vesikel wird der pH-Wert verringert.^[39] Das Entkommen aus dem Endosomen (englisch: *endosomal escape*) ist ein wichtiger Schritt bei der Transfektion von Zellen, da, sollte dies nicht ermöglicht werden, der Inhalt des Endosoms lysiert wird.^[40] Es werden mehrere Mechanismen diskutiert, durch die der Vektor-DNA-Komplex in das Zytosol freigesetzt wird. Zum einen kann durch z.B. hydrophobe Alkylketten eine Freisetzung ermöglicht werden, da diese sich in die endosomale Membran integrieren und diese aufbrechen.^[41] Eine zweite Möglichkeit kann durch eine zusätzliche Pufferwirkung des Vektors bewirkt werden. Durch die Erhöhung der H^+ -Konzentration steigt die Salzkonzentration im Inneren des Endosoms. Ein Absinken des pH-Werts ist allerdings durch die puffernde Wirkung von z.B. freien Aminen nicht möglich, weshalb Wasser entlang des Konzentrationsgradienten nachfließt.

Dies führt schlussendlich zum Aufreißen der Membran und der Vektor-DNA-Komplex wird in das Zytosol freigesetzt.^[42] Ein nachgewiesener Mechanismus für die Transfektion des Zellkerns ist bis jetzt nicht bekannt und wird noch vielfach in der Literatur diskutiert.^[43] Jedoch spielt der Vektor auch im Zytosol schon eine wichtige Rolle, um das genetische Material gegen einen Abbau durch Nukleasen zu schützen.^[18,44]

1.2.2 Beispiele für Transfektionsvektoren

Ein genereller Aufbau von Transfektionsvektoren lässt sich nur auf wenige Gemeinsamkeiten zwischen den einzelnen Kandidaten zurückführen. Als erster Punkt sind für ausreichende Wechselwirkungen vom Vektor zur DNA kationische Ladungen wichtig. Hierzu können unter anderem quartäre Ammonium-Verbindungen, Guanidine oder Histidine verwendet werden.^[45,46,47] Die Dichte der jeweiligen Ladungen hat einen Einfluss auf die Transfektionseffizienz, beeinflusst jedoch auch die Zytotoxizität.^[48,49] Für eine Zellaufnahme sind hydrophobe Bestandteile förderlich, da diese die Zellmembran für genetisches Material durchlässig machen können.^[29] Hierzu können Steroidgerüste oder Alkylketten verwendet werden und eine Steigerung der Transfektionseffizienzen erreichen.^[50-52] Diese allgemeinen Baupläne für eine erfolgreiche Transfektion sollen im Folgenden durch mehrere Beispiele illustriert werden.

1.2.2.1 Amphiphile Vektoren zur Transfektion

Die Kombination aus DNA-bindenden Eigenschaften und hydrophoben Anteilen führt zu potenten Transfektionsvektoren. Die erfolgreiche Transfektion wird, entsprechend der physikochemischen Eigenschaften, als Lipofektion bezeichnet und ermöglichte bereits ab ca. 1980 einen zuverlässigen Transport exogener DNA in Wirtszellen.^[53] Bestehend aus einem quartären Ammoniumsalz, welches über ein Glycerin-ähnlichen Linker an ein Derivat der Ölsäure gekuppelt wurde, konnte 1987 von Felgner *et al.* DOTMA (**Abbildung 1-4**) synthetisiert und erfolgreich für die Gentransfektion verwendet werden.^[47] Hierbei werden Mizellen aus dem Lipid und der DNA gebildet, welche in Zellen aufgenommen werden können. Dieses Protokoll ermöglichte die Transfektion von tierischen Zellen mit einer höheren Effizienz als bisherige Methoden wie zum Beispiel mit Calciumphosphat.^[29] Durch die weitere Optimierung und Forschung in diesem Bereich konnten Verbesserungen der Transfektionseffizienz und eine Verringerung der Toxizität erreicht werden. Der momentane „Gold-Standard“ im Bereich der Lipofektion, Lipofectamine[®] 2000 von *Invitrogen*, verwendet das polykationische Amphiphil DOSPA.^[54] In einer definierten Formulierung mit DOPE (**Abbildung 1-4**) können so hohe Transfektionseffizienzen in einer breiten Auswahl an Zellen beobachtet werden. Vektoren bilden in Kombination mit genetischem Material Mizellen, deren Struktur durch eine Veränderung des pH-Werts geändert werden kann.

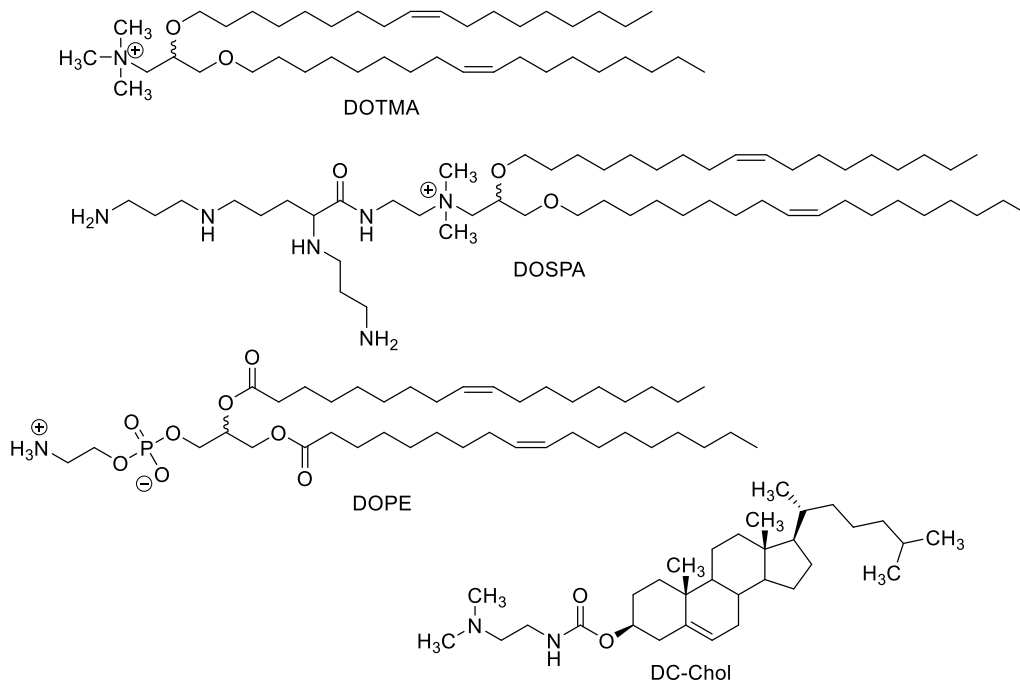


Abbildung 1-4. Strukturformeln literaturbekannter, lipophiler Transfektionsvektoren.^[47,55]

Das Verhältnis aus DNA-binder und Helferlipid (z.B. DOPE) hat einen großen Einfluss auf die Transfektionseffizienz wie Mochizuki *et al.* zeigen konnten.^[56] Neben Ölsäuren als hydrophobe Ketten bei der Lipofektion kann auch ein Sterangerüst, wie zum Beispiel bei DC-Chol eingesetzt werden.^[57] Ebenso wie bei DOSPA kann auch hier die Kombination des Cholesterinderivats mit DOPE eine Transfektion von tierischen Zellen ermöglichen.

Die zuvor beschriebenen Beispiele verschiedener Vektoren mit amphiphilem Charakter können an verschiedenen Punkten gezielt verändert werden. Hierzu zählen die kationische Kopfgruppe, die Verbrückungseinheit und der hydrophobe Anker.

Eine Veränderung des DNA-bindenden Anteils hat einen starken Einfluss auf die Transfektionseigenschaften und den toxischen Einfluss des Vektors auf die Zellen. So zeigen monovalente Vektoren, bei einer Ladungsverteilung durch z.B. die Verwendung von Pyridinium-Kationen, Transfektion und nur eine geringe Toxizität.^[58] Ähnlich hierzu zeigen multivalente Systeme ein ähnliches Prinzip, wobei eine hohe Ladungsdichte einer Steigerung der Transfektionseffizienz hinderlich ist.^[59]

Veränderungen an der Linker-Einheit zwischen DNA-Binder und der hydrophoben Anker eröffnen zusätzliche Funktionen neben der bloßen Verknüpfung der Bestandteile. Als Ansatzpunkt für einen biologischen Abbau können stabile Ether-Funktionen^[60] durch Ester^[61], Carbamate^[62] oder Disulfide^[63] ersetzt werden. Ein Abbau durch die Zellen kann beispielweise von Disulfiden innerhalb des Zytosols durch Glutathion erfolgen und so die Zelltoxizität verringern.

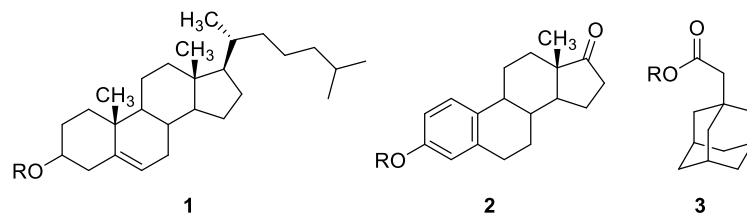


Abbildung 1-5. Strukturformeln verschiedener hydrophober Reste für die Lipofektion.^[64]

Die amphiphilen Vektoren können durch die Variation der hydrophoben Anker (**Abbildung 1-5**) spezifisch angepasst werden. Die bereits gezeigten verschiedenen Alkylketten können in der Kettenlänge angepasst werden. Hierbei kann je nach System eine Verkürzung aber auch eine Verlängerung der Kette zu einer Verbesserung der Transfektionseigenschaften führen.^[48,51,65] In diesem Fall ist demnach kein genauer Trend zu beobachten, wobei häufig Derivate der Ölsäure verwendet werden. Neben flexiblen aliphatischen Ketten, können auch starre hydrophobe Reste, zum Beispiel auf Grundlage eines Sterangerüsts, eingesetzt werden. So konnte zum Beispiel Voskuhl *et al.* eine Transfektion durch die Kombination aus einem Tetraamin und Östron an verschiedenen Zelllinien erreichen.^[52] Adamantan ermöglichte in biologischen Experimenten von Dahlmann *et al.* die Transfektion von T-Zellen, welche um ein Vielfaches höher war als vergleichbare Systeme, welche mit aliphatischen Ketten modifiziert wurden.^[66]

1.2.2.2 Polymere als Basis für die Gentransfektion

Die Synthese von multivalenten Systemen ist auch mit Hilfe von Polymerisationsreaktionen möglich und für eine Anwendung in der Transfektion geeignet. Als der erste Transfektionsvektor auf Polymer Basis wird Poly-L-lysin (PLL, **Abbildung 1-6**) beschrieben, was aus der entsprechenden, natürlichen Aminosäure hergestellt werden kann.^[67] Durch die Biokompatibilität und gute Bindung zu DNA^[68] dieses Vektors war eine Anwendung in der Gentransfektion möglich, wobei allerdings nur eine geringe Effizienz erreicht werden konnte. Dies ist durch ein schlechtes Entkommen aus dem Endosom begründet, wobei durch Zugabe von Chloroquin eine Steigerung der Transfektionseffizienz beobachtet werden konnte.^[69,70] Als schwache Stickstoffbase ermöglicht es durch das Abfangen von Protonen ein besseres endosomales Entkommen.^[71] Die physikochemischen und biologischen Eigenschaften des Polymers können durch Verzweigung oder Funktionalisierung gezielt beeinflusst werden.^[72]

Als eines der wichtigsten Beispiele in der Entwicklung von Transfektionsvektoren auf Polymer Basis ist Polyethylenimin (PEI) (**Abbildung 1-6**) zu nennen.^[73] Dieser aus Aziridin synthetisierte Vektor weist in biologischen Experimenten eine gute Transfektionseffizienz auf.^[74] Der strukturell einfache Aufbau ermöglicht eine breite Spanne an verzweigten (b-PEI) oder linearen (l-PEI) Varianten, die mit unterschiedlichen Molekularmassen verschiedene Eigenschaften aufweisen.^[75] Durch eine hohe Anzahl nicht protonierter Amine kann weiterhin

ein gutes endosomales Entkommen^[76] beobachtet werden, was dazu führt, dass PEI häufig in der nicht-viralen Transfektion verwendet wird. Die Theorie des Proton-sponge-effects wird auch speziell für PEI in der Literatur weiterhin stark diskutiert.^[42,77]

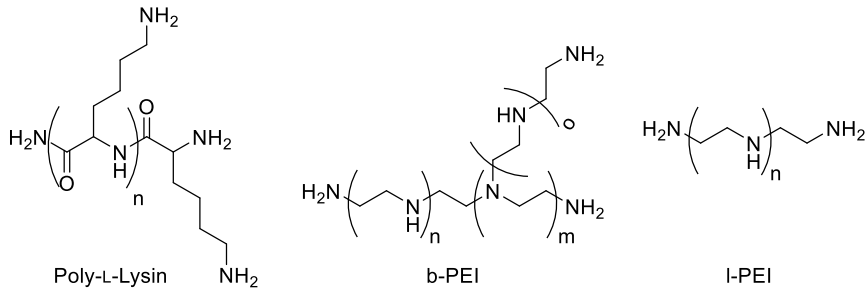


Abbildung 1-6. Strukturformeln polymerbasierter Transfektionsvektoren.

Vektoren auf Kohlenhydratbasis, wie zum Beispiel Chitosan (**Abbildung 1-7**), können ebenfalls für die Gentransfektion eingesetzt werden. Das aus D-glucosamin und N-acetyl-D-glucosamin über β -(1,4) glykosidische Bindungen verknüpfte Polymer weist eine hohe Biokompatibilität auf.^[78] Durch die freien Aminfunktionen, die unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegen ist eine Bindung von DNA möglich, wobei die Transfektionseffizienz auch hier vom Molekulargewicht abhängt. Ein weiterer Faktor ist der Anteil an deacetylierten Aminen des Polymers.^[79] Eine Erhöhung freier Amine führt zu einer besseren DNA-Bindung, verringert jedoch die Transfektionseffizienz, da das genetische Material nicht ausreichend gegen Nukleasen geschützt ist.^[79] In der Literatur wird daher häufig der Anteil der freien Amine angegeben. Eine Derivatisierung des Chitosans wurde vielfältig getestet und so eine Steigerung der Transfektionseffizienz erreicht.

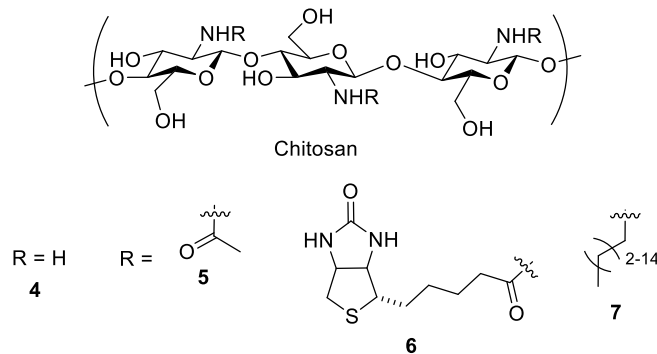


Abbildung 1-7. Strukturformeln von auf Chitosan basierten Transfektionsvektoren.^[79-81]

Neben einer Erhöhung der Ladungsdichte durch das Überführen freier Amine in quartäre Ammoniumsalze^[82], kann mit Biotin (**6**, **Abbildung 1-7**) biotinyliertes Chitosan erhalten werden. Die so erhaltenen Nanopartikel können wie von Cheng *et al.* gezeigt für eine erfolgreiche Transfektion von Leberzellen eingesetzt werden.^[80] Hierbei wurde des weiteren die Selektivität für Zelllinien untersucht, was detaillierter in Kapitel 1.4.4 dargestellt werden wird. Eine Derivatisierung mit Alkylketten (**7**) führt zu einer Steigerung der Transfektions-

effizienzen in Abhängigkeit der Länge der hydrophoben Anker. Der Anstieg der Effizienz erreicht ein Maximum bei einer Kettenlänge von acht, was von Yao *et al.* gezeigt werden konnte.^[81] Erklärt wurde dieses Phänomen durch eine verbesserte Aufnahme des Vektors in die Zelle sowie ein besseres Abdocken des Vektors vom genetischen Material.

Wie in diesem Kapitel gezeigt bieten Polymere viele verschiedene Möglichkeiten und Ansätze die biologische Wirkung bei Transfektionsexperimenten zu beeinflussen. Allerdings sind Trends, zum Beispiel im Hinblick auf die Länge hydrophober Ketten, nicht eindeutig zu erklären, was zu Problemen bei der Analyse von Struktur-Wirkungsbeziehung führen kann.

1.2.2.1 Nanopartikel als Transportvehikel

Nanopartikel sind kolloidale Partikel mit einem Durchmesser zwischen 10 – 1000 nm, die für verschiedene biologische Anwendungen relevant sind.^[83] Hierbei können Wirkstoffe oder DNA an der Oberfläche oder im Inneren einer Kavität eingelagert werden und so transportiert werden.^[84] Das transportierte Gut kann dann in der Zelle oder durch spezielle externe Stimuli freigesetzt werden und eine Wirkung erzielen. Dies konnte in einer Publikation von Saha *et al.* deutlich gemacht werden, bei dem ein neues Polymersystem auf Basis von Norbornen und einem Zwitterion synthetisiert wurde.^[85] Durch die pH-abhängige Schaltbarkeit des Systems konnte der Inhalt der Nanopartikel durch Veränderung der H⁺-Konzentration freigesetzt werden. Neben diesem Beispiel kann auch DNA in Nanopartikel aufgenommen und für die Gentransfektion verwendet werden. Hierbei haben sich vor allem biokompatible Polymere aus Chitosan, Lipiden, PLL, PEI oder Polymilchsäure als erfolgreich erwiesen.^[86]

Ein weiteres Beispiel für Nanopartikel sind CaPO₄-Nanopartikel, welche durch verschiedene Methoden hergestellt werden können. Die erste beschriebene Methode zur Herstellung dieser Nanopartikel verwendet eine Calciumchlorid-Lösung, welche mit einer Lösung aus DNA gemischt wird. Nach Zugabe eines Phosphatpuffers entstehen Nanopartikel, die nach Zugabe zum Zellmedium eine erfolgreiche Transfektion ermöglichen.^[87,88]

Dieser Einblick in die Verwendung von Nanopartikeln als Transfektionsvektor dient der Darstellung eines vollständigen Bildes der zur Verfügung stehenden Möglichkeiten, um ein potentes Transportsystem herzustellen.

1.2.2.3 Nicht polymere Transfektionsvektoren auf Peptidbasis

Transfektionsvektoren auf Peptid Basis ermöglichen ein breites Spektrum, um verschiedene Strukturen zu realisieren, wobei mehrere Konzepte miteinander kombiniert werden können. Als Grundlage für eine erfolgreiche Transfektion werden Peptidsequenzen verwendet, welche reich an basischen Aminosäuren sind. Zu diesen zählen Lysine und Arginine, welche sowohl eine DNA-Bindung ermöglichen, als auch eine Interaktion mit der Zellmembran.^[89] Das gewünschte genetische Material kann entweder kovalent, wie durch Sebestyén *et al.*

gezeigt^[90], durch elektrostatische Wechselwirkungen^[91] oder durch Wasserstoffbrückenbindungen^[38] mit dem Vektor interagieren. Aminosäuresequenzen welche unter anderem viralen Ursprung haben, sind in der Lage durch eine Protonierung im Endosomen definierte Strukturen auszubilden.^[92] Durch die Interaktion dieser Assemblate mit der endosomalen Membran führt dies zu einer Porenbildung, wodurch das Endosom aufbricht und das genetische Material freigesetzt wird.^[93] Das am Ende der 80er Jahre entdeckte Transkriptions-transaktivierende Peptid (TAT) zählt zu einem der ersten so genannten zellpenetrierenden Peptiden, die die zuvor beschriebenen Mechanismen auslösen.^[94] Diese Aminosäuresequenz, welche aus vielen Arginin und Lysin-Einheiten aufgebaut ist (GRKKRRQRRRPPQ) kann durch Endozytose-ähnliche Aufnahmewege in das Zellinnere gelangen. Daraus abgeleitete polykationische Peptidsequenzen sind z.B. Oligoarginine, welche von Futaki *et al.* vorgestellt wurden. Die mindestens benötigte Anzahl der Aminosäuren beläuft sich auf acht, um eine Transfektion von Zellen zu beobachten.^[45] Eine Verwendung von Lysin an Stelle von Arginin war in diesem Fall nicht möglich. Da die Guanidingruppe zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen zu dem Phosphatrückgrat im Gegensatz zu dem primären Amin ausbildet, ist eine bessere Kondensation des genetischen Materials möglich (**Abbildung 1-8**, Vergleich A und B).^[38]

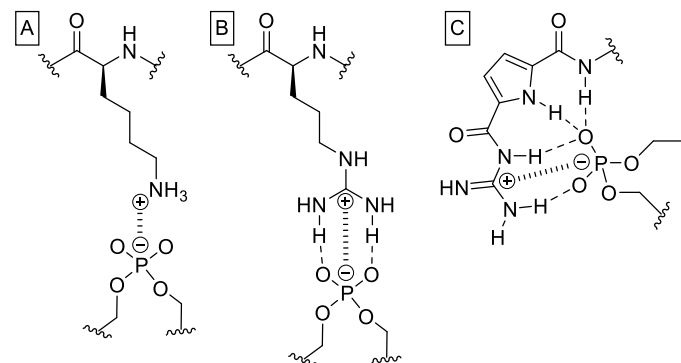


Abbildung 1-8. Darstellung der unterschiedlichen Bindungsmodi von Kationen an das Phosphatrückgrat der DNA; A) Supramolekulare Interaktion von Lysin mit Phosphatanion; B) Supramolekulare Interaktion von Arginin mit Phosphatanion; C) Supramolekulare Interaktion des GCP-Kations mit Phosphatanion.

Eine deutlich verbesserte DNA-Bindung durch eine weiter erhöhte Anzahl an H-Brücken kann mit einem Guanidino-Carbonyl-Pyrrol Baustein erreicht werden, der von Schmuck *et al.* entwickelt wurde.^[95,96] Die mit diesem Bindungsmotiv modifizierten Vektoren sind in der Lage eigenständig exogene DNA in Zielzellen zu transportieren. Im folgenden Kapitel werden die auf diesem Motiv beruhenden Transfektionsvektoren genauer betrachtet.

1.2.2.4 Transfektionsvektoren basierend auf Guanidinocarbonylpyrrol

Das erwähnte Bindungsmotiv Guanidinocarbonylpyrrol (als GCP abgekürzt) wurde von Schmuck *et al.* entwickelt und kann in verschiedenen Anwendungen eine Bindung von

negativ-geladenen Biomolekülen erzielen (hierzu zählen Phosphate und Aminosäuresequenzen mit negativer Ladung).^[95,97,98] Im Speziellen kann DNA mit Hilfe dieses Bausteins erfolgreich in Zellen transportiert und somit verschiedene Transfektionsvektoren entwickelt werden. Daher soll hier ein kurzer Überblick über die realisierten Moleküle erfolgen, welche die Besonderheit dieses Bindungsmotives hervorheben.

Das beschriebene Prinzip konnte in einer Publikation von Kuchelmeister *et al.* demonstriert werden (**Abbildung 1-9**), indem das rationale Design eines Transfektionsvektors auf der Grundlage einer aromatischen Kerneinheit im Vordergrund stand.^[99]

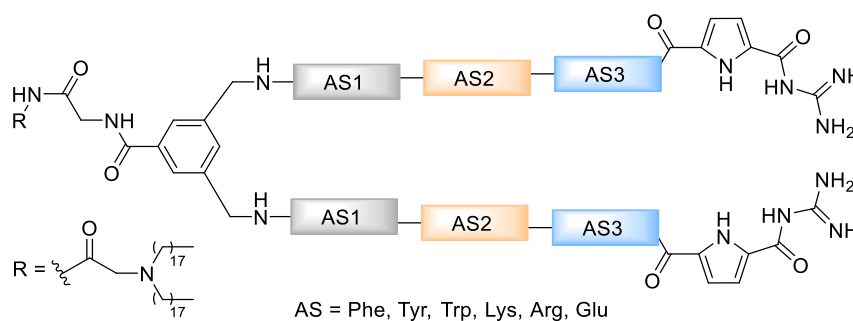


Abbildung 1-9. Schematische Darstellung der Transfektionsvektoren von Kuchelmeister *et al.* welche durch kombinatorische Chemie synthetisiert und an pDNA getestet wurde.^[99]

Die aromatische Kerneinheit sollte um je drei natürliche Aminosäuren und die GCP-Einheit pro Arm erweitert werden, um so einen symmetrischen Vektor zu erhalten. Durch die Wahl aus den Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Lysin, Arginin und Glutaminsäure konnte eine kombinatorische Bibliothek mit 259 Mitgliedern getestet werden. Durch Bindungsstudien an DNA konnten dann die einzelnen Mitglieder nach ihrer Bindungsstärke bewertet werden. Die besten Ergebnisse zeigte eine Kombination aus den basischen Aminosäuren und Tryptophan (F-R-K-GCP), welche in Transfektionsassays allerdings nur geringe Effizienzen im Vergleich zu PEI und Lipofectamine[®] 2000 zeigten. Durch eine Derivatisierung mit Alkylketten konnte die Transfektionseffizienz auf das Niveau der kommerziell erhältlichen Vektoren gesteigert werden.

Durch die Kombination aus PAMAM-G2 und dem GCP-Kation konnten Samanta *et al.* einen Transfektionsvektor herstellen, welcher über 16 dieser Bindungsmotive verfügt.^[100] Das hybridische Dendrimer (**Abbildung 1-10**) konnte nach erfolgreicher Charakterisierung des Bindungsverhaltens in Transfektionsexperimenten eingesetzt werden. Die Transfektion von HeLa Zellen gelang bereits ab einer finalen Konzentration von 0.6 μM was durch die vielen GCP-Einheiten ermöglicht wurde. Eine Erhöhung der Konzentration auf jeweils 1 und 10 μM ermöglichte eine Steigerung der Effizienz auf bis zu 60%. Im Vergleich dazu konnte weder unmodifiziertes PAMAM-G2 noch PEI in diesem Konzentrationsbereich eine Transfektion ermöglichen. Bei einer Konzentration von 150 μM wurde für PEI jedoch eine ähnlich hohe Transfektionseffizienz gemessen. Diese ist allerdings durch einen deutlichen Abfall in der

Überlebensrate der Zellen begleitet. Vektor **8** ist im angegebenen Konzentrationsbereich nicht toxisch und zeigte somit einen deutlichen Vorteil im Vergleich zu PEI auf.

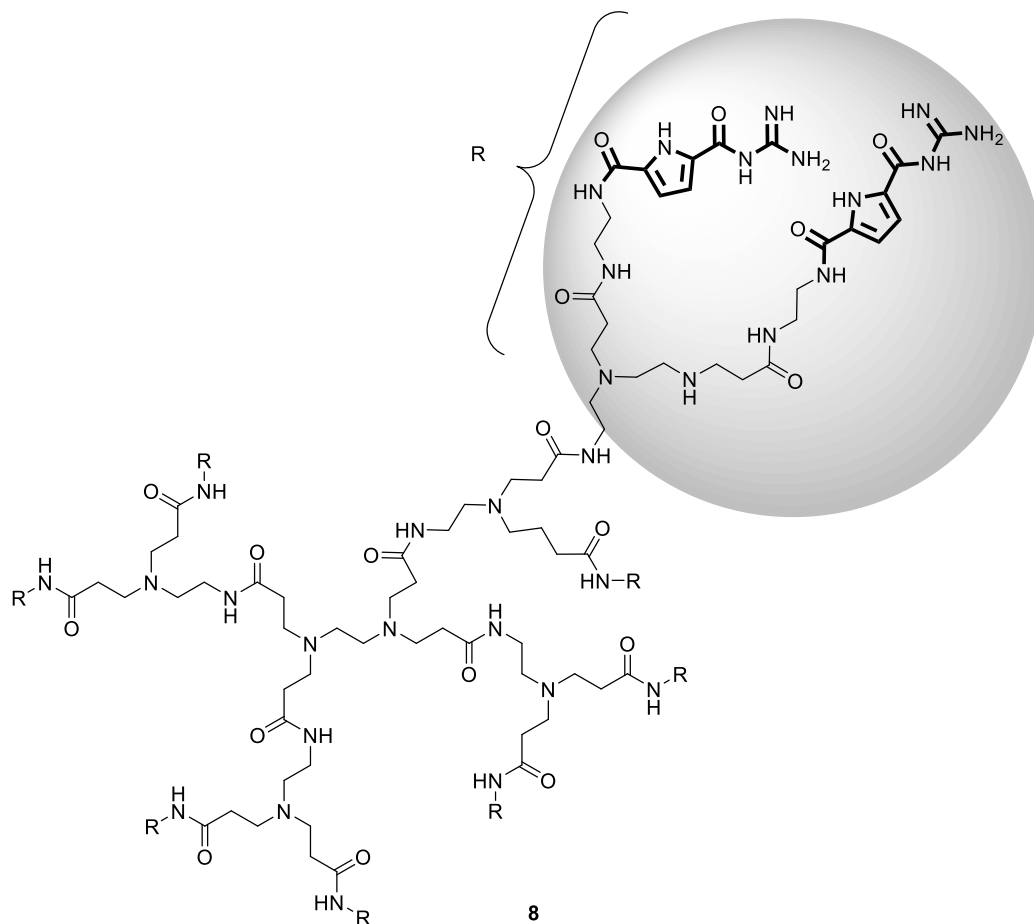


Abbildung 1-10. Strukturformel des Transfektionsvektor (**8**) auf Basis von PAMAM-G2 welcher mit 16 Einheiten des GCP-Motifs modifiziert wurde.

In einer Veröffentlichung von Li *et al.* wurde ein zyklisches Peptid bestehend aus Alanin und Lysin (**Abbildung 1-11**) synthetisiert und mit dem GCP-Motiv funktionalisiert.^[101] Durch Selbstassemblierung konnten mittels AFM und TEM Messungen Nanofasern beobachtet werden, welche in der Lage sind DNA zu binden. Aus diesem Grund wurden Transfektionsexperimente an HeLa und HEK293t Zellen unternommen. Die erreichte Transfektionseffizienz von ca. 50% ist an sich gesehen für ein kleines System schon beachtlich und vergleichbar mit PEI (ca. 60%). Besondere Aufmerksamkeit erregen allerdings weitere Untersuchungen bei dem Bafilomycin eingesetzt wurde. Dies verhindert eine endosomale Aufnahme und verringert somit deutlich die Transfektionseffizienz von PEI auf ca. 5%. Im Gegensatz dazu wird der Vektor **9** kaum durch die Zugabe beeinflusst, woraus hervorgeht, dass ein alternativer Aufnahmemechanismus zur Transfektion führt. Hierbei könnten die Nanofasern als eine Art Brücke zwischen DNA und der Zellmembran agieren und so eine Transfektion ermöglichen.

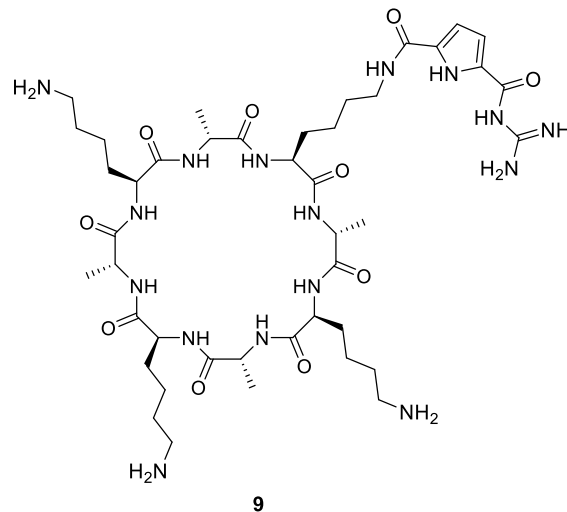


Abbildung 1-11. Struktur des zyklischen Transfektionsvektors (**9**) auf Basis von Lysin, Alanin und dem GCP-Bindungsmotiv.

Zwei weitere Liganden, dargestellt in **Abbildung 1-12**, für die Bindung von DNA wurden von Jiang *et al.* hergestellt und verfügen über vier GCP-Einheiten.^[102] Hierbei wurden im Gegensatz zu linearen Vektoren eine Verzweigung der Bindungseinheiten eingesetzt, um eine bessere Bindung von genetischen Material zu erreichen.

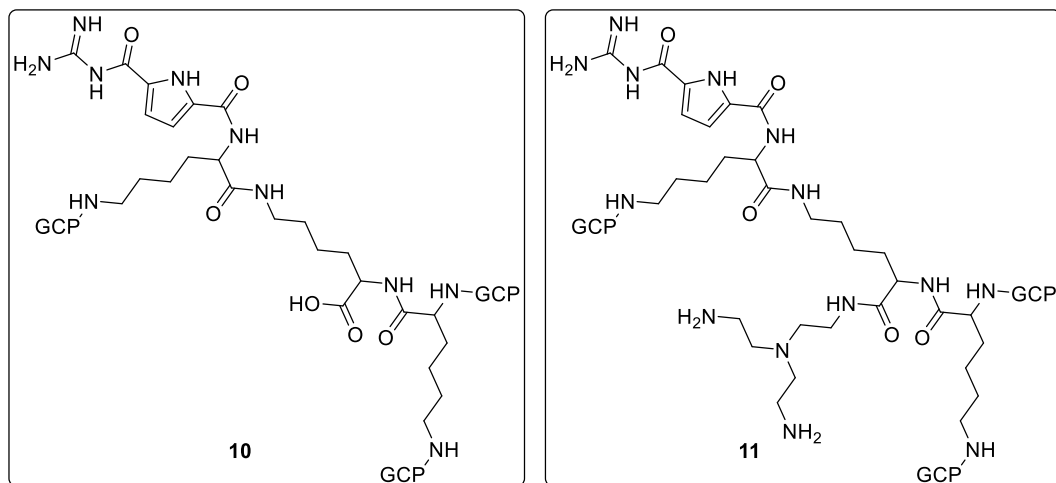


Abbildung 1-12. Struktur der beiden getesteten Transfektionsvektoren (**10** und **11**) von Jiang *et al.* auf Basis von Lysin und dem GCP-Motiv.

Der erste Vektor (**10**) mit freier Carboxyleinheit zeigte eine gut Bindung von DNA, bildete jedoch große Strukturen (5250 nm). Dies konnte mit Hilfe von DLS-Messungen nachgewiesen werden. Durch die Kombination von **10** mit Tris(2-aminoethyl)amine TREN, konnte **1** hergestellt werden. Dieser Vektor zeigte ein ähnliches Bindungsverhalten wie **10**, bildete in DLS Messungen jedoch deutlich kleinere Strukturen (800 nm). Dieses Verhalten konnte in biologischen Messungen deutlich gemacht werden. Hierbei zeigte **10** eine nur geringe Transfektion von HEK293t Zellen, was durch die großen Aggregate begründet werden kann. Eine Aufnahme in das Endosomen ist somit nicht möglich. Der zweite Vektor

erreichte bei einer Konzentration von 150 μM eine Transfektionseffizienz von ca. 50%. Diese zu PEI vergleichbaren Ergebnisse wurden durch eine geringe Zelltoxizität begleitet. Der kommerzielle Vektor zeigte jedoch eine deutliche Abnahme der Zellviabilität. Somit konnte gezeigt werden, dass **11** durch die verzweigte Struktur und hohe Ladungsdichte ein gutes Beispiel für einen erfolgreichen Transfektionsvektor darstellt.

Eine strukturelle Analyse durch Junghänel *et al.* eines trivalenten Vektors, bei dem mehrere Faktoren parallel untersucht wurden, führte zu Erkenntnissen bezüglich Rigidität und Ladungsdichte.^[40] Die erste Variable war die Starrheit der zentralen Kerneinheit die einmal ein unflexibles aromatisches Gerüst verwendet. Im Vergleich dazu wurde ein beweglicher Kern aus TREN eingesetzt. Die zweite Variable bildete die genaue Abfolge der entscheidenden Aminosäuresequenz, so dass die Dichte der Ladungen gezielt variiert werden konnte.

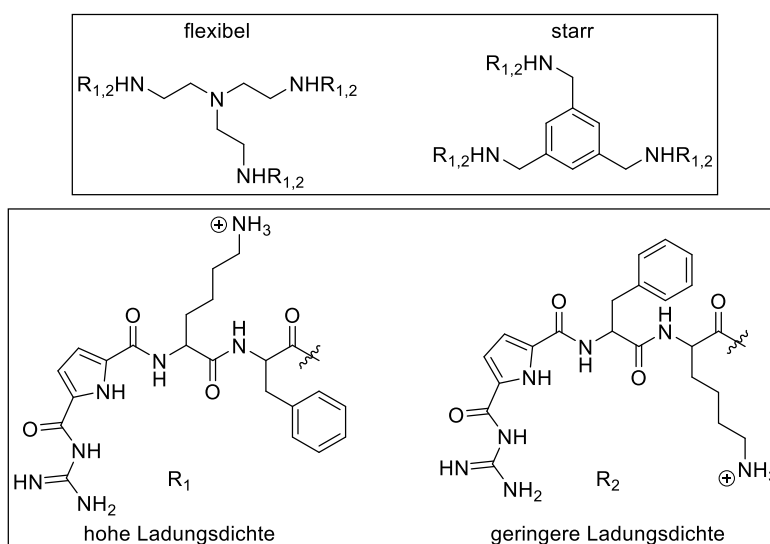


Abbildung 1-13. Zusammenfassung der von Junghänel *et al.* getesteten Verbindungen für die Gentransfektion.^[103]

Die so erhaltenen vier Transfektionsvektoren (**Abbildung 1-13**) zeigten gute Transfektionseffizienzen, welche vergleichbar zu der Effizienz von PEI an HEK293t Zellen war. Ein genereller Trend dieser Systeme konnte festgestellt werden, bei dem eine starrere Kerneinheit eine bessere Transfektion erlaubt als die flexibleren Derivate. Eine hohe Ladungsdichte ist in diesem Fall von Vorteil und erlaubt höhere Transfektionseffizienzen. Die Kombination der beiden schlechten Eigenschaften (starre Kerneinheit, geringe Ladungsdichte) resultiert in einer Abnahme der Effizienz um 20%-Punkte.

Wie aus dem vorherigen Beispiel ersichtlich wird, ist eine hohe Ladungsdichte vorteilhaft für eine hohe Transfektionseffizienz. Dies konnte sich Li *et al.* zu Nutze machen indem die Seitenketten von vier Lysinen mit der GCP-Einheit (**12**, **Abbildung 1-14**) modifiziert wurden.^[104]

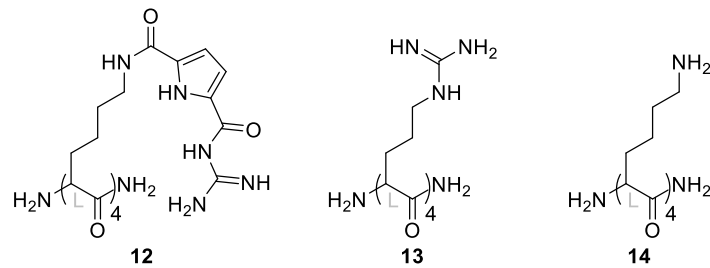


Abbildung 1-14. Strukturformeln des Vektors von Li *et al.* im Vergleich zu Negativkontrollen aus natürlichen Aminosäuren.^[104]

Der Vektor zeigte eine hohe Transfektionseffizienz an HeLa, HEK293t und NIH/3T3 Zellen im Vergleich zu PEI. Der gezeigte Vektor weist in dem angegebenen Konzentrationsbereich im Gegensatz zu dem kommerziell erhältlichen Vektor allerdings keine Toxizität auf. Des Weiteren zeigt ein Vergleich mit chemischen Negativkontrollen, dass weder **13** noch **14** Transfektion ermöglichen. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung wurde so der bis dahin kleinste peptidische Transfektionsvektor synthetisiert und erfolgreich eingesetzt. Durch den einfachen Aufbau des Vektors und die Möglichkeit zur Derivatisierung ist **12** ein möglicher Kandidat für weitere Forschungszwecke. Die in diesem Kapitel beschriebenen Transfektionsvektoren auf Basis des GCP-Kations zeigen, in welcher strukturellen Vielfalt eine Transfektion ermöglicht werden kann. Sie stellen daher ein besonders spannenden Teil der chemischen Forschung in diesem Bereich dar und lassen Raum für strukturelle Änderungen offen.

1.3 Entwicklungen zu einer gesteigerten Zellspezifität

Wirkstoffe die eine Behandlung erkrankter Zellen erlauben und dabei keinen negativen Einfluss auf Gesunde haben sind bereits seit über 100 Jahren ein Ziel der medizinisch-chemischen Forschung.^[105] Der Begriff der „magic bullet“ von Paul Ehrlich^[106] fasst dieses Konzept zusammen, von dem aus eine Vielzahl verschiedener Schritte unternommen wurden, um eine Umsetzung zu ermöglichen. Die Forschung im Bereich der Krebsbehandlung ist in diesem Fall von besonderem Interesse, da Krebszellen starke physiologische Unterschiede zu gesunden Zellen aufweisen, welche durch gezielte Wirkstoffe behandelt werden können.^[107] Ein erster Schritt in diese Richtung wurde durch die Maskierung von Wirkstoffen mit Polyethylenglykol (PEG) erreicht (engl. coating).^[108] Die in diesem Fall beschriebenen Nanopartikel werden mit Hilfe dieses Ansatzes vor einer Interaktion mit dem Blut und Gewebe geschützt und verbleiben somit länger im Körper. Dieser kann somit den Wirkstoff nur langsam aus dem Organismus entfernen. Der beschriebene Effekt wird unter dem Begriff erhöhte Permeabilität und Retention (engl. „enhanced permeability and retention“, kurz: EPR) zusammengefasst und beschreibt somit ein passives Targeting, da die Zeit in der der Wirkungsort erreicht werden kann erhöht wird.^[109] Wichtige Einflüsse auf die Wirkung haben die Größe, Funktionalität und Art der Verknüpfung zwischen „coating“ und Partikel.^[110] Allerdings kann der Organismus durch das Bilden von Antikörpern gegen PEG (anti-PEG IgM) einen beschleunigten Abbau des Wirkstoffes fördern und so dessen Wirkung verringern.^[111] Das passive Targeting ist aus diesen Gründen nicht allein geeignet, um das Ziel der spezifischen Zellbehandlung zu ermöglichen. Die Notwendigkeit für eine spezifischere und gerichtete Behandlung führt daher vom passiven Targeting zum Aktiven.^[112] Hierzu kann die abweichende Physiologie, durch veränderte Oberflächentransporter oder den pH-Wert ausgenutzt werden.^[112] Das aktive Targeting von Zielzellen kann durch spezifische Label verbessert werden. Ein Label beschreibt in diesem Fall ein biologisch aktives Molekül, welches entweder physiologisch im Körper vorliegt (z.B. Vitamine) oder aus biochemischen Assays ermittelt wurde (z.B. spezifische Peptide). Im Folgenden sollen aus beiden Kategorien mehrere Beispiele näher beleuchtet werden.

1.3.1.1 Aktives Targeting durch Peptide

Die strukturelle Vielfalt von Peptiden ermöglicht eine breite Anwendung auch als Zieleinheit für Krebszellen.^[112] Von Vorteil sind des Weiteren die hohe Stabilität, eine leichte Derivatisierung, sowie geringe Produktionskosten bei einer hohen biologischen Aktivität. Peptide werden nur in geringem Maße vom Immunsystem erkannt und zeigen damit wenige Nebenwirkungen.^[113] Somit konnten verschiedene Peptidsequenzen welche zum Beispiel an definierte Zellmembranrezeptoren binden, für die Verwendung in der zellspezifischen Therapie eingesetzt werden.^[114] Im Folgenden soll daher auf zwei von vielen

literaturbekanntesten Peptiden eingegangen werden und deren Fähigkeiten im Bezug auf die Zellspezifität beleuchtet werden.

1.3.1.1.1 Die RGD-Sequenz

Neben vielen polypeptidischen Erkennungssequenzen stellt die RGD-Sequenz mit nur drei Aminosäuren (Arginin-Glycin-Aspartat) eine vergleichsweise kurze Einheit dar.^[115] Diese Schlüsseleinheit bindet an Integrine und ist die Haupterkennungssequenz für Zelladhäsion von Proteinen.^[116] Eine Bindung der Sequenz an $\alpha_v\beta_3$ Integrine^[117], welche von einer Vielzahl verschiedener Krebszelllinien verstärkt exprimiert wird^[118,119], erlaubt eine Verwendung in der zellspezifischen Therapie^[120]. Gesunde, normale Zellen des Organismus zeigen nur eine minimale Expression dieser Transmembranproteine, was für eine hohe Spezifität notwendig ist.^[119] Eine Anwendung in diesem Gebiet durch den Transport von Doxorubicin (DOX), einem Chemotherapeutikum, zeigten Zhang *et al.* mit der Synthese von einem auf Polyamidoamin (PAMAM) basierendem System.^[121] Durch die Konjugation von RGD und DOX über eine säurelabile Linkereinheit an das Grundgerüst konnte eine zellspezifische Toxizität von C6-Zellen *in vitro* und *in vivo* bestätigt werden. Die Gabe dieses Therapeutikums verlängerte die Plasmakonzentration des Doxorubicins in Tierversuchen und ermöglichte eine verlängerte Überlebensrate von 20 Tagen, bei unbehandelten Tieren, auf bis zu 80 Tage bei Gabe der Konjugate.

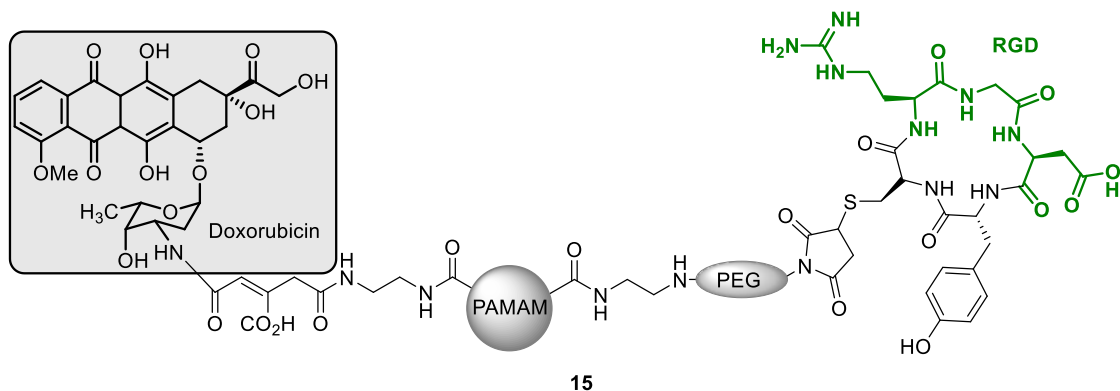


Abbildung 1-15. Struktur des auf dem PAMAM basierten System mit Doxorubicin und RGD-Erkennungseinheit (15).

Eine Verbesserung des linearen Bindungsmotivs konnte durch Kessler *et al.* durch die Zyklisierung und den Einbau einer D-Aminosäure erreicht werden.^[122] Im Vergleich zum linearen Vertreter konnte so eine Verbesserung des Bindungsverhaltens um mehrere Größenordnungen erzielt werden.^[123]

1.3.1.1.2 Der Transferrin Rezeptor als Ziel für kurze Peptidsequenzen

Der Transferrin-Rezeptor (TfR) auf der Zelloberfläche vermittelt die Aufnahme von Eisen in die Zelle.^[124] Da Fe(III)-Ionen nur schlecht in Wasser löslich sind und eine direkte Aufnahme

nicht möglich ist, wird der Eisenbedarf von tierischen Zellen durch Transferrin gedeckt.^[125] Dieses Glykoprotein kann an den Rezeptor binden und dann mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen werden, so dass durch das Absinken des pH-Werts letztendlich das Eisen freigesetzt wird.^[124] Im Sinne eines Krebszelltargetings ist der Transferrin-Rezeptor ein gutes Ziel, da dieser bei einer Vielzahl von Krebszellen überexprimiert wird, was durch einen erhöhten Zellstoffwechsel erklärt werden kann.^[126] Eine Konjugation des Glykoproteins an ein Zielmolekül kann die Aufnahme in Krebszellen somit verbessern. An Stelle von Transferrin können allerdings auch Antikörper oder kurze Peptidsequenzen verwendet werden. Ein Beispiel hierfür ist das Heptapeptid HAIYPRH (T7), welches an den Rezeptor bindet und zu einer Internalisierung führt.^[127] Die Konjugation des Peptids an ein Endoperoxid (**Abbildung 1-16**) ermöglichte Oh *et al.* die selektive Aufnahme in Krebszellen *in vitro*.^[128]

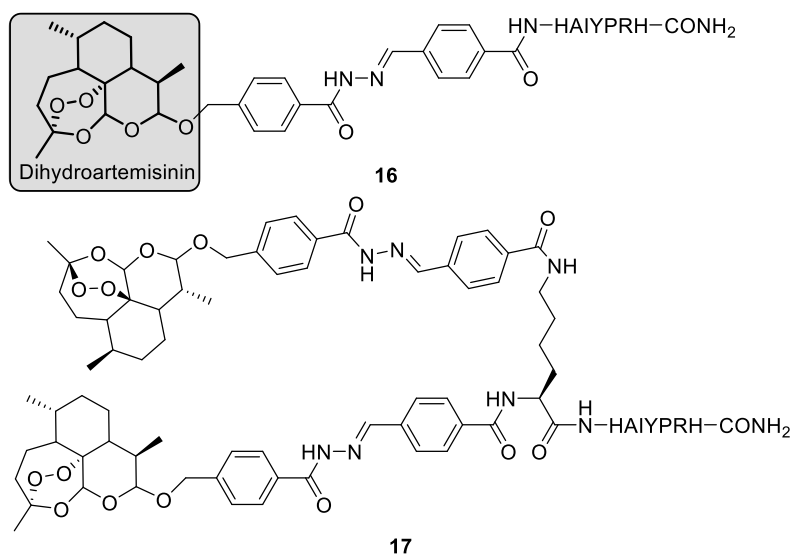


Abbildung 1-16. Strukturen der auf Dihydroartemisinin und dem Heptapeptid basierten Systeme von Oh *et al.*, welche über eine Hydrazone-Linker verbunden sind.

Dies konnte durch die Kombination aus dem Peptid, über einen Hydrazone-Linker an Dihydroartemisinin erreicht werden. In Zellexperimenten an Molt-4-Zellen konnten IC₅₀-Werte für **16** und **17** von je 1.06 µM und 0.61 µM ermittelt werden. In vergleichenden Experimenten konnte ein IC₅₀-Wert von über 10,000 an Leukozyten gemessen werden, welche den Rezeptor nicht verstärkt exprimieren.

Die in diesem Kapitel beschriebenen Konjugate für ein zellspezifischen Einsatz *in vitro* und *in vivo* könnten in zukünftigen Versuchen eingesetzt werden. Allerdings erhöhen die gezeigten Peptidsequenzen durch zum Beispiel zusätzliche Ladungen die Komplexität der Produkte.

1.3.1.2 Vitamin basierte Label

Vitamine sind chemisch nicht verwandte Moleküle, welche sich nicht durch eine ähnliche Struktur oder metabolische Aktivität klassifizieren lassen.^[129] Allerdings erfüllen sie in der

Ernährung wichtige Funktionen, für welches sie in nur geringen Mengen zugeführt werden müssen.^[130] Dennoch sind sie für ein gesundes Leben notwendig, da sie z.B. als Coenzyme, Antioxidantien oder für die Regulation der Genexpression dienen.^[131] Verschiedene Krebszellen zeigen einen gesteigerten Vitaminbedarf, um die hohe metabolische Aktivität zu decken.^[132] Dieser physiologische Unterschied kann eine gezielte Krebstherapie ermöglichen.^[133]

1.3.1.2.1 Folsäure

Folate und Folsäure sind essentielle Vitamine, da Säugetiere auf Grund eines fehlenden Enzyms nicht in Lage sind diese *de novo* zu synthetisieren.^[134] Dies aus Pteroinsäure und der Aminosäure Glutaminsäure bestehende Vitamin (**18, Abbildung 1-17**) kann durch eine Konjugation in der Therapie verschiedener Krankheiten angewendet werden.^[135]

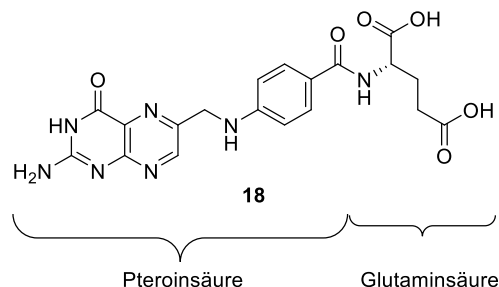


Abbildung 1-17. Strukturformel von Folsäure, aufgebaut aus Pteroinsäure und Glutaminsäure.

Dies konnte bereits 1994 durch Low *et al.* gezeigt werden, indem Liposomen mit Folsäure dekoriert wurden.^[136] In diesem Fall wurden die Nanopartikel zu 0.1% mit einem Folatlabel versehen, welches über einen PEG-Linker an ein Phospholipid gekuppelt war. Dabei ist allgemein beim synthetischen Vorgehen von Folsäure modifizierten Molekülen zu beachten, dass eine Unterscheidung zwischen der alpha- und gamma-Carbonsäure notwendig ist. Das α -Konjugat zeigte keine biologische Aktivität, wobei die γ -Verbindung biologisch aktiv ist.^[137] Die modifizierten Nanopartikel konnten vermehrt in KB Zellen (ein Derivat der HeLa Zelllinie) aufgenommen werden und durch Zugabe von extrazellulärer Folsäure gehemmt werden. Dieser Nachweis für einen Folat-abhängigen Transport könnte einen zellspezifischen Wirkstofftransport ermöglichen.

Die Weiterentwicklung dieses Grundprinzips konnte 2006 ebenfalls durch Low *et al.* in ähnlicher Weise gezeigt werden, wobei aus einer Kombination aus Chemotherapeutikum und Folsäure ein potenter Wirkstoffvorläufer (**19, Abbildung 1-18**) entwickelt wurde.^[138]

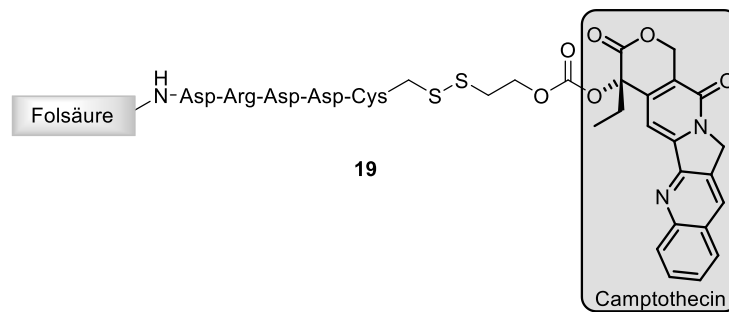


Abbildung 1-18. Strukturformel des zellspezifischen Prodrugs mit Folsäure-Label.

Das Camptothecin ist in diesem Fall über ein Carbonat an einen Sulfid Linker gebunden, welcher mit der Seitenkette des Cystein ein reduktionslabiles Disulfid bildet. Für eine bessere Wasserlöslichkeit zu gewährleisten wurde eine kurze Peptidsequenz aus fünf Aminosäuren verwendet. Eine Aufnahme des Prodrugs in KB Zellen führt zu einer Spaltung des Disulfids und der Bildung eines zyklischen Thiocarbonats. Die so erreichte Freisetzung des Camptothecins führte nach Analyse durch ein toxikologisches Assay zu mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC_{50}) im nanomolaren Bereich. Die Zugabe von freier Folsäure zum Medium der Zellen führt im Gegensatz dazu jedoch zu keiner Verringerung der Zellviabilität, wodurch eine Folsäure-abhängige Aufnahme nachgewiesen werden konnte.

1.3.1.2.2 Biotin

Biotin ist ebenso wie Folsäure ein essentielles Vitamin was nicht durch Säugetiere selbst synthetisiert werden kann.^[139] Somit ist eine ausreichende Aufnahme aus der Nahrung notwendig, um eine normale zelluläre Tätigkeit sicherzustellen. Biotin fördert das zelluläre Wachstum und spielt als Kovalent-gebundenes Coenzym eine wichtige Rolle in der Biosynthese von Fettsäuren, Aminosäuren und bei der Glukoneogenese.^[140] Der Stoffwechsel von Krebszellen ist im Allgemeinen deutlich beschleunigt, weshalb auch ein höherer Bedarf dieses Vitamins besteht.^[132] Aus diesem Grund werden Biotinrezeptoren auf der Oberfläche verschiedener Krebszelllinien verstärkt exprimiert.^[141] Diese Tatsache stellt ein mögliches Ziel für eine zellspezifische Behandlung von Krebs dar, was bereits in mehreren Publikationen gezeigt werden konnte. So konnten Deshpande *et al.* zeigen, dass ein Biotinkonjugat aus Polysacchariden (Dextran, **Abbildung 1-19**) eine Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Nanopartikeln ermöglicht.^[142]

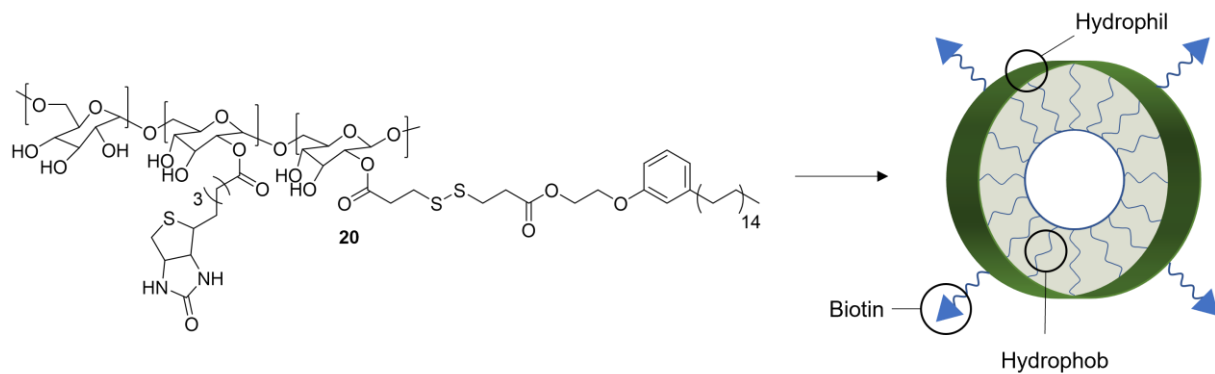


Abbildung 1-19. Strukturformel des Dextran-Biotin Transporters (**20**) und Aufbau der Nanopartikel.

Die amphiphilen Nanotransporter konnten mit Doxorubicin-hydrochlorid beladen werden und wurden in biologischen Experimenten an HeLa-Zellen eingesetzt. Hierbei konnte eine Rezeptor-abhängige Aufnahme in die Zielzellen nachgewiesen werden, wobei auch die erreichte Zelltoxizität im Vergleich zu freiem Doxorubicin deutlich höher war. Durch ein Konkurrenz Assay mit freiem Biotin im Zellmedium konnte eine Verringerung der Aufnahme der Nanopartikel nachweisen. Die so erhaltenen Ergebnisse zeigen den deutlichen Einfluss des Biotin-Labels auf die Funktion des Wirkstofftransports.

Durch die beschriebene Wirkung von Biotin im Hinblick auf eine zellspezifische Adressierung bietet das Vitamin daher eine mögliche Zielstruktur. Durch eine Konjugation, zum Beispiel an einen potenten Transfektionsvektor, sollte sich ein zellspezifischer Charakter fördern lassen. Dieser könnte dann in vergleichenden Zellexperimenten an zum Beispiel HeLa-, mit einer hohen Anzahl an Rezeptoren, und HEK293t-Zellen, mit einer geringen Anzahl der Rezeptoren, verifiziert werden.^[141]

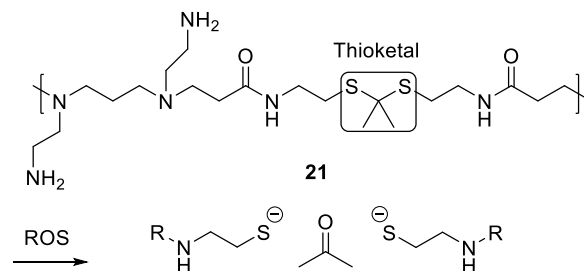
Die Literaturbeispiele der letzten zwei Kapitel zeigen den messbaren Einfluss, der durch die Verknüpfung aus bioaktivem Label und biologisch potenten Molekülen, für die Behandlung von Krebszellen resultiert. Für eine genauere Betrachtung von Gentransfektion im Hinblick auf Zellspezifität soll das nächste Kapitel dienen.

1.4 Zellspezifische Gentransfektion

Eine zellspezifische Gentransfektion ist aus den bereits erklärten Gründen ein wichtiges Ziel für eine biomedizinische Anwendung. Biochemisch aktive, molekulare Label, die dies ermöglichen, wurden in den vorherigen Kapiteln vorgestellt. Nun soll ihr Einsatz, in der Gentransfektion, näher beleuchtet werden. Besonders wichtig in diesem Abschnitt ist die Zellspezifität entweder im Vergleich zu einer chemischen Negativkontrolle oder im Vergleich zu anderen Zelllinien.

1.4.1 Zellelektivität durch ROS und Transferrin

Im Vergleich zu gesunden Zellen bilden Krebszellen erhöhte Mengen an H_2O_2 , hydroxyl Radikalen und Superoxiden im Zellinneren.^[143] Diesen physiologischen Unterschied konnten sich Shim *et al.* zu Nutze machen in dem eine Thioketal-Linkereinheit in ein Polyamin eingebaut (**Schema 1-1**, **21**) wurde.^[144] Durch die gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species, ROS) wurde eine Freisetzung des genetischen Materials erreicht und so eine Verbesserung der Transfektionseffizienz an PC3 Zellen erreicht, welche um einen Faktor von etwa zwei höher waren als das gleiche Polymer ohne dies.



Schema 1-1. Struktur des ROS-sensitiven Vektors **21** und der Reaktionsprodukte nach Oxidation.^[144,145]

Ein Vergleich zu b-PEI zeigte eine ähnliche Verbesserung der Effizienz. Die so erreichte Kombination aus Effizienz und Spezifität wurde allerdings nur in einem *in vitro* Modell getestet, so dass kein Vergleich zu weiteren Zelllinien gemacht wurde.

Das bereits in Kapitel 1.3.1.1.2 erwähnte Transferrin (Tf) ist der physiologische Transporter für Eisen(III)-Ionen in tierischen Zellen. Eine erhöhte Anzahl des Transferrin-Rezeptors (TfR) kann auf der Oberfläche von Krebszellen gefunden werden.^[146] Durch die Kombination eines Arginin-reichen Polypeptids (**22**, **Abbildung 1-20**) und einem TfR-bindenden Heptapeptids (HAIYPRH, T7) konnten Lu *et al.* eine verbesserte Aufnahme in DU145 Zellen beobachten.^[147]

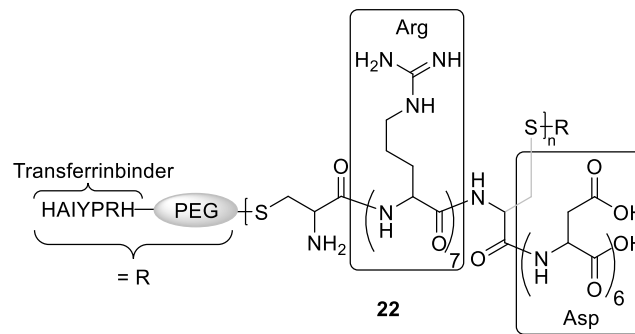


Abbildung 1-20. Schematischer Aufbau des Vektors aus Arginin und Aspartat.

Im Vergleich zu einer synthetisierten Negativkontrolle ohne T7 konnte eine Zunahme der Effizienz um den Faktor 1.5 gemessen werden. In diesem Beispiel wurde eine duale Aufnahme sowohl in TfR-positive Zellen und in Knochenkrebszellen angestrebt. T7 sollte dabei das erste Kriterium erfüllen und eine Peptidsequenz aus Asparaginsäure die Zweite. Zur Bindung der DNA wurde eine Sequenz aus Argininen verwendet. In Kombination mit Polyethylenglykollinkern wurde so ein komplexer Vektor mit dualen Targeting-Eigenschaften hergestellt.

Auch Peptide aus dem Bereich der „cell-penetrating peptides“ können durch eine Funktionalisierung mit Transferrin (1.3.1.1.2) für eine spezifische Aufnahme in Krebszellen modifiziert werden. Hierzu kombinierten Qu *et al.* ein Arginin-reiches Peptid (TAT) mit einem „nuclear localization signal“ (NLS).^[148] Diese Signalsequenz kann eine Aufnahme in den Zellkern vermitteln und somit die Transfektionseffizienz erhöhen. Das TAT-NLS Peptid kann DNA binden und durch Zugabe von Avidin um eine supramolekulare Bindungseinheit erweitert werden. Die starke Bindung zwischen Avidin und Biotin wurde in diesem Fall verwendet, um die Oberfläche der gebildeten Polyplexe mit Transferrin zu modifizieren. Die Konjugate aus Peptid, DNA und Transferrin wurden anschließend in vergleichenden Transfektionsexperimenten an drei verschiedenen Zelllinien eingesetzt.

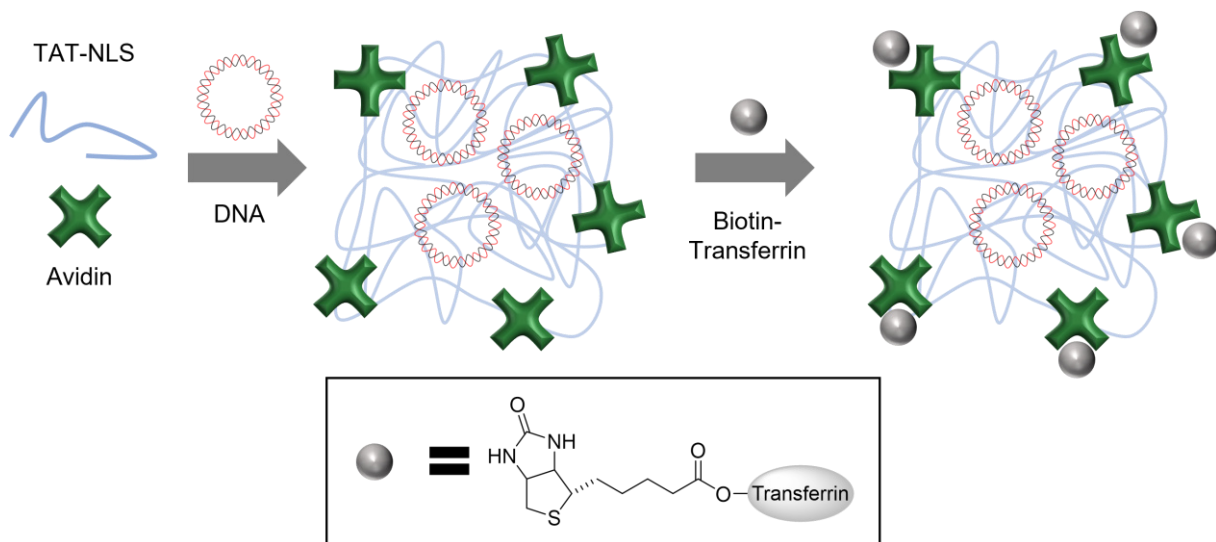


Abbildung 1-21. Zusammenfassung der Komplexbildung durch Avidin-Biotin Interaktion; Bearbeitet nach Qu *et al.*^[148]

Für einen Vergleich zwischen kommerziell erhältlichem und neuem Vektor wurde 25 kDa PEI verwendet. Die Transfektionseffizienzen an COS-7, HeLa und HepG2 Zellen wurden ermittelt und eine Präferenz für die beiden zuletzt genannten Zelllinien beobachtet. Für diese konnten höhere Transfektionseffizienzen im Vergleich zu PEI beobachtet werden, für COS-7 waren diese in etwa gleich. Allerdings führte eine Erhöhung der Transferrin-Konzentration auf der Oberfläche der Polyplexe zu einer Abnahme der Effizienz und einem Verlust der Spezifität. Dies wurde auf eine unzureichende Ladungskompensation der DNA und eine erhöhte Partikelgröße zurückgeführt.

1.4.2 Erhöhung der Zellspezifität durch Konjugation mit Folsäure

Polymere aus Polyethylenglykol und Polykationen können erfolgreich DNA kondensieren, was durch Novo *et al.* gezeigt werden konnte.^[149] Durch Erhöhung des pH-Werts (pH = 8.5) kann die positive Ladung der Polyplexe stark verringert werden (**Abbildung 1-22**), was durch einen labilen Carbonatlinker ermöglicht wurde. Die Verringerung der positiven Ladungen resultiert in einer Abnahme der Interaktion mit dem genetischen Material und der Zellmembran. Somit sinkt die Transfektionseffizienz ab, die Selektivität steigt allerdings relativ gesehen an. Durch eine zusätzliche endständige Modifikation mit Folsäure können so ähnliche Partikel erhalten werden, die eine höhere Transfektionseffizienz an Zelllinien ermöglichen, welche viele Folsäurerezeptoren (FR) exprimieren. Die Zellspezifität steigt somit durch diese Modifikation. Im Vergleich zwischen HeLa (FR+), OVCAR-3 (FR+) und A549 (FR-) können die positiven Zelllinien um einen Faktor 3-4 besser transfiziert werden als die Negativkontrolle. Durch weitere Experimente an OVCAR-3 Zellen konnte, durch Zugabe von Folsäure, die Transfektionseffizienz durch kompetitive Hemmung deutlich verringert und eine Abhängigkeit der FR-Konzentration nachgewiesen werden.

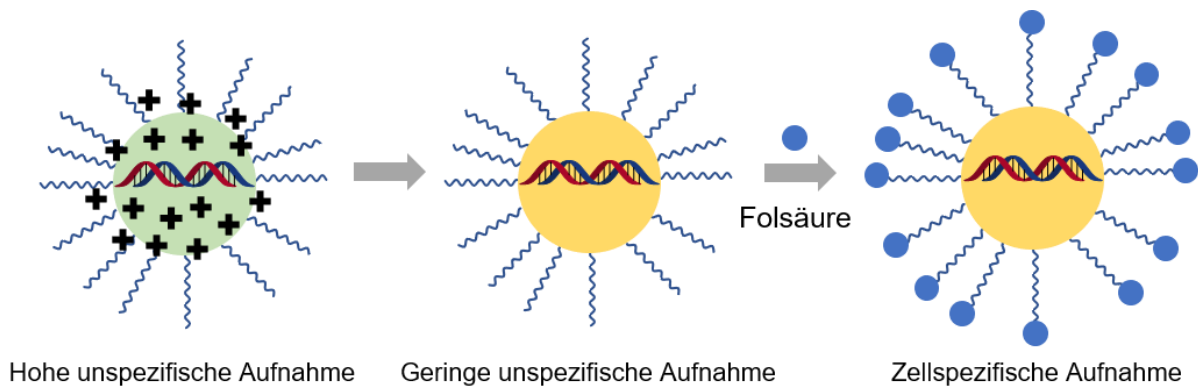


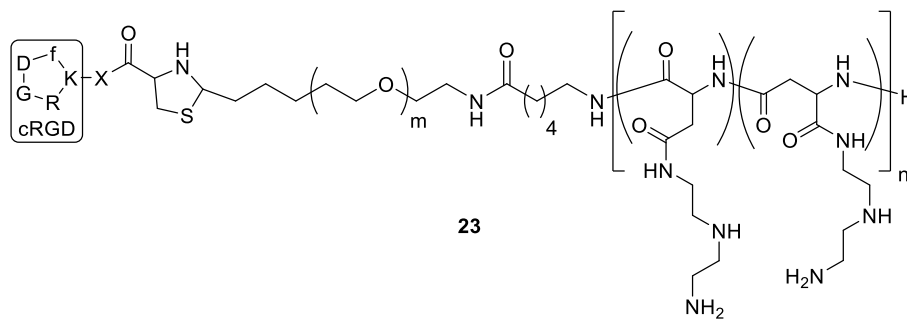
Abbildung 1-22. Illustration des Funktionsprinzips der dekationisierten Polyplexe. Bearbeitet nach Novo *et al.*^[149]

Durch eine ähnliche Herangehensweise konnten Liu *et al.* ein Polymer, welches durch Ester und Disulfide aufgebaut wurde, herstellen und mit Folsäure modifizieren.^[150] In Transfektionsexperimenten an HeLa Zellen konnte eine Zunahme der Effizienz um den Faktor drei, im Vergleich zum Polymer ohne Folsäure beobachtet werden. Eine Erhöhung der Folsäuremenge des Vektors von 10% auf 50% führte allerdings zu einer deutlichen Verschlechterung der Transfektionsergebnisse. Dies wurde durch eine Veränderung des Bindungsverhaltens des Vektors an DNA erklärt und mit DLS Messungen im Bezug auf die Größe der Polyplexe nachgewiesen. Die Erhöhung der Konzentration von freier Folsäure im Zellmedium führte des Weiteren zu einer Verringerung der Effizienz, was für eine kompetitive Hemmung spricht und ein Nachweis für eine Rezeptor-vermittelte Aufnahme ist.

Wie aus Kapitel 1.4.1 und 1.4.2 ersichtlich ist, ist die Erhöhung der Konzentration des Labels relativ zum Vektor ohne Beeinflussung der allgemeinen Transfektionsleistung nicht immer möglich. Die gewünschte Steigerung der Spezifität könnte vermutlich durch diese Erhöhung verbessert werden, was allerdings in großen, komplexen Systemen nicht einfach möglich zu sein scheint.

1.4.3 Zellselektive Transfektion durch RGD-Label

Eine Verwendung des RGD-Labels in zyklischer oder linearer Form ermöglicht ebenfalls einen Einsatz in der Gentransfektion. In einem Beispiel konnten Kagaya *et al.* zeigen, dass durch Kombination aus cRGD und einem Polymer ein potenter Vektor synthetisiert werden konnte.^[123] Das Block Copolymer aus Ethylendiamin und Polyethylenglykol wurde erfolgreich für eine zellspezifische Gentransfektion eingesetzt (**23, Abbildung 1-23**).

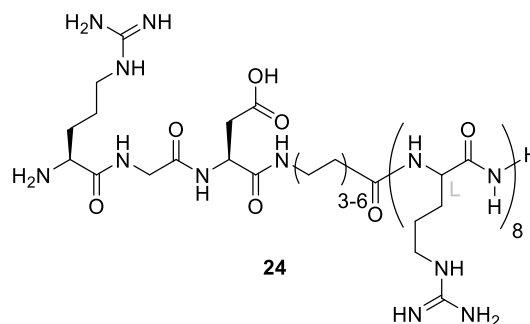


23

Abbildung 1-23. Strukturformel des Polymers von Kagaya *et al.* für eine Anwendung in der Gentransfektion.^[123]

Durch die Abschirmung der kationischen Segmente mit den biokompatiblen PEG-Ketten konnten nach Zugabe von DNA Polyplexe erhalten werden. Durch die Anwendung *in vitro* an HUVEC und VSMC Zellen, welche beide eine hohe Anzahl der Integrine aufweisen, konnte ein deutlicher Unterschied zwischen der Positiv- und Negativkontrolle ermittelt werden. Beide Zelllinien wurden signifikant schlechter durch den Kontrollvektor ohne das RGD-Label transfiziert. Durch Zugabe von freiem cRGD zum Wachstumsmedium, war ebenfalls eine deutliche Abnahme der Transfektionseffizienz zu beobachten, was eine kompetitive Hemmung nahelegt. Die so ermittelten Ergebnisse zeigen die Potenz eines kleinen Labels und die Auswirkung auf biologische Experimente.

An Stelle eines polymerbasierten Vektors konnten Chen *et al.* ein deutlich kleineres Bindungsmotiv verwenden, indem acht Arginin (R8) Einheiten verwendet wurden.^[151] Wie bereits schon erwähnt ist es möglich durch diese Peptidsequenz eine geringe Transfektionseffizienz zu erreichen. In diesem Beispiel wurde allerdings ein Bola-ähnliches Amphiphil durch die Kombination aus R8 mit einem hydrophoben Linker und der RGD-Sequenz erreicht (**24, Abbildung 1-24**).



24

Abbildung 1-24. Strukturformel des amphiphilen Vektors **24** auf Basis von Octaarginin.

Ein Vergleich bei dem ein langer, ein kurzer Linker, sowie kein Linker und das reine Octapeptid eingesetzt wurde, zeigte einen deutlichen Zuwachs in der Transfektionseffizienz bei längerem Linker. Für die maximale Effizienz wurden ähnliche Werte wie zu JetPEI ermittelt und so konnte eine deutliche Steigerung durch das Label nachgewiesen werden. Die biologischen Assays an HeLa und HEK293t Zellen zeigten für beide Zelllinien ein

ähnliches Verhalten, was jedoch im Gegensatz zu der Integrin Expression von 293t Zellen steht.^[118] In diesem Fall könnte also ein weiterer Effekt für die Steigerung der Transfektionseffizienz verantwortlich sein.^[152]

1.4.4 Zellspezifische Gentransfektion durch Biotin

Nicht nur die Aufnahme von Wirkstoffkomplexen in Krebszellen kann durch die Konjugation mit Biotin verbessert werden, sondern auch eine Anwendung in der Gentransfektion. In einem Literaturbeispiel von Liu *et al.* konnte gezeigt werden, dass ein cyclenbasierter Vektor Gentransfektion ermöglicht.^[153] Ein Vergleich zu Lipofectamin® 2000 zeigte zwar eine geringere Transfektionseffizienz als **25 (Abbildung 1-25)**, jedoch auch eine geringere Zytotoxizität, was durch einen biolabilen Carbamatlinker erklärt wurde. Dieser ist bei neutralem pH-Wert stabil, wird jedoch säurekatalysiert (pH niedrig) gespalten.

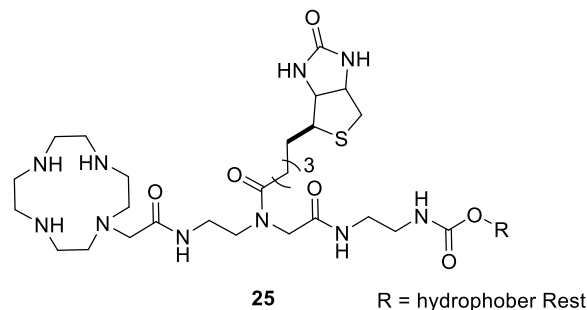


Abbildung 1-25. Strukturformel des cyclenbasierten Transfektionsvektors.

Durch die Verwendung verschiedener hydrophober Reste (Cholesterol, Diosgenin, Tocopherol) und des Biotin-Labels konnte eine erfolgreiche Transfektion an A549 und HEK293 Zellen bewiesen werden. Ebenfalls konnte ein Unterschied zwischen den beiden Zelllinien festgestellt werden, wobei ein Zusammenhang zwischen Biotinrezeptordichte und Transfektionseffizienz gezeigt wurde. A549 Zellen mit einer hohen Anzahl der Rezeptoren wurden häufiger transfiziert als HEK293 Zellen mit einer niedrigen Anzahl.

Die Verwendung von Biotin in Kombination mit Chitosan wurde bereits in Kapitel 1.2.2.2 kurz erwähnt und soll im Bezug zu einer zellselektiven Transfektion genauer beleuchtet werden. In einer Veröffentlichung von Cheng *et al.* konnte gezeigt werden, dass durch die Kombination aus Biotin und Chitosan ein Vektor synthetisiert werden konnte, der gute physikochemische Eigenschaften für einen Einsatz in der Gentransfektion hat.^[80] Hierzu wurden 35% der freien Amine des Polymers mit Biotin funktionalisiert, was durch ¹H-NMR-Spektren belegt wurde.

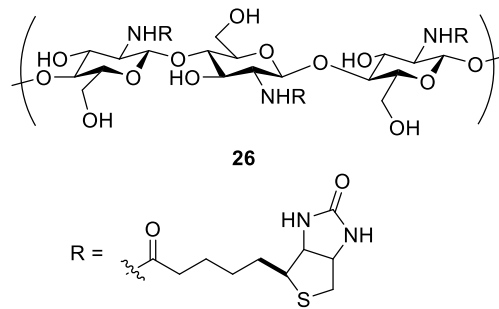


Abbildung 1-26. Strukturformel des Biotin-Chitosan Konjugats von Cheng *et al.*^[80]

Der erhaltene Vektor zeigte einen deutlichen Unterschied in der Transfektionseffizienz von SMMC-7721 (Hepatocarcinom) und LO2 Zellen (Hepatozyt), wobei erstere um einen Faktor zwei besser transfiziert wurden. Somit konnte bereits ein erster Unterschied zwischen natürlichen Zellen und dem Karzinom ausgemacht werden. Durch eine Literaturrecherche im Zusammenhang mit dieser Arbeit stellte sich allerdings heraus, dass die beiden verwendeten Zelllinien keine Leberzellen sind. Beide wurde in einer anderen Publikation als Derivate der HeLa-Zelllinie identifiziert, welche aus einem Zervixkarzinom entnommen wurde.^[154] Die gezeigten Ergebnisse sollten daher unter diesen neuen Erkenntnissen kritisch betrachtet werden. Im Vergleich zu einer Negativkontrolle aus nicht-konjugiertem Chitosan, konnte ebenfalls eine Verbesserung der Effizienz von einem Faktor größer zwei an SMMC-7721 Zellen ermittelt werden. Durch Inkubation der Zellen mit variablen Konzentrationen an Biotin konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme der Transfektionseffizienz beobachtet werden. Der Einsatz *in vivo* konnte ebenfalls die Überlebensrate von krebserkrankten Mäusen von 15 Tagen (ohne Behandlung) auf über 40 erhöhen. Aus den so präsentierten Ergebnissen ist deutlich zu erkennen welchen Einfluss ein kleines Bindungsmotiv wie Biotin auf biologische Assays haben kann.

Der Einsatz von Calciumphosphat-Nanopartikeln ist eine Möglichkeit, um Zellen durch Co-Präzipitation zu transfizieren.^[87] Um jedoch eine Zellspezifität zu erreichen kombinierten Liang *et al.*, diesen Ansatz mit Heparin-Biotin, Heparin, und Calciumcarbonat und erhielten so Nanopartikel, welche sowohl für einen Wirkstofftransport als auch für die Gentransfektion eingesetzt werden konnten.^[155] Dieser Co-Transport von DNA und Doxorubicin bewirkte eine deutliche Abnahme der Zellüberlebensrate, was umgekehrt proportional zur Transfektionseffizienz steht. Da allerdings nur HeLa Zellen in dieser Studie untersucht wurden, kann kein Rückschluss auf die tatsächliche Fähigkeit des Vektorsystems gezogen werden, Zellen selektiv zu transfizieren.

Ein weiterer Vektor auf der Basis von Chitosan konnte durch Darvishi *et al.* erfolgreich synthetisiert werden.^[156] Eine Konjugation mit PEI sollte für eine Verbesserung der DNA-bindenden Eigenschaften eingesetzt werden und durch Kombination mit Biotin eine

Zellspezifität erreicht werden (**Abbildung 1-27**). Als Vergleich wurde ein Vektor ohne Label eingesetzt und PEI (25 kDa) diente als weitere Kontrolle.

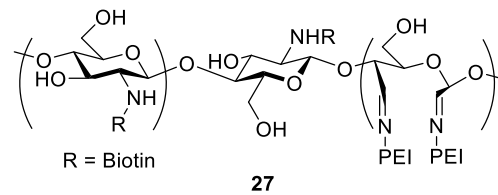


Abbildung 1-27. Strukturformel des auf Chitosan basierenden Vektors mit PEI und Biotin Funktionalisierung.

Die zu Beginn angestellten Toxizitätsstudien zeigten eine deutlich geringere Überlebensrate für HeLa und OVCAR-3 Zellen für PEI als für die synthetisierten Vektoren. Diese sind über einen breiten Konzentrationsbereich nicht toxisch und wurden entsprechend in Transfektionsassays eingesetzt. Hier zeigte sich für HeLa Zellen, dass der Biotin-markierte Vektor eine bessere Transfektionseffizienz als PEI und die Negativkontrolle erreichte. Ein ähnliches Bild konnte für OVCAR-3 Zellen beobachtet werden, wobei die Transfektionseffizienz allerdings noch deutlich höhere Werte erreichte. An Stelle einer Berechnung der relativen Effizienz, wurden die Expression eines Rezeptors (Epidermal Growth Factors Receptor, kurz: EGFR) gemessen. Durch die Verwendung von siRNA konnte die Menge an exprimierten Rezeptoren bei einer erfolgreichen Transfektion verringert werden. In diesen Versuchen konnte durch die Verwendung von **27** eine Verringerung der Expression von 4% an HeLa Zellen und 11% an OVCAR-3 Zellen gemessen werden. Diese Werte allerdings in einen Vergleich zu den bisher beschriebenen Vektoren einzuordnen ist nur schwer möglich, da siRNA nicht bis in den Zellkern vordringen muss, um eine Wirkung zu entfalten. Es konnte durch diese Experimente jedoch gezeigt werden, dass eine Verbesserung der Transfektionseigenschaften im Bezug auf Effizienz und Zytotoxizität im Vergleich zu PEI erreicht werden konnte.

Die Transfektionseigenschaften der Vektoren, welche in den vorherigen Kapiteln vorgestellt wurden zeigen noch Verbesserungspotenzial bei der Selektivität für Oberflächenrezeptoren. Ebenfalls wurden in den meisten Fällen nur wenige verschiedene Zelllinien miteinander verglichen, was problematisch ist, da häufig auch metabolische Unterschiede zwischen diesen vorliegen. Ein weiterer Kritikpunkt ist die Komplexität vieler Systeme, wobei nur in wenigen Fällen eine klare Struktur-Wirkungsbeziehung ermittelt werden kann. Diese Probleme sollen im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe eines „small molecule“ Ansatz adressiert werden, um eine deutliche Verbesserung der Transfektionseigenschaften potentieller Vektoren zu erreichen.

2 AUFGABENSTELLUNG

Wie in der Einleitung beschrieben wurde, kann Gentransfektion einen Beitrag dazu leisten eine Behandlung verschiedener Krankheiten zu verbessern. Vektoren auf Basis von Guanidincarbonylpyrrol (GCP) können dabei mit vielen Vorteilen aufwarten. GCP ist ein kleiner Baustein, der eine starke Bindung von Phosphatresten ermöglicht und so DNA bindet. Wie in **Abbildung 2-1** (A) dargestellt bildet das Guanidin des GCP-Kations zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu dem Phosphatrückgrat der DNA aus. Hierzu werden weitere durch das Pyrrol-NH und das Amid-NH ergänzt. Dies führt zu einer starken Bindung von Phosphaten in wässrigem Milieu. Die Transfektionsvektoren, welche auf diesem Motiv beruhen (weitere Informationen in Kapitel 1.2.2.4 der Einleitung) zeigen einzigartige Eigenschaften.^[96,97] Sie bilden somit eine Grundlage für weitere Forschung zu diesem Thema. Als ein besonders kleines und leicht zu modifizierendes Molekül sollte dabei der Vektor von Li *et al.* (**Abbildung 2-1** (B), **12**, Lys₄(GCP)-NH₂) bestehend aus vier Lysinen, welche mit dem GCP-Motiv funktionalisiert wurden, dienen.

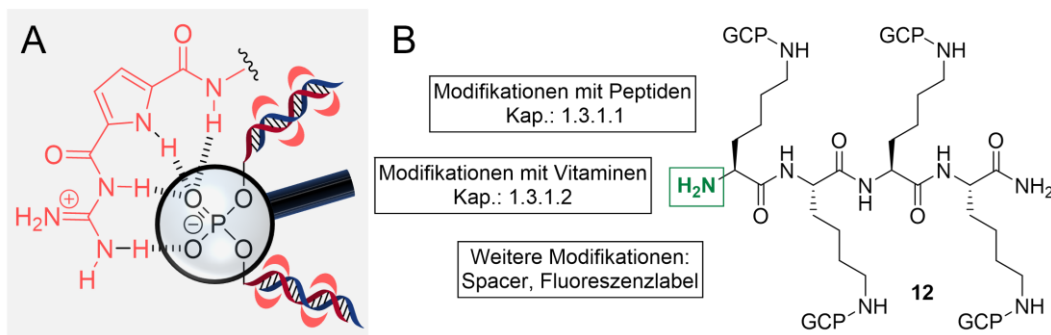


Abbildung 2-1. Darstellung des Bindungsverhaltens des GCP-Kations und des Transfektionsvektors (**12**, Lys₄(GCP)-NH₂) auf Basis von Lysin und GCP, sowie mögliche Modifikationen welche neue Funktionalitäten ermöglichen.

Besonders ist hierbei, dass der *N*-Terminus als ungeschütztes Amin vorliegt und so einen möglichen Punkt für die Einführung von strukturellen Veränderungen zeigt. Ziel möglicher Veränderungen sollte vor allem die Erreichung eines zellselektiven Charakters sein. Wichtig in dieser Arbeit ist daher eine Selektivität für bestimmte Krebszelllinien zu erzielen, so dass ein deutlicher Unterschied in der Transfektionseffizienz gemessen werden kann. Dieses Prinzip ist in **Abbildung 2-2** (B) dargestellt.

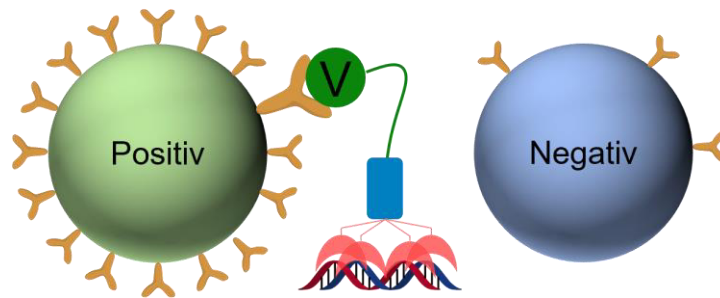


Abbildung 2-2. Illustration der selektiven Transfektion von Zellen in Abhängigkeit der Rezeptordichte.^[157]

Der Vektor bestehend aus einer auf GCP basierenden DNA-Bindungseinheit (rot) bindet das genetische Material. In grün ist ein Label dargestellt, was mit Oberflächenrezeptoren auf den Zielzellen interagiert. Diese beiden wichtigen Bestandteile sollen durch einen kovalenten Linker (blau) miteinander verbunden werden. Die Entwicklung einer Verbindungseinheit kann durch mehrere Variablen wie zum Beispiel die Länge, der hydrophile Charakter und zusätzliche Ladungen gesteuert werden. Die Selektivität soll dadurch erreicht werden, dass manche Zelllinien eine größere Anzahl der Rezeptoren präsentieren als andere. Eine Interaktion zwischen dem Vektor-DNA Komplex und der Oberfläche der Zielzelle ist somit deutlich wahrscheinlicher, was sich in einer gesteigerten Transfektion dieser Zellart manifestiert. Zellen mit hoher Rezeptordichte werden daher in dieser Arbeit als Positivkontrolle bezeichnet. Umgekehrt werden Zellen mit einer niedrigen Dichte Negativkontrolle genannt.

Bisherige Publikationen (siehe Einleitung Kapitel 1.4) evaluieren die Transfektionsvektoren nur an einer geringen Anzahl an Ziellinien (2 – 3) pro Vektor.^[151] Die Genauigkeit der Ergebnisse sollte allerdings mit einer größeren Stichprobe steigen. Ein wichtiger Teilaspekt dieser Arbeit ist, dass im Vergleich zu früheren Studien die Vektoren an mehreren Zelllinien getestet werden, um genauere Ergebnisse für das Transfektionsverhalten zu erreichen.

Der Unterschied in der Transfektionseffizienz zwischen Positiv- und Negativkontrolle diente in den zuvor erwähnten Veröffentlichungen als Indikator für die Leistung des Vektors. Hierbei wurde bisher bestenfalls ein Unterschied in der Effizienz von einem Faktor drei bis vier erzielt. Für eine erfolgreiche Anwendung ist eine Verbesserung des Unterschieds in der Transfektionseffizienz um Größenordnungen entscheidend, woraus die erste Aufgabe in dieser Arbeit abgeleitet wird.

1. Das erste Ziel dieser Arbeit ist es einen Unterschied in der Transfektionseffizienz von Positiv- zu Negativkontrollen zu erreichen der höher ist, als in vergleichbaren Veröffentlichungen.

Bisherige Veröffentlichungen sollen für einen späteren Vergleich zu einem neuen System herangezogen werden, um eine Evaluation der Ergebnisse zu ermöglichen.

Bereits publizierte Ergebnisse für eine zellselektive Transfektion sind komplex und die Entwicklung nur schwer nachzuvollziehen. Häufig werden mehrere molekulare Veränderungen am System gleichzeitig vorgenommen und können nicht eindeutig mit den biologischen Ergebnissen korreliert werden. In den meisten Fällen werden nur wenige Vektoren synthetisiert und diese dann in physikochemischen und biologischen Assays evaluiert. Dies ist besonders bei Vektoren auf Polymerbasis häufig anzutreffen. Hierbei können häufig eine Vielzahl verschiedener Änderungen (z.B. Anzahl der Ladungen, Verzweigung der Polymere, Kettenlängen der Polymere, Interaktion mit dem genetischen Material) vorgenommen werden. Von großen Interesse ist in diesem Zusammenhang, einen Rückschluss zwischen bewusster Änderung und biologischer Wirkung zu erhalten. Dies scheint allerdings in bisherigen Publikationen nicht durchgeführt worden zu sein. Somit werden nur selten genaue Struktur-Wirkungsbeziehungen erläutert und eine genereller „Lerneffekt“ für das zukünftige Design von Transfektionsvektoren bleibt aus. Durch die Wahl von kleineren, weniger komplexen Systemen wie Chen *et al.* können Veränderungen jedoch kleinschrittig und nachvollziehbar vorgenommen werden.^[151] Aus diesem Aspekt kann demnach das zweite wichtige Ziel der Arbeit formuliert werden.

2. Ziel dieser Arbeit ist daher, dass Planung und Durchführung von strukturellen Veränderungen am Transfektionsvektor der Analyse von Struktur-Wirkungsbeziehungen dienen sollen.

Vor diesem Hintergrund soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf Basis des Vektors (**12**, Lys₄(GCP)-NH₂) von Li *et al.*^[104] ein System rational entwickelt werden, welches Zell-spezifisch ist und eine Analyse von Struktur-Wirkungsbeziehungen möglich macht. Um auf diese Weise auch einen Einblick in die zugrundeliegenden Strukturwirkungsbeziehungen zu erhalten, sollen sukzessiv strukturelle Änderungen des *N*-Terminus durchgeführt und deren Wirkung in biologischen Assays analysiert werden. Dabei soll unter anderem die Anzahl an Ladungen variiert werden, die im wässrigen Milieu vorliegen. Dieses Konzept im Hinblick auf die Synthese eines zellselektiven Transfektionsvektors ist in **Abbildung 2-3** dargestellt.

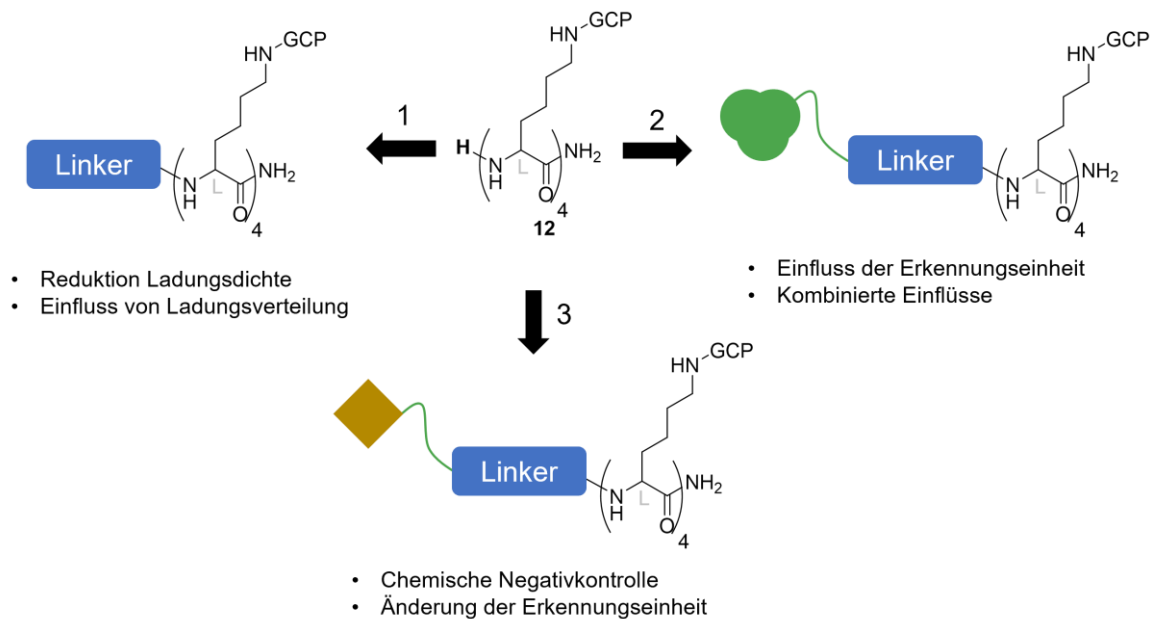


Abbildung 2-3. Grafische Darstellung der geplanten Analyse von Struktur-Wirkungsbeziehungen eines möglichen, zellselektiven Transfektionsvektors.

Die strukturellen Änderungen sehen eine Modifikation des freien *N*-Terminus vor, welcher unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegt. Somit kann ein Beitrag dieser Ladung zur Bindung und Komplexierung der DNA nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren könnte die Entwicklung einer Linkereinheit während der kommenden Synthesen einen wichtigen Beitrag leisten, um die Eigenschaften des Vektors zu beeinflussen. Hierdurch ließen sich neue Funktionen in das bestehende System integrieren. Durch die Wahl von hydrophoben oder hydrophilen Molekülen könnten die Transfektionseigenschaften stark beeinflusst werden. Hierzu zeigen die Resultate von Kuchelmeister *et al.* wie wichtig die Balance zwischen Hydrophilie und -phobie ist.^[99] Des Weiteren könnte durch die Linkereinheit eine größere Distanz zwischen DNA-Bindungseinheit und der Erkennungseinheit für Krebszellen erreicht werden. Somit könnte vor allem die Selektivität in diesem Fall beeinflusst werden. Das Anbringen einer Linkereinheit würde allerdings die Nettoladung, verringern, worauf bei der Planung der Synthesen geachtet werden sollte. Somit könnte die Evaluation des Einflusses der Linkereinheit ein erster sinnvoller Arbeitsschritt bei der Synthese eines Vektors sein.

In einem nächsten Schritt sollten die kombinierten Eigenschaften der Linkereinheit und der Erkennungseinheit für Krebszellen ermittelt werden. Die in Kapitel 1.3 gezeigten Beispiele für solche Moleküle bringen weitere Einflüsse in das System ein. Label auf Peptidbasis können hydrophile oder hydrophobe Aminosäuren verwenden. Die gezeigten Vitamine sind dagegen ausschließlich hydrophob. Somit sollten zunächst die Einflüsse der Erkennungseinheit evaluiert werden. Sollten in diesem Fall Probleme auftreten, könnten diese durch eine Variation der Linkereinheit eventuell ausgeglichen werden. Hierbei sollte allerdings das

schrittweise vorgehen nicht vernachlässigt werden, um eine Analyse zu gewährleisten. Dies ist demnach ein zweiter Schritt zur Entwicklung eines gewünschten Vektors.

Nach durchgeführten biologischen Experimenten könnte diese noch um eine Negativkontrolle erweitert werden. Hierbei könnte die Zellerkennungseinheit durch eine nicht bindende Struktureinheit ersetzt werden. Dies würde die biologischen Ergebnisse weiter untermauern und den Einfluss des Labels noch hervorheben.

Sollte es in einem dieser Schritte zu unvorhergesehenen Problemen kommen könnten diese durch die Verwendung ternären Komplexe potentiell umgangen werden. Hierbei werden Vektoren mit verschiedenen Eigenschaften verwendet, um genetisches Material zu binden. Diese Transfektionsvektoren müssen nicht in der Lage sein, allein eine Transfektion zu ermöglichen. Jedoch könnten positive Eigenschaften in Kombination mit einem zweiten Vektor dies ermöglichen. Dieses Prinzip ist in **Abbildung 2-4** dargestellt und könnte für den Verlauf dieser Arbeit entscheidend beeinflussen.

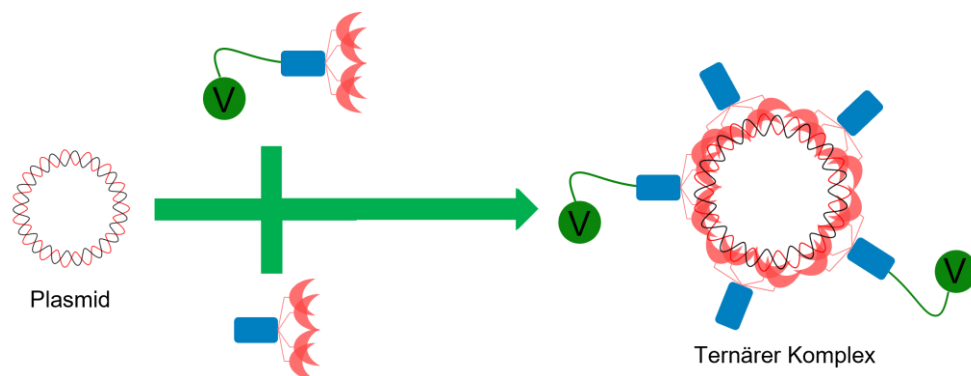


Abbildung 2-4. Darstellung eines ternären Komplexes aus zwei verschiedenen Transfektionsvektoren und Plasmid-DNA.

Für alle diese Entwicklungsschritte sind vergleichende, biologische Tests von hoher Wichtigkeit, da sowohl die Entwicklung als auch die Erklärung der Struktur-Wirkungsbeziehung hiervon abhängen. Deshalb sollte in Zusammenarbeit mit dem AK Knauer eine solide Teststrategie entwickelt werden, mit dem alle synthetisierten Vektoren getestet werden.

Die Unterschiede zwischen einzelnen biologischen Experimente sollte dabei so klein wie möglich gehalten werden, um zuverlässige Ergebnisse zu erzielen. Zum Nachweis einer Zellselektivität des Vektors müssen mehrere verschiedene Zelllinien miteinander verglichen werden. Verschiedene Krebszellen lassen sich allerdings zu einem unterschiedlichen Grad transfizieren, was durch eine Variation der erreichten Transfektionseffizienz dargestellt wird. Die Bestimmung der Effizienz könnte in Zusammenarbeit mit dem ICCE an der Universität Duisburg-Essen mit Hilfe der automatisierten Analyse von Fluoreszenzbildern durchgeführt werden. Um die These der Zellselektivität zu untermauern, sollten daher mehrere

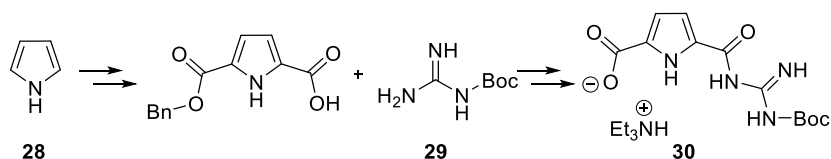
verschiedene Zelllinien miteinander verglichen werden. Im optimalen Fall bleibt die Rezeptordichte als einziger Unterschied zwischen den Zellen bestehen.

Ein weiterer Nachweis für den Einfluss eines Labels auf die Erkennung des Vektors durch die Krebszelle, ließe sich auch mit Hilfe eines Konkurrenztests erbringen. Hierzu würde der Bindungspartner im Wettbewerb mit dem Vektor, um die Bindung an den Oberflächenrezeptor stehen.

Unter diesen Voraussetzungen sollte daher mit der Darstellung des GCP-Bindungsmotives begonnen werden. Im Anschluss daran sollte die Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen folgen. Mit diesem Vorgehen sollte dann auch das wichtigste Ziel dieser Arbeit, die selektive Transfektion von spezifischen Krebszellen, ermöglicht werden.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Als Grundlage für alle in Rahmen dieser Arbeit hergestellten Vektorkandidaten diente der in der Schmuck-Gruppe entwickelte Anionenbinder GCP, der wie in der Einleitung (Kapitel 1.2.2.4) dargestellt ein vielfältiges Anwendungsspektrum zulässt. Daher war es auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit notwendig große Mengen der Carbonsäure **30** herzustellen. Hierzu wurde die Synthese wie in **Schema 3-1** gezeigt in Anlehnung an die, schon mehrfach publizierten, Veröffentlichungen durchgeführt.^[95] Hierzu wurde von Pyrrol (**28**) und geschütztem Guanidin (**29**) ausgegangen und nach mehrstufiger Synthese das Produkt (**30**) erhalten.



Schema 3-1. Syntheseübersicht des Anionenbinders (**30**) aus den Edukten Pyrrol (**28**) und geschütztem Guanidin (**29**).

Die freie Carbonsäure kann in der Festphasenpeptidsynthese zur Modifikation von freien Aminen verwendet und die Boc-Schutzgruppe säurekatalytisch entfernt werden. Die freie Guanidin-Einheit kann dann wie in **Abbildung 1-8** gezeigt (Kapitel 1.2.2.3 der Einleitung) an Phosphate oder andere Anionen binden. Mit **30** modifizierte Peptide zeigen somit auch eine Bindung von genetischem Material. Auf dieser Grundlage wurde im Rahmen der vorangegangenen Masterarbeit die Synthese eines Transfektionsvektors unternommen, welches sowohl das GCP-Motiv als auch Biotin enthielt, um eine zellselektive Gentransfektion zu ermöglichen.

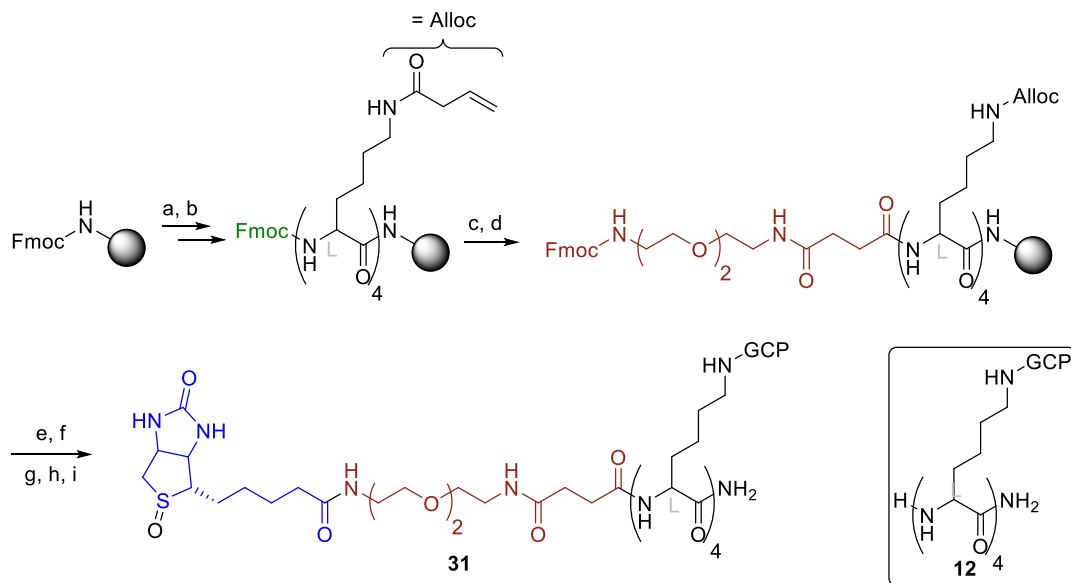
3.1 Auslotung und Analyse von Struktur-Wirkungsbeziehungen

Zum Ende der Masterarbeit konnte ein Vektorsystem hergestellt werden, welches sowohl das GCP-Motiv als auch ein Biotinlabel vereinte.^[158] Grundlage hierfür war der Vektor von Li *et al.* (**12**, Lys₄(GCP)-NH₂), welcher um eine Linkereinheit und das Label erweitert wurde.^[104] Eine genaue Analyse des Produktes, sowie weiterer Eigenschaften wurde nicht durchgeführt und stellt somit einen passenden Startpunkt für diese Arbeit dar. Im Verlauf dieser Arbeit sollten diese Tests als Grundlage dienen, um mögliche Veränderungen am Vektorsystem zurückzuverfolgen und eine Analyse von Struktur-Wirkungsbeziehungen zu ermöglichen.

3.1.1 Evaluation des ersten Prototypen

Die in vorangegangenen Arbeiten synthetisierte Verbindung **31** (**Schema 3-2**) ist, durch die strukturelle Ähnlichkeit zum publizierten Vektor (**12**, **Schema 3-2**, rechts eingerahmt), ein passender Vergleich zu diesem.^[104,159] Unter Verwendung von Alloc-Schutzgruppen, welche

orthogonal zu säurelabilen Schutzgruppen mit Hilfe von Pd(0) entfernt werden, konnte die Synthese durchgeführt werden. Eine Verlängerung des Peptidrückgrates am *N*-Terminus des Harzes bzw. der zuvor gekuppelten Bausteine wurde durch die Verwendung des Kupplungsreagenzes PyBOP in Kombination mit DIPEA in DMF und der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe ermöglicht. Nach den ersten vier Kupplungsschritten der Aminosäure Fmoc-Lys(Alloc)-OH, wurde der Fmoc-geschützte Ethylenglykol Linker (nachfolgend als EDS-Linker bezeichnet) unter den gleichen Kupplungsbedingungen angebracht. Die abschließende Derivatisierung mittels Biotin wurde durch Mikrowellen-gestützte Synthese vollendet. Wichtig hierbei ist, im Hinblick auf zukünftige Synthesen, dass das Harz während eines Kupplungsschrittes mit Hilfe eines leichten Argonstroms im Lösemittel bewegt wird, die Entfernung des Lösemittels wird durch Anlegen eines Unterdrucks erreicht. Das Harz wird währenddessen Luft und somit Luftsauerstoff ausgesetzt. Die Alloc-Schutzgruppen wurden unter Pd(0) Katalyse entfernt und das GCP-Motiv (**30**) im Anschluss gekuppelt. Das Produkt (**31**, Lys₄(GCP)-EDS-Biotin(sulfoxid), **Schema 3-2**) der Synthese konnte im Anschluss durch eine Mischung aus TFA/H₂O/TIS (95:2.5:2.5) von der festen Phase abgespalten werden und nach Einengen im Vakuum in kaltem Et₂O gefällt werden. Nach lyophilisieren aus Wasser konnte so das Rohprodukt erhalten werden.



Schema 3-2. Syntheseroute der Festphasenpeptidsynthese von **31** im Rahmen voriger Arbeiten; in rot dargestellt der Ethylenglykollinker, in blau Biotin mit dem potenziell oxidierten Thioether.^[158]

Reagenzien und Bedingungen: a) Piperidin (20%), DMF, 60 °C, 1 min, 5 min; b) Fmoc-Lys(Alloc)-OH, PyBOP, DIPEA, DMF, 60 °C, 20 min; c) Piperidin (20%), DMF, 60 °C, 1 min, 5 min; d) EDS-Linker, PyBOP, DIPEA, DMF, 60 °C, 30 min; e) Piperidin (20%), DMF, 60 °C, 1 min, 5 min; f) Biotin, PyBOP, DIPEA, DMF; 60 °C, 30 min; g) Pd(PPh₃)₄, PhSiH₃, DCM, 30 °C, 10 min (2x); h) GCP(Boc)*NEt₃, PyBOP, DIPEA, 60 °C, 30 min; i) TFA, TIS, H₂O, RT, ü.N..

Eine chromatographische Trennung der Produktfraktionen an Umkehrphase unter Zuhilfenahme von MPLC-Technik konnte erreicht werden und das Produkt als weißer Feststoff in einer Reinheit von 96% erhalten werden. Der Austausch des Gegenions der Amine und Guanidine in das Chlorid Salz (vorher Trifluoressigsäure) wurde zu diesem Zeitpunkt der Arbeit als sinnvoll erachtet^[160] und durch mehrmaliges Umsetzen des Produktes mit HCl_{aq} in MeOH erreicht. Das so hergestellte Peptid wies allerdings nach der Synthese eine Oxidation am Schwefelatom des Biotin Labels (Biotinsulfoxid) auf, worauf massenspektrometrische Messungen hinwiesen. Hier wurde für m/z eine Veränderung um +16 gemessen, was auf ein zusätzliches Sauerstoffatom zurückgeführt werden könnte. Dies könnte durch verbliebene Palladiumreste im Harz und durch Lutsauerstoff beim Entfernen des Lösemittels ausgelöst worden sein. Diese Vermutung sollte in weiteren Untersuchungen getestet werden, um so die unerwünschte Oxidation des Labels in Zukunft zu verhindern.

3.1.1.1 Strukturbestimmung mittels NMR

Um eine Oxidation am zuvor erwähnten Schwefelatom zu belegen wurden NMR-Studien zur Strukturaufklärung von **31** vorgenommen und mit D(+)-Biotin verglichen. Die bis dahin erhobenen massenspektrometrischen Daten wiesen nur auf eine Veränderung der molekularen Masse um +16 hin, was allerdings nicht zwangsläufig durch eine Oxidation des Biotins bedingt sein musste. Die NMR-Spektren konnten zwar auf Grund der hohen Komplexität und geringen Probenkonzentration nicht vollständig zugeordnet werden, zeigten jedoch strukturell signifikante Signale. Neben dem GCP-Bindungsmotiv konnten durch Vergleichsspektren von D(+)-Biotin diese Protonen und Kohlenstoffatome identifiziert werden. Hierbei fiel vor allem eine Verschiebung von ¹H und ¹³C Signalen am Fünfring in räumlicher Nähe des Thioethers auf.

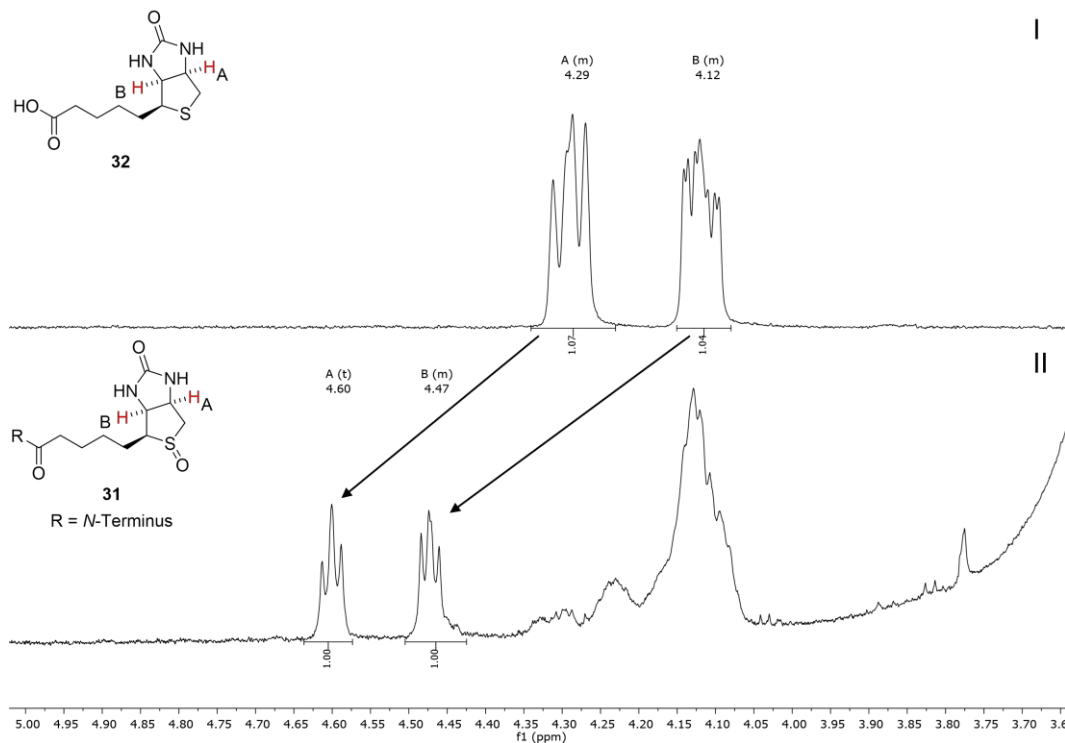


Abbildung 3-1. Vergleich zweier ^1H -NMR Spektren in DMSO-d_6 im Bereich zwischen 5.0 – 3.6 ppm; I) ^1H -Spektrum von D(+)-Biotin, II) ^1H -Spektrum von **31**; oben links: Strukturformel von Biotin(sulfoxid).

In **Abbildung 3-1** ist ein Ausschnitt aus zwei ^1H -NMR Spektren gezeigt, bei denen eine deutliche Verschiebung der entsprechenden Signale zu beobachten ist. Hierzu wurde ein Bereich zwischen 5.0 – 3.6 ppm ausgewählt, um den beobachteten Effekt deutlich zu machen. Die in rot hervorgehobenen Protonen A und B zeigen zwischen der gekauften Verbindung (**32**, **Abbildung 3-1**) und der gekuppelten, potentiell oxidierten Spezies (**31**, II) eine Verschiebung um 0.31 ppm für Wasserstoffatom A. Ein ähnlicher Trend lässt sich für das Proton B beobachten, welches um einen Wert von 0.35 ppm in den Tieffeldbereich verschoben wird. Eine Oxidation am Schwefelatom könnte dabei zu einer Verschiebung zu höheren ppm-Werten führen, da eine Entschirmung der Protonen durch die Elektronegativität des Sauerstoffs erreicht wird. Bemerkenswert ist allerdings, dass keine weiteren Protonen, welche in Nachbarschaft zum Schwefelatom liegen, eine Verschiebung der Signale zeigen. Um die aufgestellte These der Oxidation noch zu untermauern, wurden daher zusätzliche ^{13}C -NMR Spektren angefertigt.

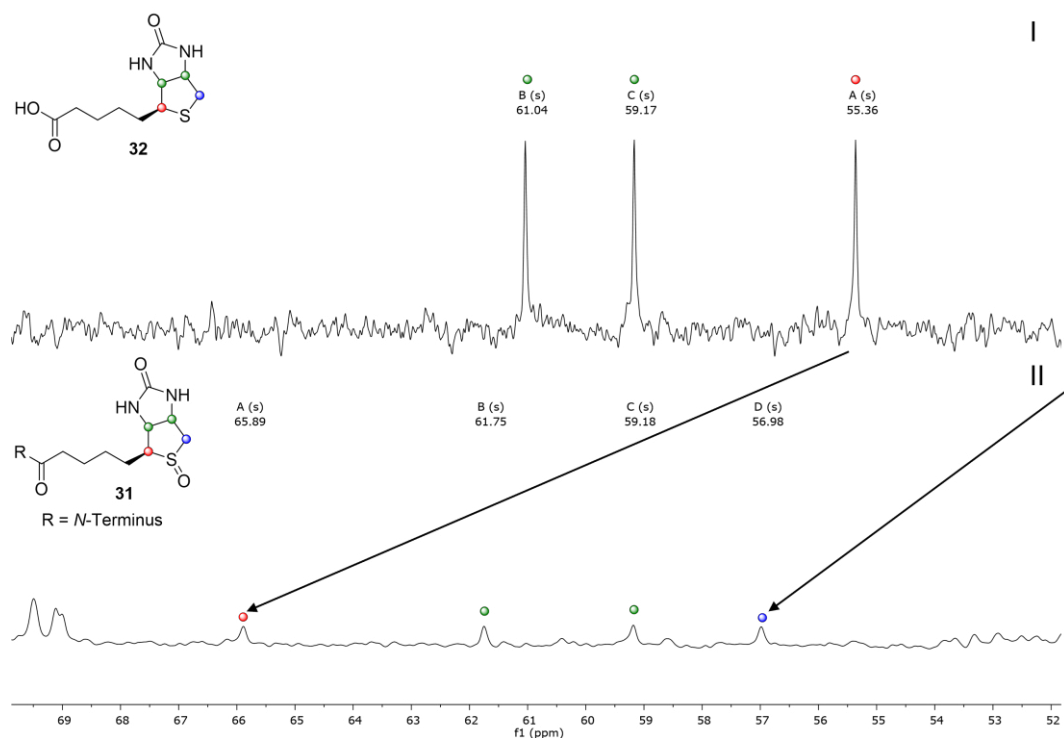


Abbildung 3-2. Vergleich zweier ^{13}C -NMR Spektren in DMSO-d_6 im Bereich 70 – 52 ppm; I) ^{13}C -Spektrum von D(+)-Biotin, II) ^{13}C -Spektrum von **31**; oben links: Strukturformel von Biotin(sulfoxid).

Die in **Abbildung 3-2** gezeigten ^{13}C -NMR Spektren zeigen einen Ausschnitt zwischen 70 – 52 ppm, bei dem eine deutliche Verschiebung zwischen Verbindung **31** und **32** zu beobachten ist. Die farbig hervorgehobenen Kohlenstoffatome wurden den einzelnen Peaks zugeordnet, wobei rot A entspricht, blau D und grün B und C. Die Zuordnung erfolgte durch 2D-NMR Experimente (COSY, HSQC, HMBC) und Vergleichsspektren.^[161] Im oberen Spektrum (I) ist das Biotin und im unteren Spektrum (II) das potentiell oxidierte Produkt gezeigt. Eine Verschiebung des Signals A ist sehr deutlich, da dort eine Änderung um ca. 10 ppm zu beobachten ist. Kohlenstoff D konnte im gemessenen Spektrum nicht gefunden werden, da eine Überlagerung mit dem Lösemittelsignal (DMSO-d_6 , Septett 39.0 – 40.0 ppm^[162]) dies verhinderte. In der Literatur wird allerdings für dieses Kohlenstoffatom eine chemische Verschiebung von 40 ppm angegeben, sodass hier eine Änderung um fast 17 ppm vorliegt.^[161] Diese deutliche Änderung der chemischen Verschiebung für die Kohlenstoffe in direkter Umgebung zu dem Schwefelatom legen nahe, dass es zu einer Oxidation gekommen ist. Mit der Charakterisierung durch analytische HPLC, Massenspektrometrie und NMR konnte die Synthese des Produktes und die Oxidation am Thioether belegt werden.^[163]

3.1.1.2 Physikochemische Messungen und Berechnungen

Die Oxidation des Schwefelatoms am Biotin konnte weder synthetisch zu diesem Zeitpunkt verhindert werden, noch Reduktionsbedingungen gefunden werden welche das Sulfoxid

selektiv reduzieren würden. Die nachgewiesene Oxidation des Schwefelatoms (**Schema 3-2**) könnte Einfluss auf die Bindung an den Vitamintransporter auf der Oberfläche von Krebszellen haben. Ein Vergleich der Bindungskonstanten zu Avidin, einem natürlichen Bindungspartner für Biotin, könnte einen Hinweis auf eine ähnliche Wirkung geben und somit Grundlage für weitere biologische Experimente sein. Andernfalls müsste eine Anpassung der Synthesestrategie vorgenommen werden. Eine vergleichbare Bindungskonstante des Sulfoxids an Avidin sollte daher einen Anhaltspunkt für die strukturellen Ähnlichkeiten zwischen der physiologischen und der oxidierten Spezies geben. Die in der Literatur gemessene ähnliche Bindungskonstante^[164] von Biotinsulfoxid im Vergleich zu Biotin ließ entsprechende physikochemische und biologische Tests von **31** (Lys₄(GCP)-EDS-Biotin(sulfoxid)) als sinnvoll erscheinen. Das ähnliche Bindungsverhalten sollte des Weiteren quantitativ belegt werden, weshalb molekulare Modeling Versuche mit Maestro unternommen (**Abbildung 3-3**) wurden. Hierzu wurde die Kristallstruktur (2AVI) von Avidin verwendet, welches als Co-kristall mit Biotin vorliegt.^[165]

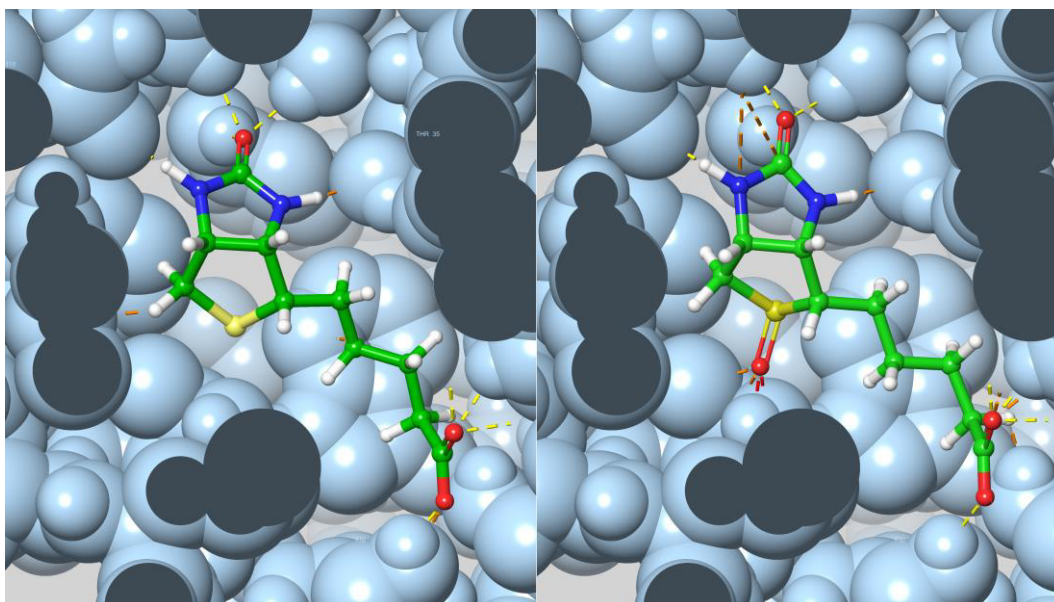


Abbildung 3-3. Ausschnitte aus Modeling-Experimenten der Kristallstruktur von Avidin mit Biotin(sulfoxid); links: Biotin in der Bindungstasche; rechts: Biotinsulfoxid in der Bindungstasche.

Die in **Abbildung 3-3** gezeigten Ausschnitte aus der Kristallstruktur von Avidin zeigen Biotin auf der linken Seite, sowie Biotinsulfoxid auf der Rechten. Da die importierte Struktur bereits den natürlichen Bindungspartner enthält wurde ein „glide-dock“ direkt durchgeführt. Dies ergab einen „docking score“ von ca. -12. Durch das manuelle Einfügen eines Sauerstoffatoms am Schwefel und eine nachfolgende Minimierung der gezeichneten Struktur wurde der Ausschnitt auf der rechten Seite erhalten. Ein nachfolgendes „docking“ unter gleichen Bedingungen wie zuvor lieferte einen Wert von ca. -11. Diese miteinander

vergleichbaren Werte in Kombination mit den Werten aus der Literatur^[163,164] legen eine ähnliches Bindungsverhalten der beiden Spezies nahe.

Neben der Bindung des Biotins an den entsprechenden Rezeptor auf der Zelloberfläche ist die Fähigkeit des Vektors DNA zu komplexieren ein weiterer kritischer Punkt, welcher vor biologischen Experimenten sichergestellt werden sollte. Um zu ermitteln, dass das synthetisierte Peptid weiterhin ähnliche Bindungseigenschaften zum Ursprungsmolekül aufwies, wurden physikochemische Messungen durchgeführt. Hierzu wurde, wie bereits in einigen Publikationen und Arbeiten gezeigt, das Bindungsverhalten von **31** an ctDNA (engl.: *calf thymus DNA*) mittels DLS und Fluoreszenzmessungen untersucht.^[40,103,104,159]

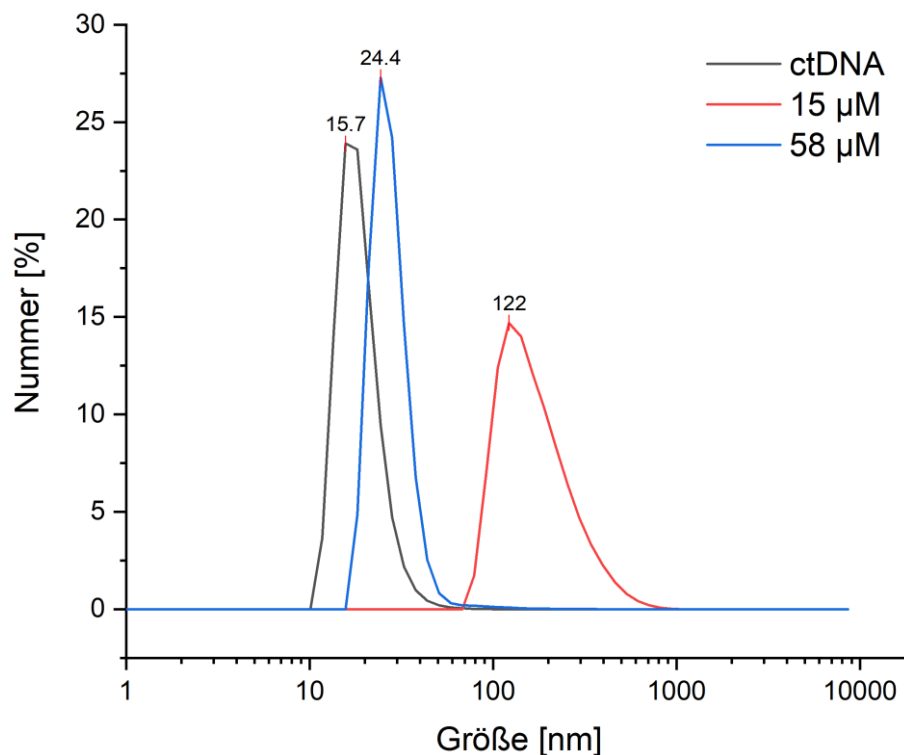


Abbildung 3-4. Darstellung der DLS-Größenverteilung (Zahl) von ctDNA (50 µM) mit Vektor **31** (Lys₄(GCP)-EDS-Biotin(sulfoxid)) in den Konzentrationen 15 µM und 58 µM.

Die zuvor vorbereitete DNA wurde in Anlehnung an die Literatur^[103] in 0.01 M Cacodylatpuffer (Dimethylarsinsäure in H₂O) bei pH 7 untersucht. Hierbei wurden kleine Partikel von ca. 15 nm Größe gemessen, was in **Abbildung 3-4** dargestellt ist. Durch Zugabe des Vektors wurde zuerst eine Vergrößerung der Partikel auf 122 nm beobachtet, welche jedoch bei weiterer Zugabe Werte von minimal 24 nm erreichten. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen könnte sein, dass zunächst mehrere DNA-Stränge vom Vektor miteinander verknüpft werden, so dass größere Aggregate gemessen werden können. Bei weiterer Zugabe können durch die höhere Konzentration mehr Bindungsmoleküle an einzelne DNA-Stränge binden, die so komprimiert werden und kleinere Partikel bilden. Eine weitere Erhöhung der Konzentration (über 58 µM) resultierte in keiner beobacht-

baren Veränderungen der Größe der Aggregate. Die Kondensation von DNA wird folglich durch den Vektor ermöglicht, was für eine endosomale Aufnahme des Komplexes in Zellen notwendig ist und auch eine optimale Größe für biologische Anwendungen aufweist.^[18] Auch der von M. Li entwickelte Vektor (**12**, Lys₄(GCP)-NH₂) zeigte Aggregate in ähnlicher Größe, wodurch eine Vergleichbarkeit zu dem Ursprungssystem weiterhin gegeben ist.^[159]

Als weitere physikochemische Messung wurde ein Ethidiumbromid (EB)-Verdrängungsassay durchgeführt, um ein vergleichbares Bindungsverhalten zu **31** sicherzustellen. Die Effizienz der Bindung der Transfektionsvektoren an das Phosphatrückgrat der DNA lässt sich hierbei durch die Verdrängung von interkalierten Molekülen wie zum Beispiel Ethidiumbromid (EB) bestimmen. Durch die Einlagerung eines AIE-Emitters zwischen die hydrophoben Basenpaare der DNA kommt es zu einer Verstärkung der Fluoreszenz.^[166] Durch Zugabe des Vektors wird das EB verdrängt und so eine Verringerung der Fluoreszenz beobachtet. Die Auftragung der Fluoreszenzemission bei 600 nm gegen den Molenbruch aus EB zu Vektor ergibt so eine Bindungskurve, woraus der EC₅₀-Wert berechnet werden kann. Diese Konzentration markiert den Punkt, ab dem die Hälfte des EB aus den Basenstapeln der DNA verdrängt wurde und wird als mittlere effektive Konzentration bezeichnet.

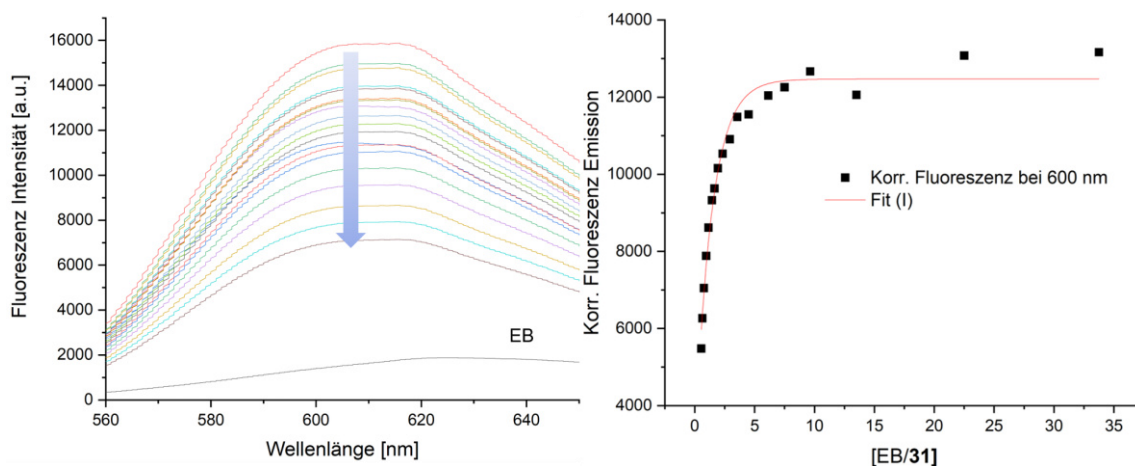


Abbildung 3-5. Kombinierte Fluoreszenzspektren (Ex.: 520 nm) des EB-Verdrängungsassays von **31** (Lys₄(GCP)-EDS-Biotin(sulfoxid)) auf der linken Seite; Auftragung der Fluoreszenz bei 600 nm und Fit der Daten mit Gleichung (Gl. I).

Um dies zu ermöglichen wurde Ethidiumbromid in 0.01 M Cacodylatpuffer gelöst und das Fluoreszenzspektrum bei einer Anregungswellenlänge von 520 nm gemessen.^[103]

Abbildung 3-5 zeigt auf der linken Seite die relative Fluoreszenz des Ethidiumbromids in Abhängigkeit von der Emissionswellenlänge. Nach Zugabe von ctDNA konnte ein starker Anstieg der Fluoreszenz beobachtet werden, dessen Maximum bei 600 nm lag. Durch Zugabe der gelösten Probe **31** in DMSO/H₂O (1:9) konnte nach und nach eine Abnahme des Maximalwertes gezeigt werden. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass eine Komplexierung der DNA durch den Vektor zu einer Veränderung der Abstände der Basenstapel führt, wodurch der Emitter verdrängt wird. Wie in **Abbildung 3-5** (rechte Seite)

gezeigt kann durch Auftragung des Verhältnisses aus EB zu **31** gegen die korrigierte Fluoreszenz eine abfallende Kurve ermittelt werden, welche durch nicht-lineare Regression (Exponentielle Abnahme erster Ordnung) genähert werden kann.

$$y = A1 \cdot e^{\left(\frac{-x}{t1}\right)+y0} \quad (\text{Gl. I})$$

$$x = -t1 \cdot \ln\left(\frac{y - y0}{A1}\right) \quad (\text{Gl. II})$$

Die so erhaltenen Werte können nach Umstellung von Formel Gl. (I) in Gl. (II) eingesetzt werden und die effektive Konzentration bei der die Hälfte des EB verdrängt (EC_{50}) wurde, ermittelt werden. Der für **31** erhaltene Wert von $1.28 \mu\text{M} \pm 0.32 \mu\text{M}$ ist zwar höher als der durch M. Li Gemessene, liegt aber im Vergleich zu $0.85 \mu\text{M}$ (für **12**, $\text{Lys}_4(\text{GCP})\text{-NH}_2$) in einer ähnlichen Größenordnung.^[104]

Aus allen Messungen ging hervor, dass der synthetisierte Vektor **31** physikochemische Ähnlichkeiten zum Vergleichsmolekül von M. Li (**12**) aufwies. Auch sollte eine Interaktion zwischen Biotin und der Zelloberfläche möglich sein, was aus den ebenfalls dargestellt wurde. Aus diesen Gründen wurde im nächsten Schritt die Transfektionsfähigkeit in biologischen Assays getestet.

3.1.1.3 Evaluation biologischer Assays

Zur Evaluation der biologischen Anwendbarkeit der synthetisierten Vektoren wurden Transfektionsexperimente durchgeführt. Die kultivierten Zellen werden hierbei mit einer Transfektionslösung bestehend aus einem Plasmid (pDNA) und Vektor versetzt. Die verwendete pDNA kodiert für ein Protein, welches bei Expression fluoresziert und kann somit nach mehrstündiger Inkubation bei einer positiven Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Entsprechende Versuche mit **31** ($\text{Lys}_4(\text{GCP})\text{-EDS-Biotin(sulfoxid)}$) wurden daher in Anlehnung an die Literatur unternommen.^[40,104]

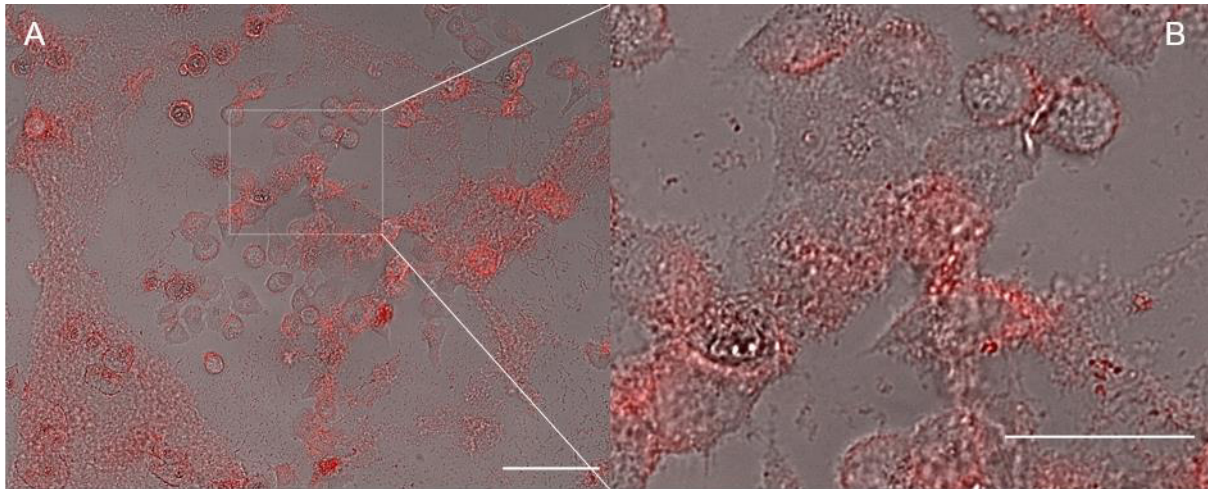


Abbildung 3-6. Fluoreszenzmikroskopie Aufnahmen von **31** (100 μM , DMSO/ H_2O) an HeLa Zellen. A: Übersichtsbild, Maßstab: 150 μm ; B: Vergrößerung des markierten Ausschnitts, Maßstab: 50 μm .

Bereits bei der Vorbereitung der Probe (**31**), wobei diese in einer Mischung aus DMSO und H_2O (1:9) gelöst wurde, fiel auf, dass das Peptid nur eine schlechte Löslichkeit aufwies (maximale Konzentration: 5 mM). Dies konnte auch während der Mikroskopie der HeLa-Zellen bei einer finalen Konzentration von 100 μM beobachtet werden, bei denen die Zellen von einer undefinierbaren Schicht aus ausgefallenem Material bedeckt waren (**Abbildung 3-6**). Dies ist von den klar umrandeten HeLa-Zellen abzugrenzen. Die rote Färbung ist in diesem Fall kein Beleg für eine erfolgreiche Transfektion, sondern ist nur durch eine Erhöhung des Kontrastes bedingt. Die Aufnahmen konnten ausgewertet werden, zeigen durch die schlechte Löslichkeit der gebildeten Polyplexe jedoch ein mögliches Problem für die negativen Transfektionsergebnisse. Eine Steigerung der Konzentration auf bis zu 500 μM führte ebenfalls nicht zu positiven Ergebnissen, weshalb keine weiteren Versuche in diese Richtung unternommen wurden. Dass der Vektor keine Zellen transfiziert, steht im Kontrast mit den zuvor ermittelten physikochemischen Daten und verdeutlicht damit die Komplexität von biologischen Experimenten.

In diesem Teil wurde gezeigt, dass der Vektor trotz oxidiertem Biotin weiterhin in der Lage sein sollte an den Biotinrezeptor auf der Zelloberfläche zu binden. Die zufriedenstellenden Ergebnisse der DNA-Bindungsexperimente zeigen die Möglichkeiten des GCP-Labels, konnten jedoch keinen Erfolg in der biologischen Zellexperimenten liefern. Die in diesem Teil gesammelten Erkenntnisse und Erfahrungen lieferten jedoch den Grundstein für die weiteren Arbeiten und die Verbesserung von Synthese, Analyse und der Optimierung der Zellexperimente.

3.1.2 Synthese von ausgewählten Peptiden zur Evaluation von Struktur-Wirkungsbeziehungen

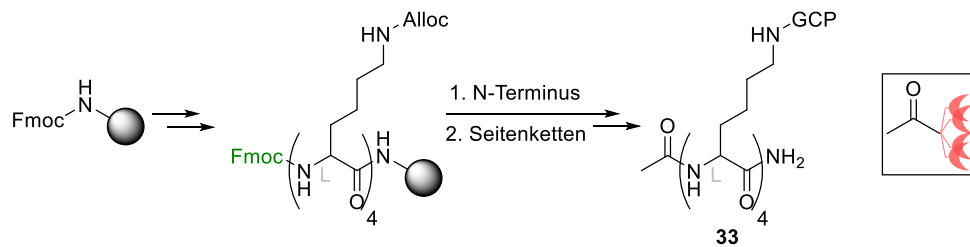
Die im vorigen Kapitel gesammelten Daten und Erkenntnisse zeigten zwar ein eindeutig negatives Resultat im Bezug auf eine erfolgreiche Transfektion, jedoch war eine Erklärung aus den physikochemischen Daten nicht zu ermitteln. Daher sollte im folgenden Teil eine detaillierte Struktur-Wirkungsbeziehungsanalyse die Herausforderungen des Systems rational einteilen, untersuchen und Lösungen entwickelt werden. In diesem Teil wird die hohe, strukturelle Flexibilität des „small-molecule“-Ansatzes verdeutlicht werden, so dass getestete Prototypen eine direkte Verknüpfung zwischen struktureller Änderung und den Resultaten in biologischen Assays erlauben. Da kein spezifischer Grund für die negativen Resultate aus den vorherigen Ergebnissen ermittelt werden konnte, sollte die strukturelle Analyse der Vektoren die vorgenommenen Veränderungen getrennt voneinander untersuchen, um so einen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen herauszuarbeiten. Die genaue physikochemische Analyse dieser Peptide wurde vorerst als zweitrangig erachtet, da wie zuvor zu erkennen war, dies keine eindeutige Vorhersage über die Transfektionseigenschaften erlaubt. Daher lag der Fokus auf zwei Faktoren in biologischen Versuchen, um Kennziffern einzuführen, nach denen alle zukünftigen Vektoren bewertet wurden. Diese waren:

1. Die Konzentration, welche benötigt wurde, um eine erfolgreiche Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie zu beobachten (c_{\min}). Dies ist eine wichtige Kennziffer für Gentransfektionssysteme, da eine geringe benötigte Konzentration des Vektors für eine effiziente Transfektion spricht.
2. Es wurde eine subjektive Einschätzung der Transfektionseffizienz vorgenommen, welche aus den erhaltenen Fluoreszenzmikroskopie Bildern abgeschätzt wurde. Zu beachten war jedoch zu jedem Zeitpunkt die geplante Anwendung des Vektors für spezifische Gentransfektion. Es galt daher c_{\min} dem publizierten Vektor anzunähern, um so die Ähnlichkeit zum Ursprungsvektor beizubehalten. Die Transfektionseffizienz sollte als zweite Bewertungsebene bei gleicher Konzentration dienen, was für die letztliche Anwendung jedoch vorerst nebensächlich.

Ebenso wurde für alle Tests die HeLa-Zelllinie verwendet, um weitere Variablen der biologischen Versuche zu verringern. Aus der Kombination aus quantitativer Analyse und qualitativer Einordnung konnten so die strukturellen Änderungen nach positiv und negativ sortiert werden. Dabei sollte stets das Ziel der zellspezifischen Gentransfektion nicht aus den Augen verloren werden und das Grundgerüst des Peptids (die Phosphatbindungseinheit Lys₄(GCP)) nicht verändert werden. Ziel der in diesem Kapitel synthetisierten Vektoren auf Basis von **31 (Schema 3-2)** war die Verringerung der benötigten Konzentration für die Transfektion, wobei möglichst viele Zellen transfiziert werden sollten.

3.1.2.1 Reduktion der Nettoladung durch Acetylierung

Da mögliche Variationen des Ursprungsmoleküls eine Fortführung der Peptidkette am *N*-Terminus des Tetrapeptids vorsahen, sollte zuerst ermittelt werden, welchen Einfluss eine Reduktion der positiven Ladung explizit hat. Um keine weiteren strukturellen Faktoren einzuführen, welche eine präzise Analyse des Ergebnisses beeinträchtigen könnten, wurde der *N*-Terminus des Peptids mittels Acetylierung in ein Amid überführt, um so **33** (Lys₄(GCP)-Ac, **Schema 3-3**) zu erhalten.



Schema 3-3. Zusammenfassung der Festphasenpeptidsynthese von **33** (Lys₄(GCP)-Ac). Die Synthese wurde analog zu der in **Schema 3-2** beschriebenen, durchgeführt.

Hierzu wurde das Peptid an einem kommerziell erhältlichen Rink-Amid Harz aus Fmoc-Lys(Alloc)-OH und dem Anionenbinder GCP (**30**) synthetisiert. Die geplante Acetylierung wurde mit Hilfe von Essigsäureanhydrid (Ac₂O) und DiPEA in DMF erreicht. Da kein Biotin verwendet wurde, konnte hierbei problemlos die mikrowellenunterstützte Peptidsynthese verwendet werden. Die erfolgreiche Synthese von Lys₄(GCP)-Ac wurde mit Hilfe der MPLC an Umkehrphase in einer Reinheit von 99% gezeigt durchgeführt. Das Produkt wurde mittels Massenspektrometrie nachgewiesen und anschließend für biologische Versuche mit HCl_{aq} in MeOH in das Chlorid-Salz überführt.

Zur Vorbereitung der biologischen Assays wurde **33** mit Hilfe von DMSO gelöst und mit H₂O verdünnt. Die so erhaltene Lösung zeigte eine deutlich bessere Löslichkeit als das Lys₄-EDS-Biotin(sulfoxid) (**31**) aus Kapitel 3.1.1. Dies kann durch das Fehlen der (oxidierten) Biotinsubstruktur erklärt werden, da diese im Allgemeinen eine schlechte Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln aufweist.^[167] Somit konnte ein breiter Konzentrationsbereich des Vektors im Medium (100 – 500 μM) getestet werden.

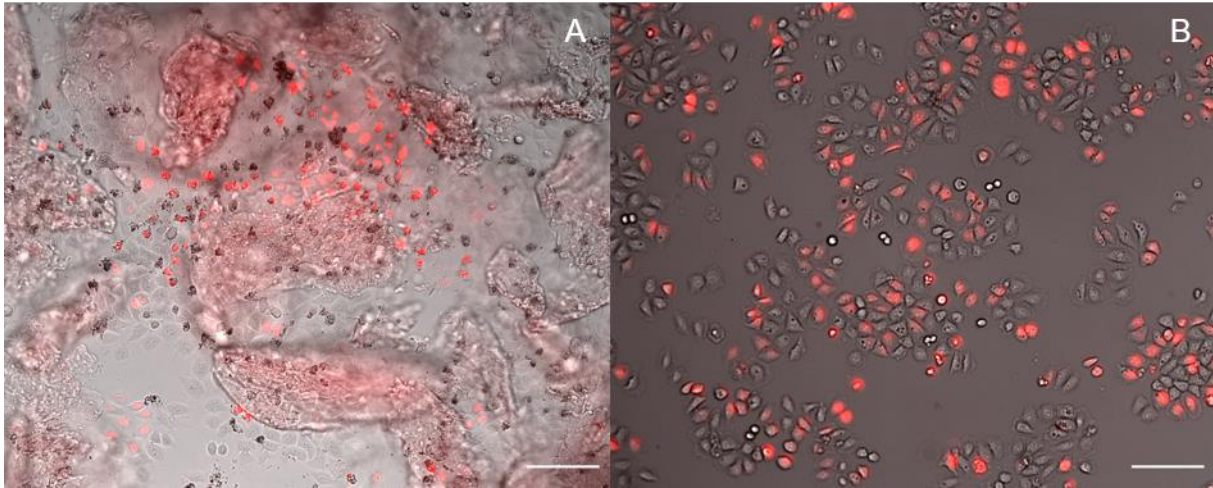
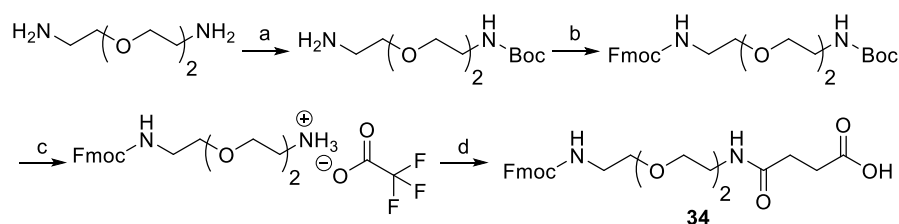


Abbildung 3-7. Fluoreszenzmikroskopie Bilder von **33** ($\text{Lys}_4(\text{GCP})\text{-Ac}$) und **12** ($\text{Lys}_4(\text{GCP})\text{-NH}_2$) an HeLa Zellen; A: Konzentration des Vektors **33**: 400 μM ; B: Konzentration des Vektors **12**: 300 μM , Maßstab: 150 μm .

In **Abbildung 3-7** ist zu erkennen, dass eine Transfektion der HeLa Zellen ab einer Konzentration von 400 μM möglich ist, was durch eine rote Färbung im Zellinneren gekennzeichnet wird. Deutlich zu erkennen ist, dass die Zellen wie bereits zuvor von einer Schicht aus vermutlich unlöslichen Polyplexen aus Vektor und DNA überzogen sind, was für eine geringe Löslichkeit der Aggregate spricht. Dies sollte aber keinen Einfluss auf die Transfektionsergebnisse an sich zeigen, da dieser Effekt auch zum Teil wichtig für die biologische Wirkung von Vergleichsmolekülen sein kann.^[168] Ob die Zellen jedoch eine erhöhte Mortalität aufweisen wurde zu diesem Zeitpunkt nicht identifiziert. Die Anzahl der transfizierten Zellen ist allerdings gering im Vergleich zu **12** ($\text{Lys}_4(\text{GCP})\text{-NH}_2$), vor allem, wenn die Zahlenwerte aus der Literatur in Bezug gesetzt werden (**Abbildung 3-7**, B). In der Publikation wurden nach Auswertung der Fluoreszenzbilder eine Transfektionseffizienz von bis zu 60% ermittelt, was deutlich über der geschätzten Effizienz von **33** liegt.^[104] Auch konnten diese hohen Werte bereits ab einer finalen Konzentration von 150 μM erreicht werden und eine Transfektion war schon ab einem Wert von 100 μM möglich.^[159] Der drastische Unterschied der Resultate, auch im Hinblick auf die Löslichkeit der gebildeten Polyplexe, kann somit auf die gezielte Verringerung einer positiven Ladung zurückgeführt werden und stellt somit einen wichtigen Erkenntnisgewinn für zukünftige Synthesen dar. Eine Verbesserung der Löslichkeit für dieses System scheint also im Hinblick auf eine biologische Anwendung wichtig zu sein.

3.1.2.2 Reduktion der Nettoladung durch hydrophilen Linker

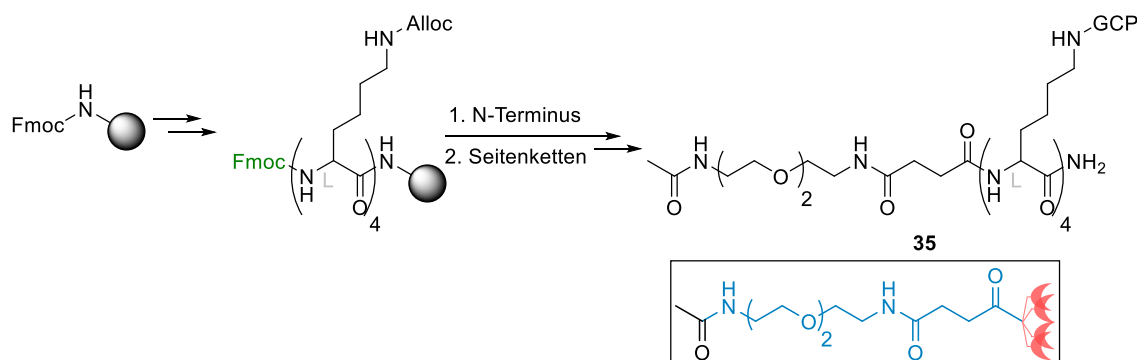
Mögliche Strategien zur Verbesserung der Löslichkeit des Produktes sind weitere Ladungen, welche auf Grund von zusätzlicher Bindung (für positive Ladungen) mit dem Phosphatrückgrat der DNA oder möglicher Abstoßung (für negative Ladungen) zunächst nicht näher verfolgt wurden. Daher wurde der bereits zuvor verwendete Ethylenglykol Linker (EDS) verwendet. Um jedoch durch einen freien *N*-Terminus keine zusätzliche Ladung in das System zu integrieren sollte dieser erneut mit Ac_2O in das entsprechende Amid überführt werden.



Schema 3-4. Syntheschema des Fmoc-geschützten Ethylenglykollinkers (**34**, EDS-Linker) für die Festphasen-peptidsynthese.

Reagenzien und Bedingungen: a) Boc_2O , DCM, 0°C \rightarrow RT, 18 h, quant.; b) K_2CO_3 , Fmoc-Cl , $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$, RT, 18 h, quant.; c) TFA, DCM, RT, 30 min, 70%; d) Bernstein-säureanhydrid, NEt_3 , DCM, RT, 1 h, 32%.

Die Synthese der Linkereinheit (**34**, EDS-Linker, **Schema 3-4**) konnte erfolgreich in Anlehnung an die Veröffentlichung von Ponader *et. al.* über vier Stufen (22.4% Ausbeute) synthetisiert werden.^[169] Durch die freie Carbonsäure und die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe konnte **34** direkt in der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt werden.



Schema 3-5. Zusammenfassung der Festphasenpeptidsynthese von **35** (Lys₄(GCP)-EDS-Ac).

Die Synthese von **35** (Lys₄(GCP)-EDS-Ac) konnte mittels mikrowellengestützter SPPS aus $\text{Fmoc-Lys(Alloc)-OH}$ und dem EDS-Linker (**34**) erfolgen. Das Produkt wurde nach chromatographischer Trennung mittels MPLC an RP_{18} in einer Reinheit von 94% erhalten. Eine Bestimmung der molekularen Masse mittels ESI-MS bestätigte die molekulare Masse des Produktes, weshalb biologischen Messungen unternommen wurden. Durch die gute Löslichkeit des Produktes in $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$, welche während der Probenvorbereitung

beobachtet wurde, wurde wie bereits zuvor eine Konzentrationsreihe von 100 – 500 μM , in 100 μM Schritten getestet.

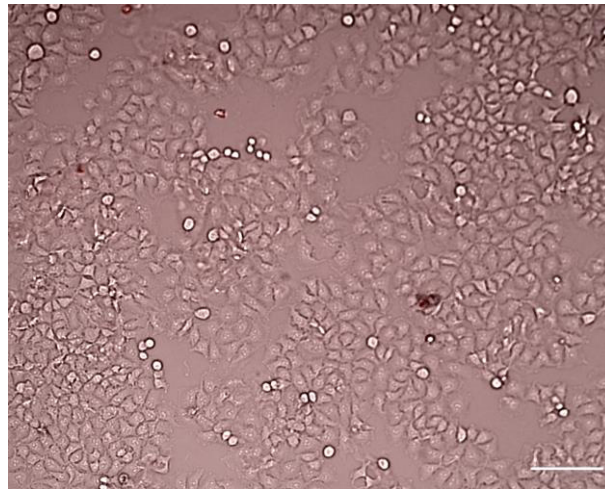


Abbildung 3-8. Fluoreszenzmikroskopie Aufnahme von **35** (Lys₄(GCP)-EDS-Ac) an HeLa Zellen; Konzentration des Vektors: 500 μM ; Maßstab 150 μm .

Wie in **Abbildung 3-8** erkennbar, konnte keine erfolgreiche Transfektion bei einer Konzentration von 500 μM beobachtet werden. Niedrigere Konzentrationen zeigten ebenfalls keine positiven Ergebnisse. Die Mikroskopiebilder waren allerdings im Vergleich zu den Vorherigen deutlich besser auszuwerten, da keine großen Mengen ausgefallenen Materials auf den Zellen zu erkennen war. Um dennoch eine Transfektion zu erreichen, wurde in erneuten Versuchen Chloroquin zugesetzt, um so das endosomale Entkommen des Vektors zu verbessern.^[70] Chloroquin ist eine schwache Stickstoffbase, die zu einer Membrandestabilisierung beiträgt und so möglicherweise die Transfektion erleichtert.^[71]

Leider zeigte allerdings auch diese Herangehensweise keinen Erfolg, weshalb die Bandbreite der Konzentration weiter erhöht wurde. Letztlich konnte dann so eine erfolgreiche Transfektion der HeLa-Zellen ab einer Konzentration von 700 μM (**Abbildung 3-9**) erreicht werden.

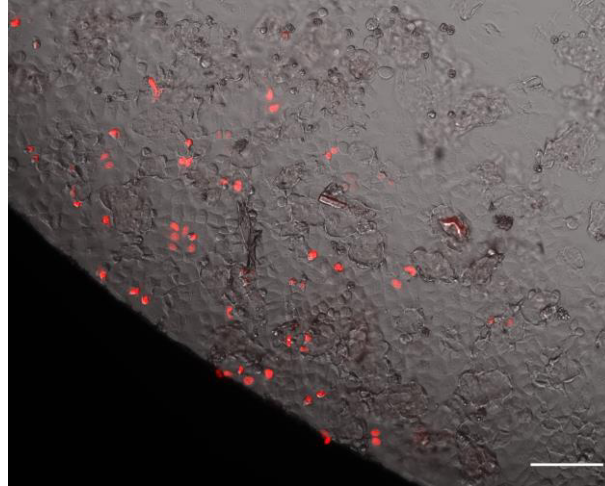


Abbildung 3-9. Fluoreszenzmikroskopie Aufnahme von **35** ($\text{Lys}_4(\text{GCP})\text{-EDS-Ac}$) an HeLa Zellen; Konzentration des Vektors: 700 μM ; Maßstab 150 μm .

In diesem Fall war c_{min} noch deutlich höher als zuvor (Kapitel 3.1.2.1) und die zu beobachtende Transfektionseffizienz vergleichsweise gering.^[104,161] Die Effizienz wurde rein optisch durch Auswertung der Fluoreszenzbilder abgeschätzt und mit den bisherigen Daten von M. Li (**12**, $\text{Lys}_4(\text{GCP})\text{-NH}_2$) verglichen. Somit scheint sowohl die Verringerung der positiven Ladungen als auch der hydrophile Linker starken Einfluss auf die Transfektionseigenschaften des Vektors zu haben. Um auszuschließen, dass das Kondensationsverhalten durch die Linkereinheit beeinträchtigt wird, wurden DLS Messungen durchgeführt, welche in **Abbildung 3-10** zusammengefasst werden. Im Gegensatz zu vorherigen Tests wurde ab diesem Zeitpunkt der Arbeit nicht mehr ctDNA für physikochemische Messungen verwendet, sondern das gleiche Plasmid (im weiteren Verlauf häufig als pDNA abgekürzt), welches auch in den Zellexperimenten eingesetzt wurde. Dies sollte einen besseren Vergleich zwischen den physikochemischen Messungen und biologischen Assays erlauben.^[170] Hierzu wurden 10 $\mu\text{g/mL}$ pDNA in H_2O , anstatt in Cacodylat-Puffer, vorgelegt und anschließend Aliquote von **35** in $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$ sukzessive hinzu pipettiert.^[171]

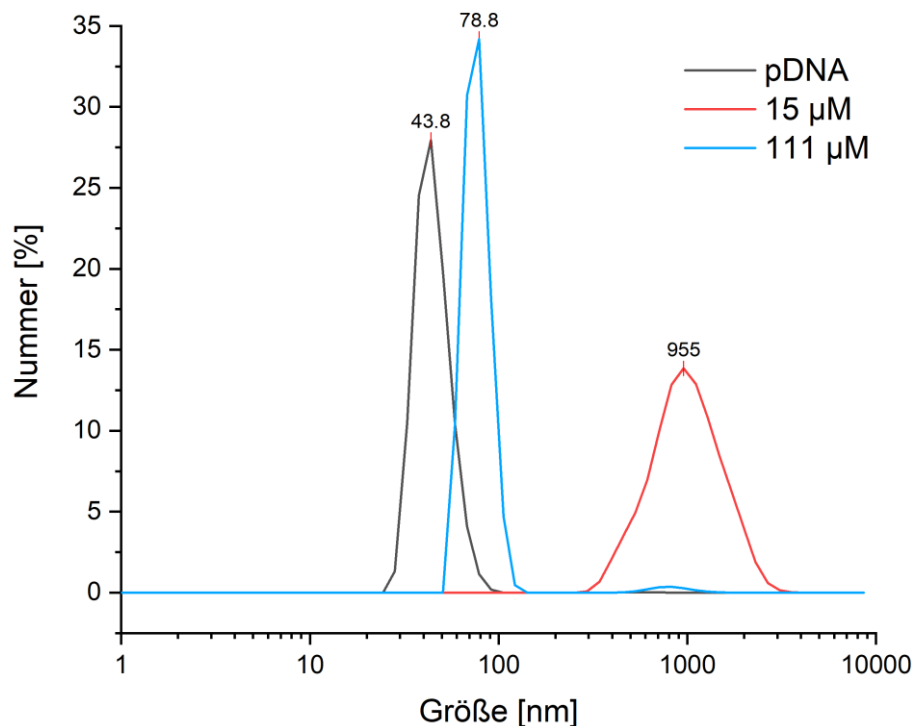


Abbildung 3-10. Darstellung der DLS-Größenverteilung (Zahl) von pDNA (10 µg/mL) mit Vektor **35** (Lys₄(GCP)-EDS-Ac) in den Konzentrationen 15 µM und 111 µM.

Wie in **Abbildung 3-10** gezeigt ist der hydrodynamische Durchmesser der reinen DNA mit einer Größe von ca. 44 nm größer als ctDNA mit 16 µm. Durch eine geringe Zugabe von **35** (Lys₄(GCP)-EDS-Ac, 15 µM) vergrößern sich die Aggregate auf bis zu ca. 1000 nm. Erreicht der Vektor eine Endkonzentration von 111 µM im Medium können Partikel mit einer Größe von knapp 80 nm beobachtet werden. Die zu beobachtbaren Trends sind im Einklang mit den vorherigen Ergebnissen, unterscheiden sich jedoch in der Größe der Partikel bei einer geringen Zugabe von **31** (Lys₄(GCP)-EDS-Biotin(sulfoxid), vgl. 3.1.1.2, **Abbildung 3-4**). Dies lässt jedoch keinen definitiven Rückschluss auf die tatsächliche Fähigkeit des Vektors zu, Zellen zu transfizieren. Allerdings scheint die zusätzliche Linkereinheit keinen, im DLS sichtbaren, Effekt, auf das Aggregationsverhalten von **35** zu haben. Die so aufgedeckten Veränderungen des Transfektionsverhaltens, was durch die Erhöhung der minimalen Konzentration dargelegt wurde, konnten auf die Linkereinheit und die Blockierung einer positiven Ladung zurückgeführt werden. Eine alternative Verbrückungseinheit zwischen der DNA-Bindungseinheit und einem potenziell bioaktiven Label sollten daher eine Verbesserung der Transfektionseigenschaften herbeiführen.

3.1.2.3 Synthese einer hydrophilen Linkereinheit mit zusätzlicher Ladung (EDS+)

Die neue Verbrückungseinheit sollte zum Zweck der besseren Vergleichbarkeit erneut auf dem bereits bekannten EDS-Linker beruhen. Auf Basis der bereits gemachten Erkenntnisse und des Ethylenglykol-Gerüsts sollten die zuvor beschriebenen Probleme umgangen werden, indem der Linker um eine positive Ladung erweitert wurde. Hierbei wurde allerdings sorgfältig auf die Positionierung der Veränderung geachtet, da eine Bindung der DNA, durch die Nähe des Amins zum DNA-Bindungsmotiv, unterstützt werden soll und so eine höhere Ähnlichkeit zum Ursprungsvektor (**12**) besteht.

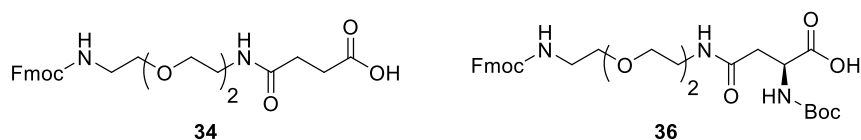
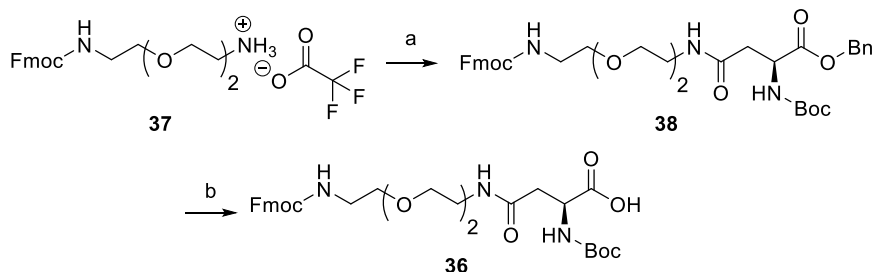


Abbildung 3-11. Vergleich der beiden Linkereinheiten EDS (**34**) und EDS+ (**36**).

Wie in **Abbildung 3-11** gezeigt, kann Bernsteinsäureanhydrid in Abweichung von der vorherigen Synthese leicht durch einen anderen Baustein ersetzt werden. Durch Wahl der entsprechenden Schutzgruppen schien es daher möglich die Aminosäure Aspartat zu verwenden, da diese sowohl in der finalen Länge als auch der räumlichen Ausrichtung große Ähnlichkeit zu dem initialen Linker hat. Nur die Erweiterung des Systems um eine Aminfunktion am C-Terminus, sollte als einziger Unterschied bestehen bleiben.



Schema 3-6. Syntheschema des EDS+-Linker (**36**) ausgehend von der bereits synthetisierten Verbindung **37**.

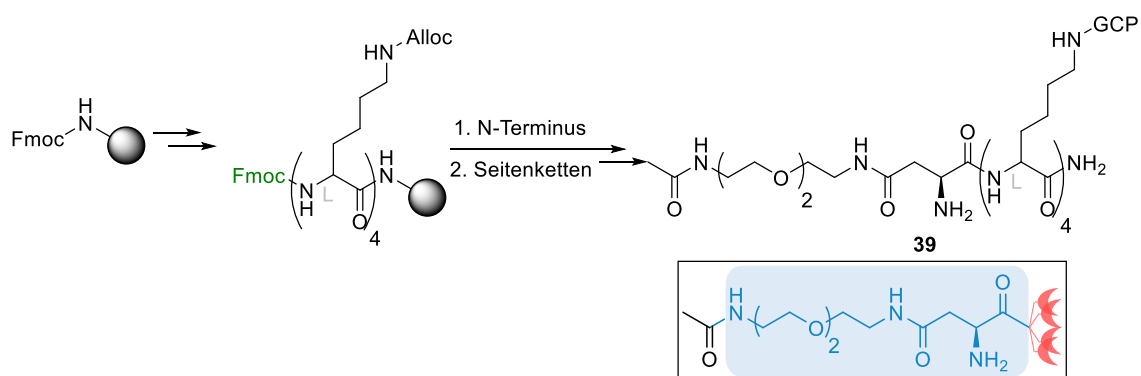
Reagenzien und Bedingungen: a) Boc-Asp(OBzl)-OH, EDC-HCl, HOBT, NEt₃, DCM, 0 °C → RT, 3 h, 71%; b) Et₃SiH, Pd/C, 10 min, RT, 54%.

Wie in **Schema 3-6** gezeigt konnte die Synthese des EDS+-Linkers erfolgreich durchgeführt werden. Anfängliche Probleme bestanden in der selektiven Entschützung des Benzylesters (**38**) in Gegenwart der Fmoc-Schutzgruppe mit Pd/C und H₂. Hier führte die Reaktion nicht zum gewünschten Produkt, sondern resultierte des Weiteren in der Entschützung der essentiellen Schutzgruppe des N-Terminus. Eine kurze Reaktionszeit und die Verwendung von Pd/C und Et₃SiH, als *in situ* Wasserstoffgenerator, in Anlehnung an Mandal *et al.* führte schlussendlich zum Erfolg.^[172] So konnte **36** in einer Ausbeute von 38% über zwei Stufen erhalten werden. Die Synthese dieses neuen Bausteins kann entsprechend nicht nur für

diese Arbeit einzigartige Eigenschaften von Peptiden erzielen, sondern auch für das künftige Design von weiteren Molekülen dienen.

3.1.2.4 Anpassung der Nettoladung durch neuen EDS+-Linker

Nach der erfolgreichen Synthese und Charakterisierung der neuen Linkereinheit sollte diese in Anlehnung an die bereits getesteten Systeme, ebenfalls in der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt werden. Um erneut die Fähigkeit des finalen Vektors kritisch und getrennt von weiteren Faktoren einschätzen zu können, wurde der *N*-Terminus, wie in 3.1.2.2 mit Essigsäureanhydrid acetyliert und so in ein Amid überführt. Die Gesamtladung des Moleküls in wässrigem Milieu beträgt damit maximal fünf und besitzt damit die gleiche Anzahl positiver Ladungen wie das Ursprungsmolekül **12** (Lys₄(GCP)-NH₂).



Schema 3-7. Zusammenfassung der Festphasenpeptidsynthese von **39** (Lys₄(GCP)-EDS+-Ac).

Die Synthese, unter Verwendung von **36**, war erneut an der festen Phase (Rink-Amid Harz) möglich, so dass **39** (Lys₄(GCP)-EDS+-Ac) erhalten werden konnte. Das Produkt konnte nach chromatographischer Trennung an RP₁₈ (MPLC) in einer Reinheit von 89% als das Salz der Trifluoressigsäure isoliert werden. Die Bestimmung der molekularen Masse des Peptids per ESI-MS bewies das Vorhandensein von **39**, so dass weitere Experimente unternommen werden konnte.

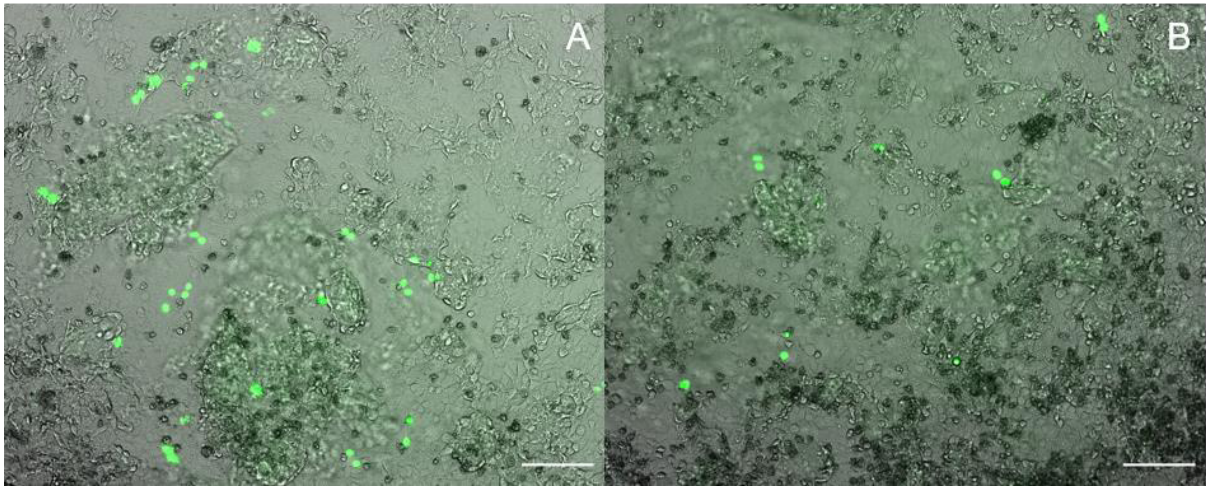


Abbildung 3-12. Fluoreszenzmikroskopie Aufnahme von **39** ($\text{Lys}_4(\text{GCP})\text{-EDS}^+\text{-Ac}$) an HeLa Zellen; A: Konzentration des Vektors: $400\ \mu\text{M}$; B: Konzentration des Vektors $500\ \mu\text{M}$; Maßstab $150\ \mu\text{m}$.

Die Fähigkeit von **39** HeLa-Zellen zu transfizieren ist, wie in **Abbildung 3-12** zu sehen, gegeben, wobei sogar eine Verbesserung des Systems gegenüber **35** ($\text{Lys}_4(\text{GCP})\text{-EDS-Ac}$) möglich war. Eine erfolgreiche Transfektion der Zellen konnte ab einer Konzentration von $400\ \mu\text{M}$ im Medium beobachtet werden, wobei wenige Zellen transfiziert wurden. Eine Erhöhung der Konzentration auf $500\ \mu\text{M}$ war ebenfalls möglich, führte jedoch zu keiner signifikanten Verbesserung der Effizienz. Die Verringerung von c_{min} von $700\ \mu\text{M}$ auf $400\ \mu\text{M}$ zeigt deutlich den dramatischen Einfluss einer fünften Ladung, welche offensichtlich zum erfolgreichen Transport der DNA beiträgt. Die in diesem Fall grün fluoreszierenden Zellen wurden mit dem gleichen Plasmid wie zuvor transfiziert, bei dem jedoch der kodierende Teil der DNA anstatt für ein rotes Protein, für ein Grünes ausgetauscht wurde, wodurch die Transfektionseffizienz allerdings nicht beeinflusst werden sollte. Die Diskrepanz zwischen den Transfektionsergebnissen von **Li** (**12**, $\text{Lys}_4(\text{GCP})\text{-NH}_2$) ist aber weiterhin deutlich gegeben und zeigt welchen hohen Einfluss die vorgenommenen Veränderungen auf das System haben.^[104] Die Unterschiede in der Transfektionseffizienz könnten allerdings für die selektive Transfektion von Krebszellen (vgl. 1.4.2, Novo *et al.*^[149]) nützlich sein. Eine hohe Transfektion ohne Label wäre hinderlich, da eine Verbesserung von diesem Niveau nur schwer zu realisieren wäre. Somit scheint der Linker **36** (EDS^+) ein guter Kandidat, um eine selektive Transfektion von spezifischen Krebszellen zu erreichen.

Um einen besseren Vergleich zwischen **39** ($\text{Lys}_4(\text{GCP})\text{-EDS}^+\text{-Ac}$) und **35** ($\text{Lys}_4(\text{GCP})\text{-EDS-Ac}$) zu erreichen wurden DLS-Messungen mit einem Plasmid unternommen. Die Evaluation des Kondensationsverhaltens könnte ein Anhaltspunkt für die Fähigkeit des Systems liefern DNA zu Polyplexen zu kondensieren.

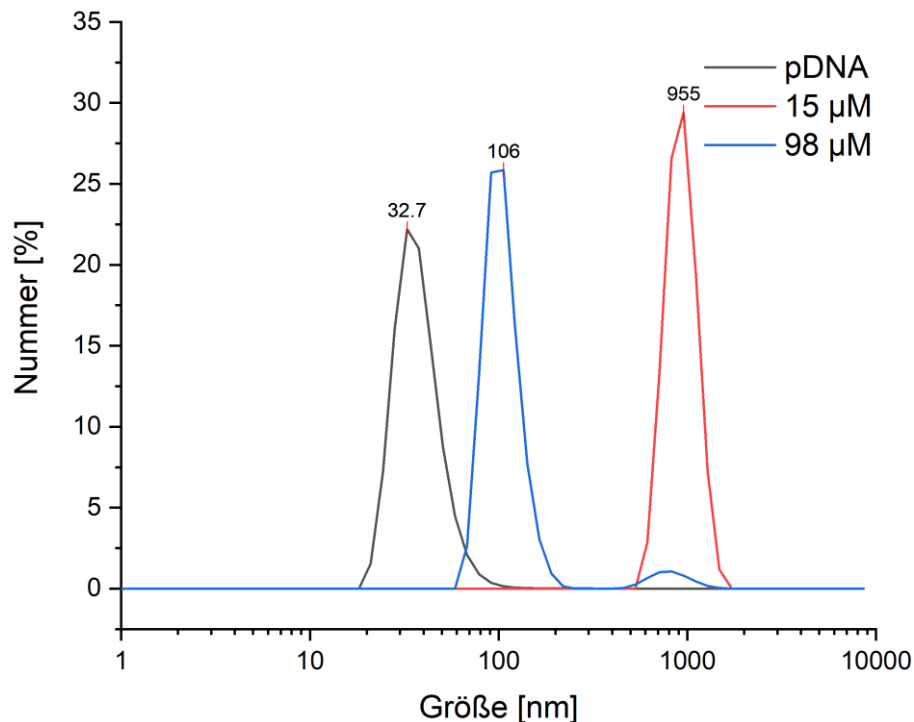


Abbildung 3-13. Darstellung der DLS-Größenverteilung (Zahl) von pDNA (10 µg/mL) mit Vektor **39** (Lys₄(GCP)-EDS+-Ac) in den Konzentrationen 15 µM und 98 µM.

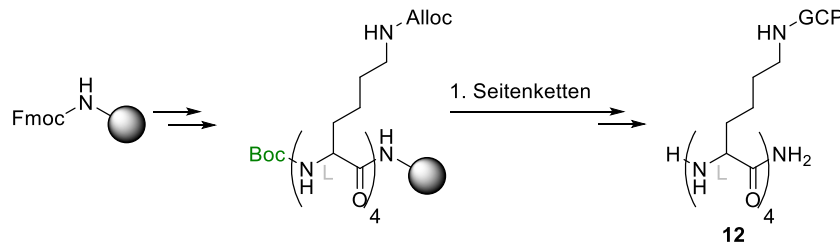
Wie in **Abbildung 3-13** gezeigt weist auch **39** (Lys₄(GCP)-EDS+-Ac) ein wie zuvor beobachtetes Kondensationsverhalten von pDNA auf. Die zu Beginn kleinen Partikel mit einer Größe von 33 nm können durch Zugabe des Vektors (15 µM) auf fast 1000 nm vergrößert werden. Durch Erhöhung der Konzentration von **39** nimmt der Durchmesser der Aggregate deutlich ab, so dass in etwa 100 nm erreicht werden. Die im Vergleich zu **35** (Lys₄(GCP)-EDS-Ac) 3.1.2.2, **Abbildung 3-10** größeren Partikel konnten auch durch eine weitere Zugabe des Vektors nicht mehr signifikant verändert werden.

Die Verringerung der minimalen Konzentration für eine erfolgreiche Transfektion, konnte in diesem Teil der Arbeit festgestellt werden. Der Einfluss in biologischen Assays konnte allerdings nicht durch eine Veränderung in physikochemischen Messungen begründet werden.

3.1.2.5 Re-Evaluation der publizierten Daten von M. Li

Zu diesem Zeitpunkt der Arbeit viel besonders die starke Diskrepanz zwischen den publizierten Daten von M. Li (**12**, Lys₄(GCP)-NH₂, **Schema 3-8**) und den bereits erhobenen Daten auf. Zum einen wurde in allen Fällen eine deutlich höhere Konzentration des Vektors für eine erfolgreiche Transfektion in biologischen Assays benötigt, als in der Veröffentlichung. Zum anderen wurde die Transfektionseffizienz, welche in Vergleich zu PEI gesetzt wurde, in jedem Fall immer deutlich unterschritten. Auch wenn die Effizienz nur rein subjektiv aus den Fluoreszenzbildern geschätzt wurde, konnte ein deutlicher Unterschied erkannt werden. Aus diesen Gründen wurde der Vektor in Anlehnung an die Literatur

synthetisiert und sollte unter den gleichen Bedingungen wie bisher in biologischen Assays evaluiert werden.



Schema 3-8. Zusammenfassung der Festphasenpeptidsynthese von **12** (Lys₄(GCP)-NH₂).

Die in der Literatur beschriebene Synthese wurde erfolgreich umgesetzt und so **12** (Lys₄(GCP)-NH₂) in einer Reinheit von 92% nach chromatographischer Trennung erfolgreich hergestellt. Bei der Synthese wurde im Gegensatz zu den publizierten Anweisungen, eine Boc-geschützte Aminosäure verwendet.^[104] So sollte eine bekannte Nebenreaktion bei der Entschützung der Alloc-Schutzgruppen vermieden werden, was zu einer Abnahme der Ausbeute führen kann.^[173] Die im Anschluss folgenden biologischen Experimente wurden wie in der Literatur beschrieben durchgeführt. Hierzu wurde 2 µg Plasmid pro Well verwendet und der Vektor in fünf Konzentrationen (100, 150, 200, 300, 400 µM) an HeLa Zellen getestet. Die Auswertung der Daten wurde nicht wie bisher geschätzt, jedoch auch nicht wie in der Literatur durchgeführt. Stattdessen wurden nach erfolgreicher Transfektion alle Zellen mit dem blauen Farbstoff Hoechst33342 eingefärbt. Anschließend konnte mit Hilfe von CellProfiler® die Gesamtzahl der Zellen, als auch die Anzahl der transfizierten Zellen ermittelt werden. Die Verwendung der Software wurde hierbei durch Mitglieder des ICCE unterstützt. Eine genauere Beschreibung des Verfahrens findet sich im späteren Teil der Arbeit (siehe Kapitel 3.4.1). Die Transfektionseffizienz konnte somit in Abhängigkeit der Konzentrationen aufgetragen werden und so in Vergleich zu den publizierten Werten gesetzt werden. Da keine numerischen Daten zu dem Vektor ermittelt werden konnten, wurden diese aus den Abbildungen der Dissertation und der entsprechenden Publikation geschätzt.^[104,159] Aus diesem Grund sind auch weder Nachkommastellen noch Fehlerbalken in **Abbildung 3-14** für die jeweiligen Werte angegeben. Ebenfalls wurden nur die Daten an HeLa-Zellen erneut erhoben, da diese die besten Ergebnisse darstellen. An Stelle eines Vergleiches mit PEI wurde die Transfektion mit Lipofectamine 2000® verglichen. Die besonders hervorstechenden Effizienzen mit PEI konnten auch im späteren Verlauf der Dissertation nicht reproduziert werden (siehe Kapitel 3.4.3). Hier konnte eine maximale Transfektionseffizienz für PEI an HeLa Zellen von ca. 30% gemessen werden.

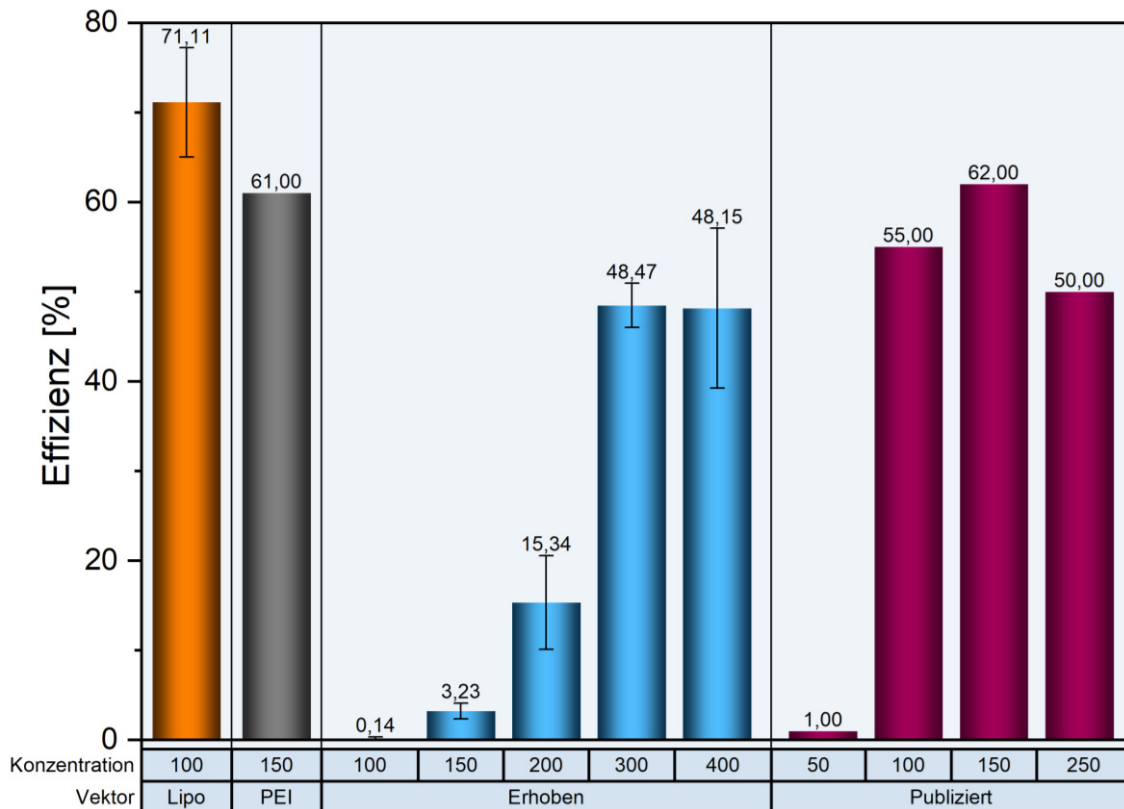


Abbildung 3-14. Vergleich der Transfektionseffizienzen von **12** ($\text{Lys}_4(\text{GCP})\text{-NH}_2$) zwischen den publizierten (lila Balken) und erhobenen Daten (blaue Balken) an HeLa Zellen in den angegebenen Konzentrationen.

Das in **Abbildung 3-14** gezeigte Balkendiagramm fasst die Transfektionsdaten des Vektors von M. Li zusammen und liefert einen direkten Vergleich zwischen den publizierten Daten und den neu Erhobenen. Es ist leicht zu erkennen, dass die in der Publikation als optimal angegebene Konzentration von 150 μM in den neuen Ergebnissen (blaue Balken) eine nur geringe Effizienz von 3% aufweist. Erst nach einer deutlichen Erhöhung auf 300 μM liefert der Vektor gute Ergebnisse bei dem fast 50% der Zellen transfiziert werden können. Die publizierten Daten konnten somit nicht reproduziert werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Vektor **12** ($\text{Lys}_4(\text{GCP})\text{-NH}_2$) ab einer Konzentration von 300 μM einen potenten Transfektionsvektor darstellt. Die Diskrepanz zwischen den beiden Datensätzen lässt sich durch die genauere Analyse der Fluoreszenzdaten mittels CellProfiler® erklären.

Nach diesen Ergebnissen sollte noch der Einfluss des Vektors auf die Überlebensrate der Zellen ermittelt werden. Hierzu wurde die Toxizität des Vektors mit Hilfe eines MTS-Assays bestimmt. Eine genaue Beschreibung des Mechanismus und der Funktionsweise ist im späteren Teil der Arbeit genauer beschrieben (3.4.2). Die Ergebnisse der Toxizitätsstudien sind in **Abbildung 3-15** dargestellt.

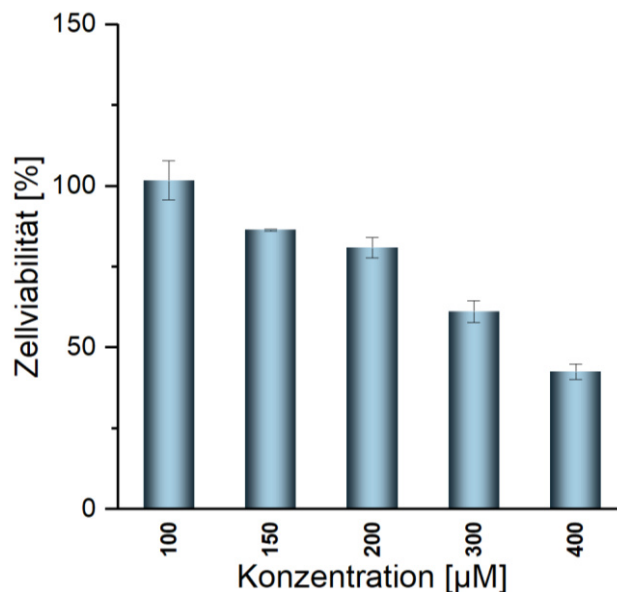


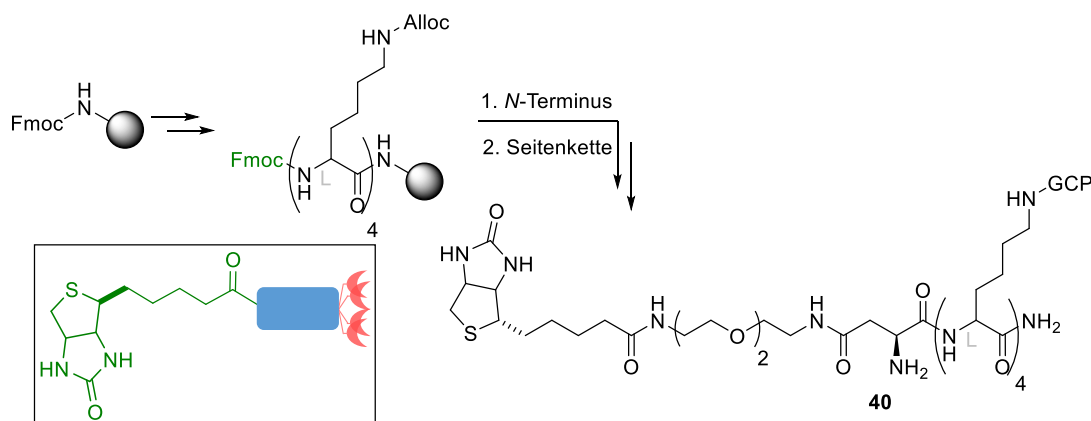
Abbildung 3-15. Balkendiagramm der Toxizitätsstudien zu **12** ($\text{Lys}_4(\text{GCP})\text{-NH}_2$) an HeLa Zellen im angegebenen Konzentrationsbereich.

Das in **Abbildung 3-15** dargestellte Balkendiagramm zeigt die Ergebnisse des Toxizitätsassays zu **12** ($\text{Lys}_4(\text{GCP})\text{-NH}_2$). Es ist eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellviabilität zu erkennen. Die angegebenen Konzentrationen entsprechen denen, die auch für die Transfektionsexperimente verwendet wurden. Zu erkennen ist, dass der Vektor ab einer Konzentration von 300 μM stark die Überlebensrate der Zellen beeinflusst. Dies ist allerdings auch die Konzentration ab dem dieser die Zellen in einer guten Effizienz transfiziert. Höhere Konzentrationen führen entsprechend zu einer weiteren Abnahme der Zellviabilität. Die publizierten Daten zeigen keinen toxischen Effekt auf Zellen bei der angegebenen Konzentration von 150 μM . Dies konnte zwar bei genauerer Betrachtung nicht vollständig reproduziert werden, jedoch ist nur eine geringe Toxizität nachzuweisen.

Die erhobenen Daten zeigen somit ein klares Problem auf. Der synthetisierte Vektor **12** ($\text{Lys}_4(\text{GCP})\text{-NH}_2$) ist zwar sehr potent, ab einer Konzentration von 300 μM , weist aber auch eine deutliche Toxizität auf. Die publizierten Daten konnten nicht vollständig reproduziert werden, was durch die unterschiedliche Auswertung der Transfektionsdaten begründet werden kann. Ein Vergleich mit der Literatur muss unter diesen Bedingungen kritisch betrachtet werden, da die Ergebnisse nur zu einem geringen Maße verglichen werden können. Für die weitere Arbeit hat dies keine problematischen Folgen, da gezeigt werden konnte, dass das Tetrapeptid weiterhin eine solide Grundlage für Verbesserungen darstellt. Des Weiteren sollte darauf geachtet werden, dass eine zu hohe Konzentration Folgen für die Überlebensrate von HeLa Zellen darstellt. Mit diesen neuen Erkenntnissen wurde im nächsten Teil das Anbringen des Biotinlabels unternommen, um so den zellspezifischen Charakter des Vektors zu ermöglichen.

3.1.2.6 Erweiterung des modifizierten Grundgerüsts durch zellspezifisches Label

Die Resultate der vorangegangenen Kapitel führten zu einem deutlichen Erkenntnisgewinn und sollten so die erfolgreiche Synthese und eine Anwendung als zellspezifischer Vektor auf Basis von **39** (Lys₄(GCP)-EDS+-Ac) ermöglichen. Die Synthese erfolgte erneut an der festen Phase (Rink-Amid) unter Verwendung von Fmoc-Lys(Alloc)-OH, dem modifizierten Linker EDS+ und Biotin als Targetinglabel.



Schema 3-9. Zusammenfassung der Festphasenpeptidsynthese von **40** (Lys₄(GCP)-EDS+-Biotin).

Die Synthese des Peptidrückgrates (**Schema 3-9**), bis zur Kupplung von Biotin, wurde wie zuvor mikrowellenunterstützt durchgeführt. Vor der Alloc-Entschützung wurde das Peptid mehrmals mit DCM gewaschen und getrocknet. Das nun leicht zu überführende Harz konnte in einem Peptidsynthesegeräß aus Glas mit entsprechenden Anschlüssen für Schutzgas gegeben werden und wurde erneut in DMF gequollen. Im Anschluss an die Entfernung der Schutzgruppen an den Seitenketten der Lysin-Einheiten wurden weitere Waschschrte in Anlehnung an die Veröffentlichung von Shih *et al*, eingeführt.^[174] Diese schlossen eine Behandlung des Harzes mit Diethyldithiocarbamat in DMF ein, um alle Reste des Palladiumkatalysators zu entfernen. Alle folgenden Syntheseschritte und Aufarbeitungen wurden nach bestem Gelingen unter Argon-Schutzgas Atmosphäre durchgeführt. Dies schloss die Entschützung der Alloc-Schutzgruppen, das Kuppeln des Anionenbinders GCP (**30**) und die Abspaltung des Peptids vom Harz ein. Des Weiteren wurden Rotationsverdampfer mit Argon belüftet, sowie isolierte Fraktionen in entgasten Lösemitteln und unter Schutzgas gelagert, bis das Solvens unter vermindertem Druck entfernt wurde. Auch nach erfolgreicher Gefrier-trocknung wurde der Kolben mit Argon belüftet, um eine mögliche Oxidation des Biotins zu verhindern. Diese Maßnahmen führten dazu, dass das Produkt (**40**, Lys₄(GCP)-EDS+-Biotin) nach säulenchromatographischer Trennung unter Verwendung von RP-HPLC isoliert werden konnte. Eine Oxidation des Produktes konnte durch Bestimmung der molekularen Masse mittels ESI-MS vorerst ausgeschlossen werden. Gelöste Proben konnten allerdings weiterhin leicht oxidiert werden, was durch zeitabhängige HPLC Messungen gezeigt werden konnte.

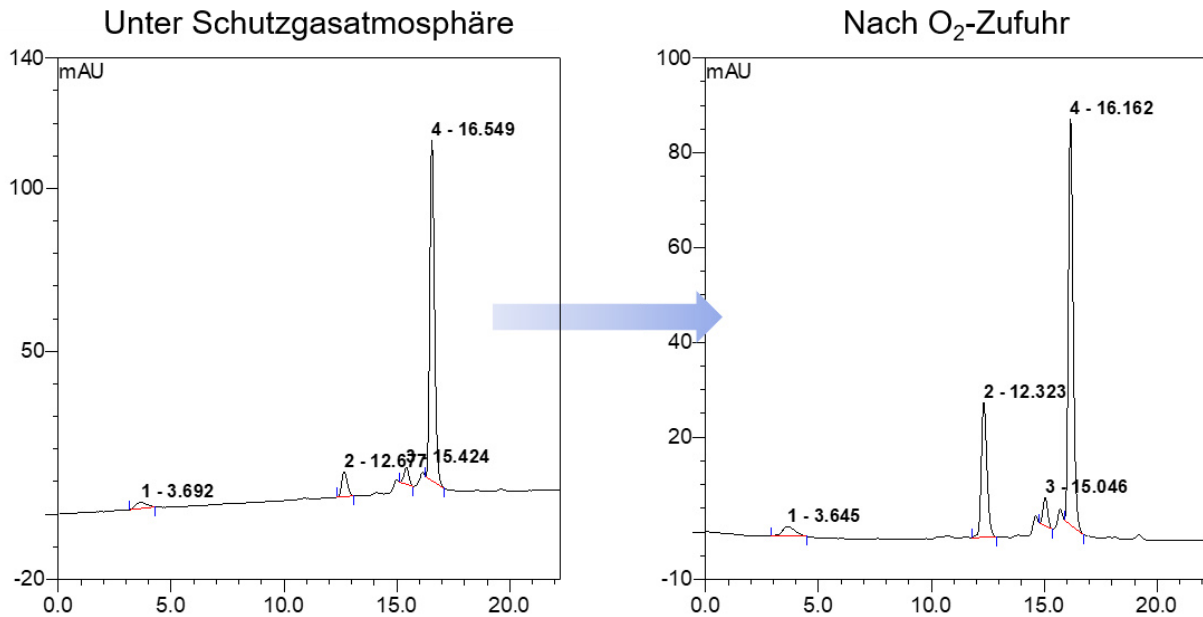


Abbildung 3-16. Ausschnitte aus HPLC-Messungen von **40** (Lys₄(GCP)-EDS+-Biotin) vor und nach Zufuhr von Luftsauerstoff für eine Dauer von 1.5 h; Elutionsbedingungen: 30% – 50% MeOH+0.1% TFA (70% – 50% H₂O+0.1% TFA).

Wie in **Abbildung 3-16** gezeigt führt der Zerfall von **40** (Lys₄(GCP)-EDS+-Biotin) zu einer neuen Spezies (Oxidation des Biotins belegt durch ESI-MS) mit einer Retentionszeit von zwölf Minuten. Durch die Zufuhr von Luftsauerstoff wurde in einer Zeitspanne von 1.5 h 18% des Produktes oxidiert. Im weiteren Verlauf entstanden allerdings mehrere weitere Nebenprodukte, welche nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Um eine mögliche Oxidation während der Zellexperimente im Inkubator zu untersuchen, wurde das Produkt mit H₂O verdünnt und für 18 h bei 37.5 °C unter CO₂ Atmosphäre (5%) gelagert.

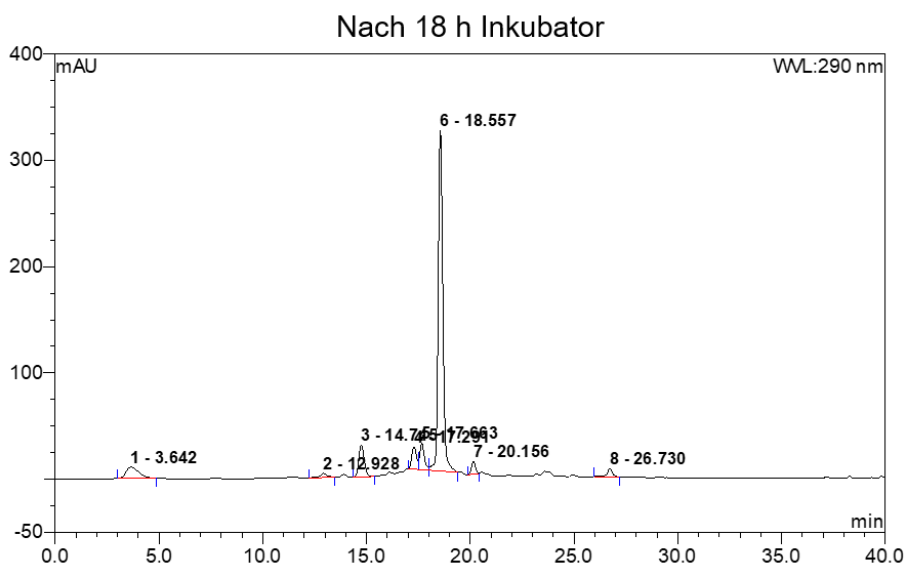


Abbildung 3-17. HPLC-Messung von **40** nach Lagerung für 18 h im Brutschrank (37.5 °C, 5% CO₂, 95% relative Feuchtigkeit); Elutionsbedingungen: 30% – 50% MeOH+0.1% TFA (70% – 50% H₂O + 0.1% TFA).

Der in **Abbildung 3-17** gezeigte HPLC-Verlauf nach Lagerung für 18 Stunden im Inkubator zeigt eine einzelne Verbindung mit hoher Reinheit und einer Retentionszeit von 18.5 Minuten. Im Gegensatz zu vorherigen Proben wurde in diesem Fall **40** in H₂O gelöst, so dass, wie zu erwarten, eine Verschiebung der Elutionszeit zu höheren Werten beobachtet werden konnte. Eine weitere Lagerung dieser Probe über 48 h unter Luftsauerstoff führte wie zuvor zur Entstehung eines neuen Peaks und somit mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Oxidation des Produktes. Diese Messungen legen nahe, dass der Vektor während der Inkubationszeit nicht oxidiert wird. Ähnliche Experimente bei denen **40** im Wachstumsmedium der Zellen (DMEM+++) gelöst wurde konnten auf Grund von Überlagerungen mit anderen Bestandteilen des Puffers nicht analysiert werden.

Diese vielversprechenden Ergebnisse lieferten die Grundlage für die folgenden biologischen Zellexperimente in denen Vektor **40** in einer Konzentrationsreihe von 100 – 600 µM getestet wurde.

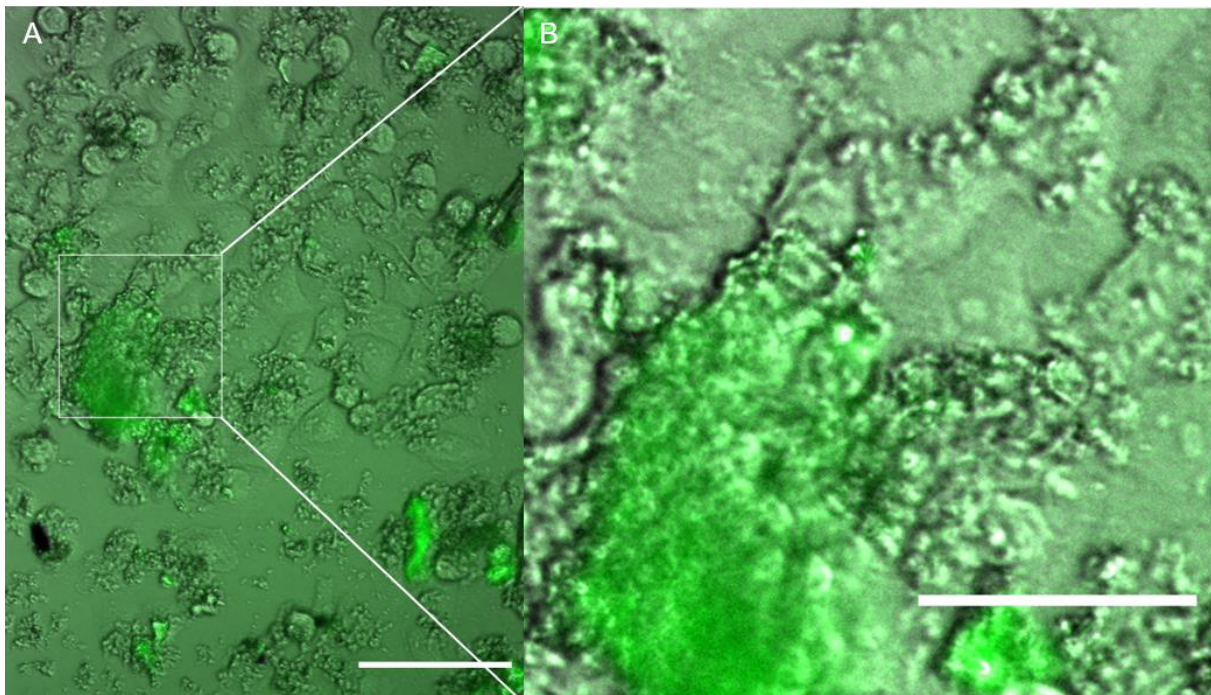


Abbildung 3-18. Fluoreszenzmikroskopie Aufnahme von **40** an HeLa Zellen, Konzentration des Vektors 300 µM; A) Übersichtsaufnahme, Maßstab 150 µm; B) Vergrößerung des gezeigten Ausschnittes, Maßstab 50 µm.

Wie in **Abbildung 3-18** gezeigt konnten keine transfizierten Zellen bei einer Konzentration von 300 µM beobachtet werden, wobei jedoch viel ungelöstes Material die Analyse der Bilder erschwerte. Weitere mikroskopische Aufnahmen bei höheren Konzentrationen zeigten auch keine eindeutig transfizierten Zellen. Das abweichende Format der Bilder ist durch die Verwendung eines anderen Mikroskops begründet, da technische Probleme die Benutzung des Standardmikroskops verhinderten. Die Zellen wurden 5 h nach der erneuter Transfektion mit warmem PBS-Puffer gewaschen und mit dem Zellmedium (DMEM+++) überschichtet, um

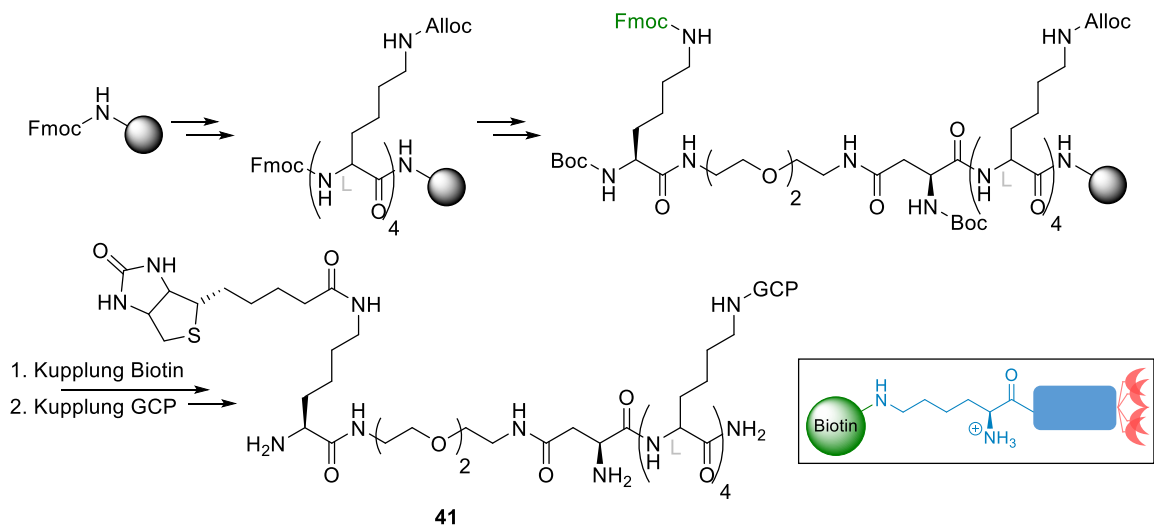
das Problem der schlechten Auswertbarkeit zu beheben. Die nun besser auszuwertenden Bilder zeigten jedoch diesmal deutlich, dass keine Zellen bei den getesteten Konzentrationen transfiziert wurden. Die grundlegende Vermutung für diese Ergebnisse war die schlechte Löslichkeit des Vektors, was bereits in der Probenvorbereitung auffiel. Es wurde von einer schlechten Löslichkeit der Final-gebildeten Polyplexe ausgegangen, so dass definierte Mischungsverhältnisse aus den Lösungen von **40** (Lys₄(GCP)-EDS+-Biotin) und **39** (Lys₄(GCP)-EDS+-Ac) (1:1 und 1:9, respektiv) hergestellt wurden. Diese könnten, da die DNA in diesem Fall von hydrophoben und hydrophilen Vektoren kondensiert wurde, hydrophilere Polyplexe bilden und so zu einer erfolgreichen Transfektion beitragen. Trotz einer breiten Konzentrationsreihe (300 – 600 µM) konnten erneut keine transfizierten Zellen beobachtet werden. Zusammenfassend scheinen die finalen Polyplexe bedingt durch das Biotinlabel nur eine geringe Löslichkeit in Wasser aufzuweisen, wodurch eine Transfektion verhindert wird. Aus diesem Grund sollte in zukünftigen Experimenten eine Verbesserung hin zu einem hydrophileren Charakter des Labels erreicht werden.

3.2 Synthese und erste Tests des finalen Vektors 41

Da erneut das Auftreten einer schlechten Löslichkeit ein Problem für die erfolgreiche Umsetzung des Projektes darstellte, sollte in diesem Fall eine Lösung durch die Variation des Labels herbeigeführt werden. Ein Literaturvergleich zeigte, dass das physiologische vorkommende Biocytin (*N*^ε-Biotinyl-L-lysin) ein hydrophileres Targetinglabel darstellen könnte.^[17] Da Biocytin ebenfalls erfolgreich als neuronaler Tracer eingesetzt wird, würde einer Anwendung in Zellexperimenten nichts im Wege stehen.^[175,176] Hierzu müsste das Biotin folglich an der Seitenkette eines weiteren Lysin (**Schema 3-10**) am *N*-Terminus des Peptids gekuppelt werden. Ein weiterer Vorteil könnte eine erhöhte Distanz zwischen DNA-Binder und dem Targetinglabel selbst sein, so dass eine bessere Zellerkennung möglich wäre.

3.2.1 Optimierung des Biotinlabels

Aus den zu Beginn genannten Gründen wurde die Synthese des Vektors **41** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Biotin)) mit Hilfe von mikrowellengestützter und klassischer Festphasenpeptidsynthese unternommen. Hierbei wurde, neben Fmoc-Lys(Alloc)-OH und der verbesserten Linkereinheit (**36**, EDS+), Boc-Lys(Fmoc)-OH verwendet.



Schema 3-10. Zusammenfassung der Festphasenpeptidsynthese von **41** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Biotin)).

Alle vorbeugenden Maßnahmen aus 3.1.2.6 wurden übernommen, um eine Oxidation der Erkennungseinheit zu verhindern. Die Synthese von **41** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Biotin), **Schema 3-10**) wurde erfolgreich durchgeführt und konnte durch ESI-MS erstmals erfolgreich nachgewiesen werden. Die Isolation des Produktes erfolgte mittels präparativer HPLC an Umkehrphase. Die isolierten Fraktionen zeigten nach vollständiger Aufarbeitung eine Reinheit von bis zu 99% (analyt. HPLC 30% → 50% MeOH+0.1% TFA). Eine vollständige

Charakterisierung mittels NMR und Massenspektren wiesen das Vorhandensein des Produktes (**41**) nach. Im Anschluss wurden Transfektionsexperimente unternommen. Dazu wurde das Produkt in DMSO gelöst, um eine vollständige Lösung sicherzustellen. Eine anschließende Verdünnung auf die entsprechende Konzentration wurde durch Zugabe von Wasser erreicht.

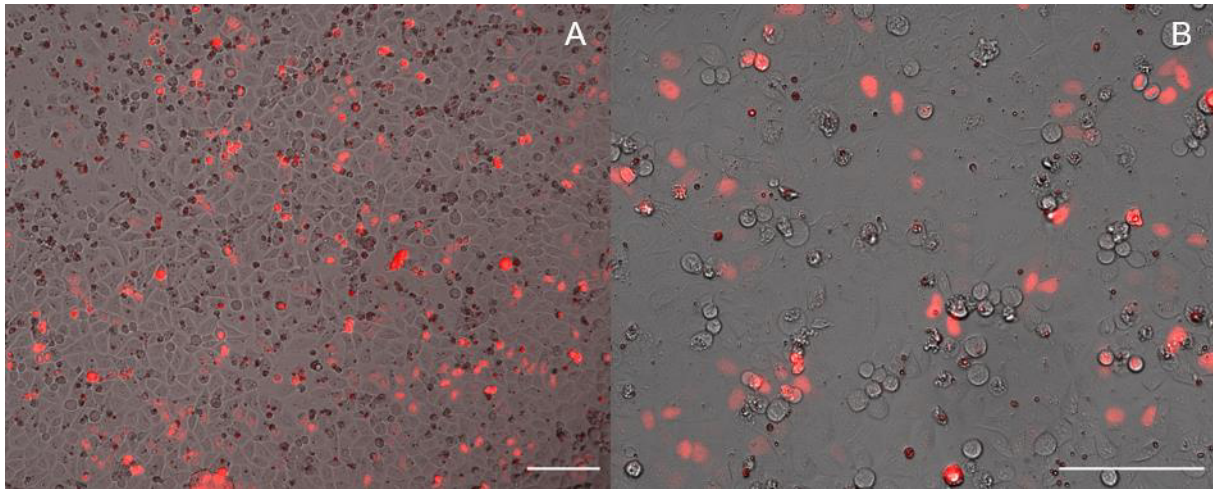


Abbildung 3-19. Fluoreszenzmikroskopie Aufnahmen von **41** ($\text{Lys}_4(\text{GCP})\text{-EDS}+\text{Lys}(\text{Biotin})$) an HeLa Zellen bei einer Konzentration von $200\ \mu\text{M}$; A: Übersichtsaufnahme eines Teils der transfizierten Zellen, Maßstab $150\ \mu\text{m}$; B: Detailaufnahme in doppelter Vergrößerung ($20\times$) der Zellen, Maßstab $150\ \mu\text{m}$.

Erste Versuche zeigten gute Resultate, wie in **Abbildung 3-19** gezeigt, so dass HeLa Zellen bereits ab einer Konzentration von $200\ \mu\text{M}$ transfiziert werden konnten. Diese Verringerung von c_{min} auf das Niveau des publizierten Vektors (**12**, $\text{Lys}_4(\text{GCP})\text{-NH}_2$, $150\ \mu\text{M}$) konnte als positives Ergebnis durch den Einfluss des Biotocytins festgestellt werden. Somit wurden weitere Zelleexperimente durchgeführt, bei denen die Zellspezifität das Ziel der Versuche war. Hierzu sollten zu Beginn die Krebszelllinien HEK293t und WI38 (beide wenig Biotin Rezeptor-Expression)^[141] verwendet werden. Die Negativkontrollen zeigten das erwartete Ergebnis bei dem keine der Zellen transfiziert wurden. GleichermäÙen konnten allerdings auch die Ergebnisse an HeLa-Zellen nicht reproduziert werden. Zur näheren Untersuchung dieses Problems wurden verschiedene Einflüsse getestet, wobei Veränderungen sowohl in der Probenvorbereitung als auch in den biologischen Assays evaluiert wurden. Die wichtigsten getesteten Variationen werden in **Tabelle 3-1** zusammengefasst.

Tabelle 3-1. Überblick über einen Teil der getesteten Probenvorbereitungen und Veränderung des biologischen Assays.

1	Inkubationszeit von Vektor und DNA erhöhen
2	Vektorkonzentration erhöhen/verringern
3	DMSO Konzentration erhöhen
4	Transfektionsdauer erhöhen (24 h)
5	Dauer zwischen Ansetzen der Probe und Einwaage verringern
6	DNA-Konzentration erhöhen (1 – 2 µg)
7	Proben (nicht) vortexen

Die in **Tabelle 3-1** aufgezählten Möglichkeiten wurden aus verschiedenen Gründen erwogen, die im Folgenden kurz zusammengefasst werden sollen. Bei der Inkubationszeit des Vektors (1) mit der DNA in PBS-Puffer könnte es, bei einer zeitlichen Veränderung, zu einer nicht vollständigen Kondensation des genetischen Materials kommen und so das Ergebnis in den biologischen Assays beeinflussen. Hierzu wurde die Inkubationszeit von 15 auf 30 Minuten erhöht. Eine Anpassung der Vektorkonzentration (2) wurde getestet, um eine etwaige falsche Einwaage bei den ersten Versuchen zu erklären. Die finale Vektorkonzentration wurde in einem Spektrum von 150 – 300 µM getestet. Die Erhöhung der DMSO-Konzentration (3) sollte das vollständige Lösen des Vektors vor der Transfektion sicherstellen, wobei diese nur in einem geringen Niveau angepasst werden konnte, weshalb diese von 10% auf 20% erhöht wurde. Eine zu hohe DMSO Menge in biologischen Assays kann dabei einen negativen Einfluss auf die Zellviabilität haben.^[177] Die Dauer der Transfektion (4) wurde ebenfalls als eine Stellschraube identifiziert, da womöglich eine langsamere Aufnahme in die Zellen für die Ergebnisse verantwortlich sein könnte. Somit wurde der Vektor 24 h im Zellmedium belassen und vor der Mikroskopie durch einen Mediumwechsel entfernt. Die Zeit in der die Probe unter Luftsauerstoff gelagert wurde (z.B. bei der Einwaage) sollte so kurz wie möglich gehalten werden (5), da eine Oxidation möglich sein könnte. Ebenfalls wiesen Proben zum Teil einen hygroskopischen Charakter auf wodurch bei der Einwaage ein Fehler entstehen könnte. Die DNA-Menge (6), welche für die Transfektion verwendet wurde, wurde ebenfalls erhöht, um einen möglichen Pipettierfehler während der initialen Tests vorzubeugen. Hierzu wurde die DNA-Menge verdoppelt. Das Schütteln (mit Hilfe eines Vortexmischers) der Proben (7) nach dem Mischen wurde variiert, um so einen Unterschied in der Kondensationsfähigkeit festzustellen, wobei keine Wirkung auf die Transfektionsergebnisse erkennbar wurde.

In keinem der oben gezeigten Fälle konnten jedoch die Beobachtungen aus den ersten Versuchen zuverlässig reproduziert werden. Zwar konnten gelegentlich erfolgreich Positiv-

und Negativkontrollen transfiziert werden, was jedoch unabhängig von der Proben-
vorbereitung zu sein schien. Eine Lösung für das Problem konnte für längere Zeit nicht
ermittelt werden, bis das Lösen der Probe in einer Mischung aus DMSO/H₂O als letzter
Faktor identifiziert wurde. Hierbei ist wie bereits erwähnt Vorsicht geboten, da eine hohe
Konzentration des organischen Lösungsmittels für Zellen schädlich ist. Allerdings könnte die
initiale Konzentration des Vektors erhöht werden, um so weniger DMSO im Zellmedium zu
erhalten. Problematisch könnte sich hierbei allerdings die Löslichkeit des Vektors
herausstellen.

3.3 Re-evaluation bisheriger Ergebnisse durch Änderung der Probenvorbereitung

3.3.1 Anpassung der Probenvorbereitung

Eine Veränderung des initialen Lösemittels von DMSO/H₂O zu DMSO wurde als nächster Schritt in der Entwicklung eines zellspezifischen Vektorsystems erachtet. Hierbei war es wichtig eine zu hohe Endkonzentration von DMSO während der Transfektionsexperimente zu vermeiden, da dies zu erhöhter Membranpermeabilität führen kann und so die Toxizität steigt.^[177] Um dies zu gewährleisten, wurden Vektorproben in einer möglichst hohen Konzentration von bis zu 50 mM (DMSO), im Vergleich zu 5 mM (DMSO/H₂O), angesetzt. Die benötigte Konzentration des Vektors (**41**, Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Biotin)) in DMSO konnte unter Verwendung des HCl-Salzes nicht erreicht werden. Daher wurde als Alternative das TFA-Salz verwendet, welches eine höhere Löslichkeit in DMSO aufwies. Das Hydrochlorid des Peptides zeigte bei einer Konzentration von 40 mM in DMSO noch eine deutliche Trübung, welche sich durch Zentrifugation entfernen ließ. Dies würde jedoch zu einer nicht abschätzbaren Veränderung der Konzentration führen. Somit wurden alle weiteren biologischen Experimente mit dem Salz der Trifluoressigsäure durchgeführt, was bei der Evaluation der Zelltoxizität beachtet werden muss. Des Weiteren wurde auch das allgemeine Vorgehen beim Zusammengeben von Vektor mit DNA und PBS Puffer angepasst. Wobei zuvor der Vektor mit Puffer verdünnt und dann mit dem Plasmid zusammengeführt wurde, wurde die DMSO-Lösung direkt zum genetischen Material gegeben, so dass keine vorherige Interaktion mit H₂O stattfinden konnte. Die Temperatur bei der die Polyplexe gebildet wurden, wurde ebenfalls kontrolliert und auf 25 °C eingestellt. Die Zelleexperimente aus 3.2.1 (**Abbildung 3-19**) konnten so letztlich reproduziert werden. Die Theorie zu diesem Zeitpunkt war, dass der Vektor in wässrigen Lösungen zu Selbstassemblierung neigt. Durch die hydrophoben und hydrophilen Molekülbestandteile könnte es zu einer Partikelbildung kommen, die nicht mehr in der Lage sind mit dem genetischen Material zu interagieren. Somit würde in biologischen Messungen keine Transfektion zu beobachten sein. Um dies zu evaluieren wurden im Folgenden physikochemische Messungen unternommen, um diese Hypothese zu testen und Hinweise auf eine mögliche Assemblierung zu finden.

3.3.2 Physikochemische Evaluation der Probenvorbereitung

Es wurden physikochemische Messungen unternommen, um eine Erklärung für den Erfolg der angepassten Probenvorbereitung zu finden. Hierbei sollte das Kondensationsverhalten in Abhängigkeit vom Lösemittel des Vektors bewertet werden. Zu diesem Zweck wurden entsprechende Messungen per DLS und AFM eingesetzt, da so eine Veränderung deutlich zu erkennen sein könnte.

3.3.2.1 DLS-Messungen von 41

Die Größenbestimmung der Aggregate von **41** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Biotin)) mit pDNA wurde wie in 3.1.2.2 beschrieben durchgeführt. Zur Vorbereitung wurde der entsprechende Vektor im Gegensatz zu vorherigen Messungen einmal in einer Mischung aus DMSO/H₂O (1:9) und ein weiteres Mal in DMSO gelöst. Das genetische Material wurde in H₂O gelöst und Aliquote der Lösungen aus **41** hinzu pipettiert.

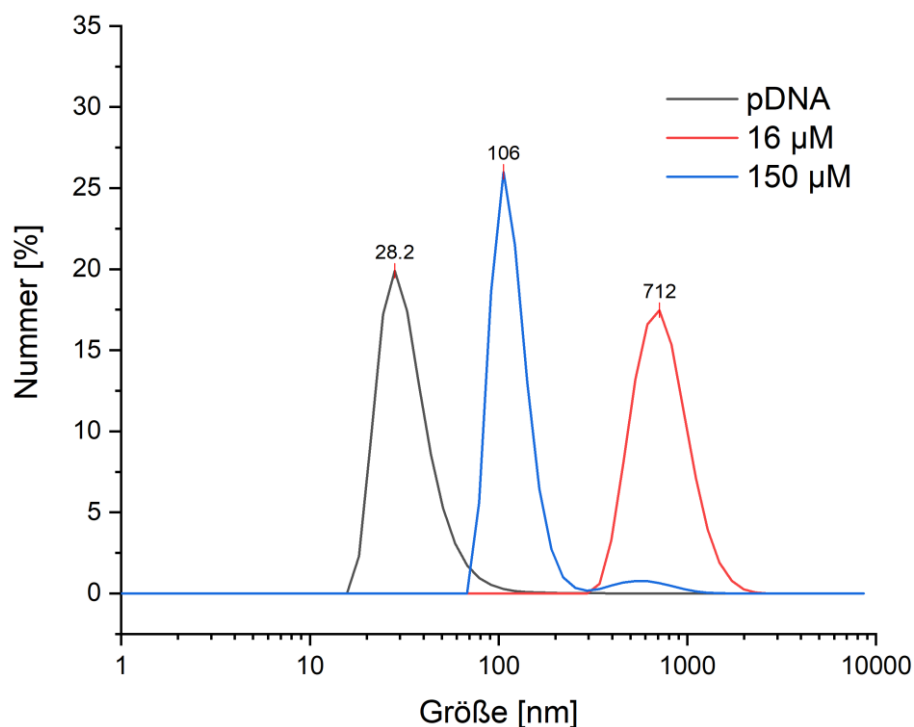


Abbildung 3-20. Darstellung der DLS-Größenverteilung (Nummer) von pDNA (10 µg/mL) mit Vektor **41** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Biotin)) in den Konzentrationen 16 µM und 150 µM; Lösemittel des Vektors 100% DMSO.

Hierbei konnte beobachtet werden (**Abbildung 3-20**), dass wie zuvor erst kleine Aggregate (ca. 30 nm) der DNA vorlagen. Durch die Zugabe des Vektors (**41**), aus einer 100% Lösung aus DMSO, bildeten sich vorerst große Strukturen von ca. 700 nm. Diese verkleinerten sich aber bei erhöhter Konzentration (150 µM) auf bis zu ca. 100 nm, wobei auch durch weitere Zugabe des Vektors keine kleineren Aggregate mehr entstanden. Diese Ergebnisse stehen

im Einklang mit den bereits durchgeführten Messungen der Vorläufermoleküle (3.1.2.2 (35) und 3.1.2.3 (39)).

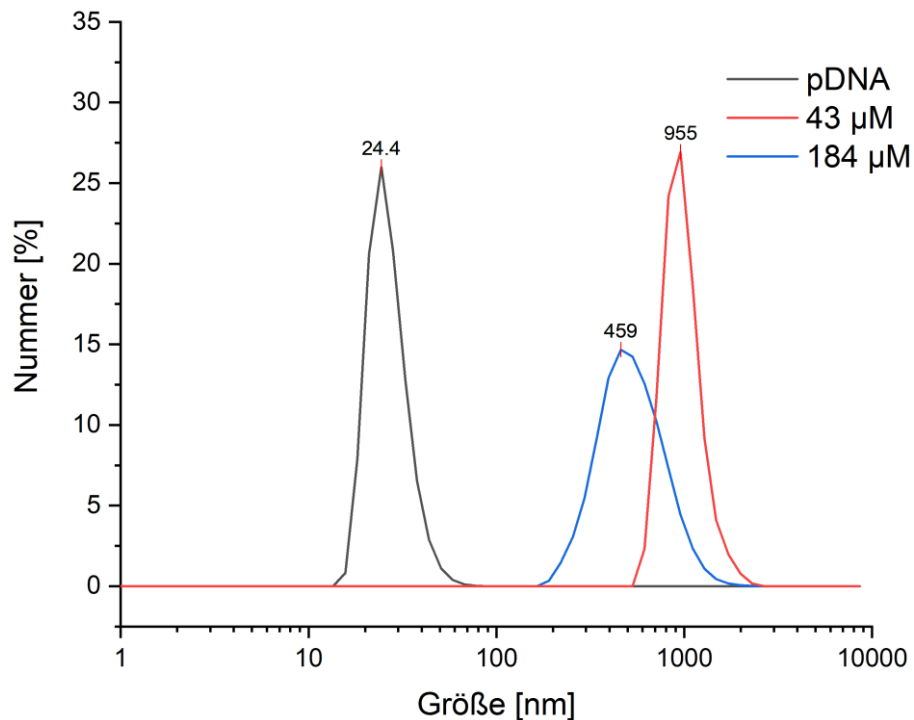


Abbildung 3-21. Darstellung der DLS-Größenverteilung (Nummer) von pDNA (10 µg/mL) mit Vektor 41 (Lys₄(GCP)-EDS⁺-Lys(Biotin)) in den Konzentrationen 43 µM und 184 µM; Lösemittel des Vektors DMSO/H₂O (1:9).

Die geringe Größe der pDNA konnte wie zuvor durch Zugabe des Vektors (41) aus DMSO/H₂O (1:9) deutlich auf bis zu ca. 1000 nm vergrößert werden (**Abbildung 3-21**). Eine Erhöhung der Konzentration auf bis zu 184 µM lieferte im Gegensatz zu den bisherigen Erfahrungen allerdings nur eine Verringerung der Größe auf 460 nm und liegt damit deutlich über den zuvor erreichten ca. 100 nm bei einer geringeren Konzentration. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es bereits vor der Interaktion mit der DNA eine Präorganisation des Vektors in wässrigem Milieu gibt. Die somit resultierenden Polyplexe zeigen eine Größenverteilung die vermutlich zu groß für eine Aufnahme in die Zielzellen sind.^[18] Dies könnte die negativen Ergebnisse aus den biologischen Experimenten erklären. Durch die hohe Bindungskonstante des GCPs an Phosphatanionen ist die Tatsache bemerkenswert, dass durch die Zugabe von DNA die womöglich präorganisierten Aggregate nicht aufbrechen und so eine stärkere supramolekulare Wechselwirkung ausbilden.^[98]

3.3.2.2 Analyse des Aggregationsverhalten von 41 durch AFM

Im Gegensatz zu DLS-Messungen, wobei Aggregate in Lösung betrachtet werden und von sphärischen Partikeln ausgegangen wird, zeigen AFM-Aufnahmen die Struktur der Probe im getrockneten Zustand. Hierzu wird der Analyt zuerst auf eine Mica-Platte aufgetragen und dann für 1 h bei einer Umdrehungszahl von 1000 rpm mit Hilfe eines Spin-Coaters getrocknet. Im Bezug auf die vorliegende Problematik wurde daher zuerst das Plasmid (10 µg/mL) selbst vermessen, um so einen Vergleich zu späteren Aufnahmen zu haben.

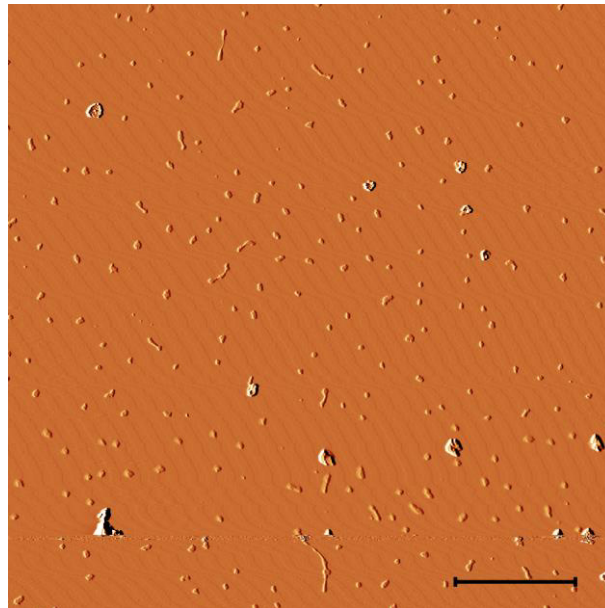


Abbildung 3-22. AFM-Aufnahmen des Plasmids; Konzentration 10 µg/mL (aus H₂O); Maßstab: 2 µm.

Die in **Abbildung 3-22** gezeigte Aufnahme der Mica-Platte zeigt zwei auffällige Gegebenheiten. Zum einen sind vertikal verlaufende, konzentrische Linien zu erkennen, welche durch das Material des Untergrunds hervorgerufen werden und nicht durch die Probe bedingt sind.^[178] Die Partikel, welche eine Breite von ca. 100 nm besitzen, könnten dementsprechend aggregierte DNA-Stränge sein. Diese Messungen sollten für die kommenden Vergleiche herangezogen werden, um das Aggregationsverhalten des Vektors (**41**, Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Biotin)) beurteilen zu können.

Um nun einen Vergleich zwischen den beiden Probenvorbereitungen ziehen zu können, wurden in Summe vier Messungen unternommen. Zuerst wurde **41** einmal in DMSO/H₂O und ein weiteres Mal in DMSO mit einer Konzentration von jeweils 125 µM gelöst und auf Mica-Platten aufgetragen. Nach einstündiger Rotationsbeschichtung wurden passende Ausschnitte des Analyten gesucht und anschließenden durch AFM vermessen.

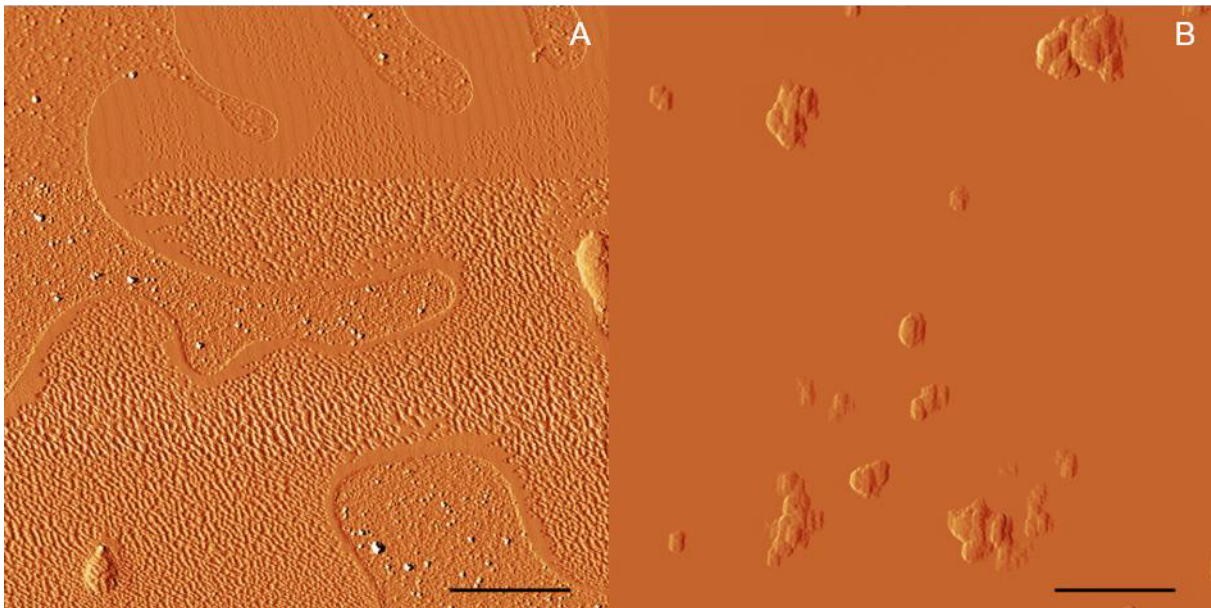


Abbildung 3-23. AFM-Aufnahmen des Vektors **41** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Biotin)) aus DMSO (A) und DMSO/H₂O (B); Konzentration der Proben 125 μ M; Maßstab: 2 μ m.

In **Abbildung 3-23** sind zwei Messungen des Vektors **41** gezeigt, welche aus einer Lösung aus entweder DMSO (A) oder einer 10% DMSO/H₂O Lösung (B), aufgetragen wurden. In beiden Fällen wurde eine Konzentration von 125 μ M verwendet, um einen Vergleich zwischen den Proben zu gewährleisten. Im linken Teil der Abbildung sind flache und gleichmäßig verteilte Strukturen zu erkennen, welche nur eine geringe Höhe von wenigen Nanometern aufweisen. Größere Aggregate konnten nicht identifiziert werden. Im Gegensatz dazu sind in Teil B der Abbildung abgegrenzte Strukturen zu erkennen, welche sich nach Rotationsbeschichtung gebildet haben. Das Höhenprofil dieser Partikel zeigt maximale Werte von bis zu 100 nm. Diese Unterschiede der Proben selbst geben schon erste Hinweise darauf, dass eine Lösung aus DMSO/H₂O bereits vor dem Zusammengeben mit DNA, Aggregate bildet. Die vollständigen AFM-Daten und Messungen der Höhenprofile sind im Anhang dargestellt.

Mit diesen Erkenntnissen wurden im Anschluss ähnliche Messungen unter Zugabe von pDNA angefertigt, um so eine mögliche Veränderung der Aggregate zu analysieren. Aus Lösungen von **41** in DMSO/H₂O und DMSO wurde eine entsprechende Menge zum Plasmid gegeben, um eine finale Konzentration von 125 μ M zu erreichen. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurden die Mica-Platten durch Rotationsbeschichtung mit den Analyten vorbereitet und im Anschluss per AFM untersucht.

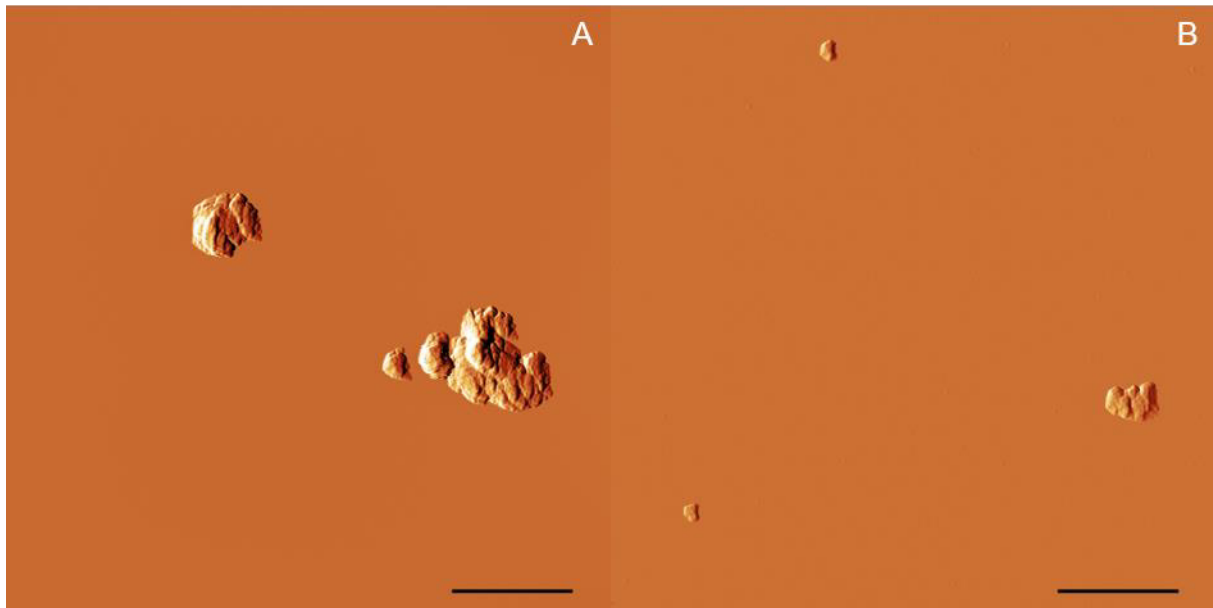


Abbildung 3-24. AFM-Aufnahmen des Vektors **41** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Biotin)) aus DMSO (A) und DMSO/H₂O (B) mit 10 µg/mL pDNA inkubiert; Konzentration der Proben 125 µM; Maßstab 2 µm.

Wie in **Abbildung 3-24** gezeigt bilden sowohl Proben von **41**, welche entweder in DMSO oder DMSO/H₂O gelöst wurden, nach Zugabe vom Plasmid Partikel. Im Vergleich zu den vorherigen Messungen ohne genetisches Material ist der Unterschied bei einer Zugabe aus DMSO am größten. Die zuvor gleichmäßigen, kleinen Aggregate konnten in diesem Fall nicht beobachtet werden. Die räumlich voneinander getrennten Partikel mit einer Höhe von bis zu 400 nm sind hier besonders auffällig. Im Gegensatz zu den DLS-Messungen konnten mittels AFM deutlich größere Strukturen bei gleicher Konzentration ermittelt werden. Dies ist allerdings durch die Unterschiede in der Messmethodik und Probenvorbereitung begründet und wurde bereits zuvor in der Literatur beschrieben.^[171] Die Proben welche aus DMSO/H₂O aufgetragen wurden zeigen durch die Inkubation mit dem Plasmid keine Veränderung der Höhe oder Beschaffenheit der Partikel.

Die angefertigten analytischen Messungen zum Aggregationsverhalten von **41** zeigen einen Unterschied in der Bildung von Aggregaten. Diese Ergebnisse lassen eine mögliche Schlussfolgerung zu, so dass eine Lösung, aus dem Vektor, im wässrigen Milieu bereits einen präorganisierten Komplex bildet, der nicht durch Zugabe von pDNA aufgebrochen werden kann. Hinweise, warum die Transfektion zwischenzeitlich dennoch positive Ergebnisse lieferte lassen sich leider aus diesen Daten nicht eruieren.

Zusammenfassend legen die physikochemischen Messungen nahe, dass es einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden diskutierten Probenvorbereitungen gibt. DLS sowie AFM-Daten zeigen, dass eine vollständige Aggregation des Plasmids nicht mehr möglich zu sein scheint, wenn der Vektor aus DMSO/H₂O zugegeben wird. Durch diese

Erkenntnisse können die wechselhaften Resultate aus biologischen Assays erklärt werden und gaben somit eine angepasste Vorbereitungsmethodik für neue Zellexperimente vor.

3.3.2.3 Re-evaluation der vorangegangener biologischen Messungen

Durch die Anpassung der Probenvorbereitung mussten demnach auch alle vorherigen Messungen der Vorgängermoleküle erneut in biologischen Assays getestet werden. Hierzu wurden alle Transfektionsexperimente der Vektoren aus 3.1.2 wiederholt, um so genaue Daten zu ermitteln und eine Evaluation der Veränderungen zu ermöglichen. Hierbei wurde im Gegensatz zu vorherigen Messungen allerdings in allen Fällen das Salz der Trifluoressigsäure verwendet, um so einen besseren Vergleich zu der Positivkontrolle herzustellen.

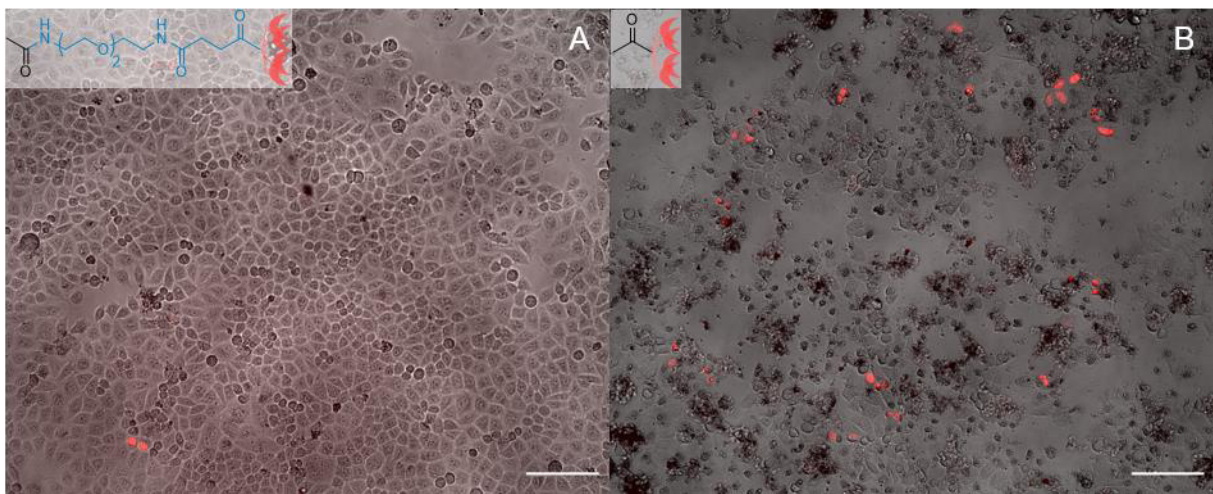


Abbildung 3-25. Fluoreszenzmikroskopie Aufnahmen von **35** (Lys₄(GCP)-EDS-Ac, A) und **33** (Lys₄(GCP)-Ac, B) an HeLa Zellen; A: Konzentration des Vektors 200 µM; B: Konzentration des Vektors 400 µM; Maßstab 150 µm.

Die in **Abbildung 3-25** gezeigten Mikroskopiebilder von **35** (Lys₄(GCP)-EDS-Ac) und **33** (Lys₄(GCP)-Ac) an HeLa Zellen zeigen eine erfolgreiche Transfektion der Zellen, nachdem die Vektoren aus einer Lösung aus DMSO zugegeben wurden. Hierbei wurde eine deutliche Verschiebung von c_{\min} für **35** festgestellt, da nun nur eine Konzentration von 200 µM benötigt wurde, um transfizierte Zellen zu beobachten. Die im Vergleich dazu hohen Werte von 700 µM (3.1.2.2), bei denen der Vektor in einer Mischung aus DMSO/H₂O gelöst wurde, sind besonders auffällig. Eine Erhöhung der Konzentration auf bis zu 500 µM führte in diesem Fall zu einer Zunahme der beobachteten Transfektionseffizienz. Für Vektor **33** ist allerdings keine Veränderung der minimalen Konzentration festzustellen, da in beiden Fällen eine Konzentration von 400 µM benötigt werden (3.1.2.1). Auch ist keine Veränderung der subjektiven Transfektionseffizienz zu erkennen, welche auf Basis der Fluoreszenzaufnahmen abgeschätzt wurden.

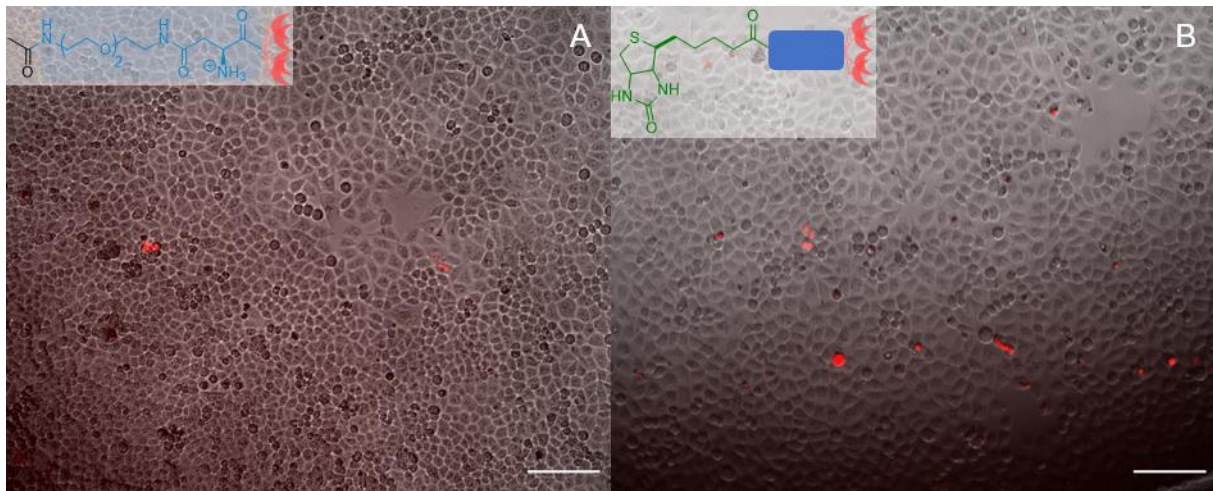


Abbildung 3-26. Fluoreszenzmikroskopie Aufnahmen von **39** (Lys₄(GCP)-EDS+-Ac, A) und **40** (Lys₄(GCP)-EDS+-Biotin, B) an HeLa Zellen; A: Konzentration des Vektors 200 µM; B: Konzentration des Vektors 150 µM; Maßstab 150 µm.

Die weiteren, bereits evaluierten Vektoren **39** (Lys₄(GCP)-EDS+-Ac) und **40** (Lys₄(GCP)-EDS+-Biotin), wurden ebenfalls in erneuten biologischen Assays untersucht und die in **Abbildung 3-26** gezeigten Aufnahmen nach Fluoreszenzmikroskopie erhalten. Der hydrophile Vektor **39** zeigte nach Zugabe aus einer Lösung aus DMSO ein vergleichbares Transfektionsverhalten wie zuvor (3.1.2.4) und es wurde eine Mindestkonzentration von 200 µM benötigt, um HeLa-Zellen zu transfizieren. Eine Erhöhung der Konzentration führte in diesem Fall ebenso zu einer Zunahme der zu beobachtenden Transfektionseffizienz. Die angepasste Probenvorbereitung ermöglichte des Weiteren eine erfolgreiche Transfektion mit Vektor **40**. Da Dieser in vorangegangenen Tests (3.1.2.6) keine biologische Wirkung zeigte, sind die Resultate umso bedeutender. Die Auswirkungen dieses initialen Schritts wurden in diesem Abschnitt besonders hervorgehoben und haben infolgedessen einen großen Einfluss auf die generelle Transfektionsleistung der einzelnen Vektoren.

Eine Quantifizierung der Transfektionseffizienzen wurde durch das weitere Fortschreiten des Projektes immer wichtiger, da eine rein qualitative Aussage bei einer so drastischen Veränderung von c_{\min} nicht mehr als ausreichend angesehen wurde. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde durch das Anfärben aller Zellkerne mit Hoechst33342 erreicht. Dieser Farbstoff kann durch die Zellmembran diffundieren und lagert sich an die DNA an.^[179] Mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie kann so die Anzahl aller Zellen ermittelt werden. Wird die Anzahl an transfizierten Zellen durch die Gesamtheit aller geteilt, wird die Transfektionseffizienz erhalten. Um diesen Prozess zu automatisieren und schnell eine breite Anzahl Bilder zu analysieren wurde in dieser Arbeit CellProfiler® verwendet, welches dies ermöglicht.^[180] Durch das Anfertigen einer sogenannten Pipeline mit Hilfe des Imaging Centers Campus Essen trennt das Programm zu Beginn alle Zellen die mit Hoechst gefärbt wurden ab. Innerhalb dieser Abgrenzung sucht das Programm dann nach Zellen, welche mit Hilfe des Plasmids transfiziert wurden. Nachdem ein Schwellenwert für eine Färbung

angewendet wurde, konnte das Verhältnis aus transfizierten und der Gesamtzahl der Zellen errechnet werden. Die so bestimmte Zahl entspricht der Transfektionseffizienz in Prozent.

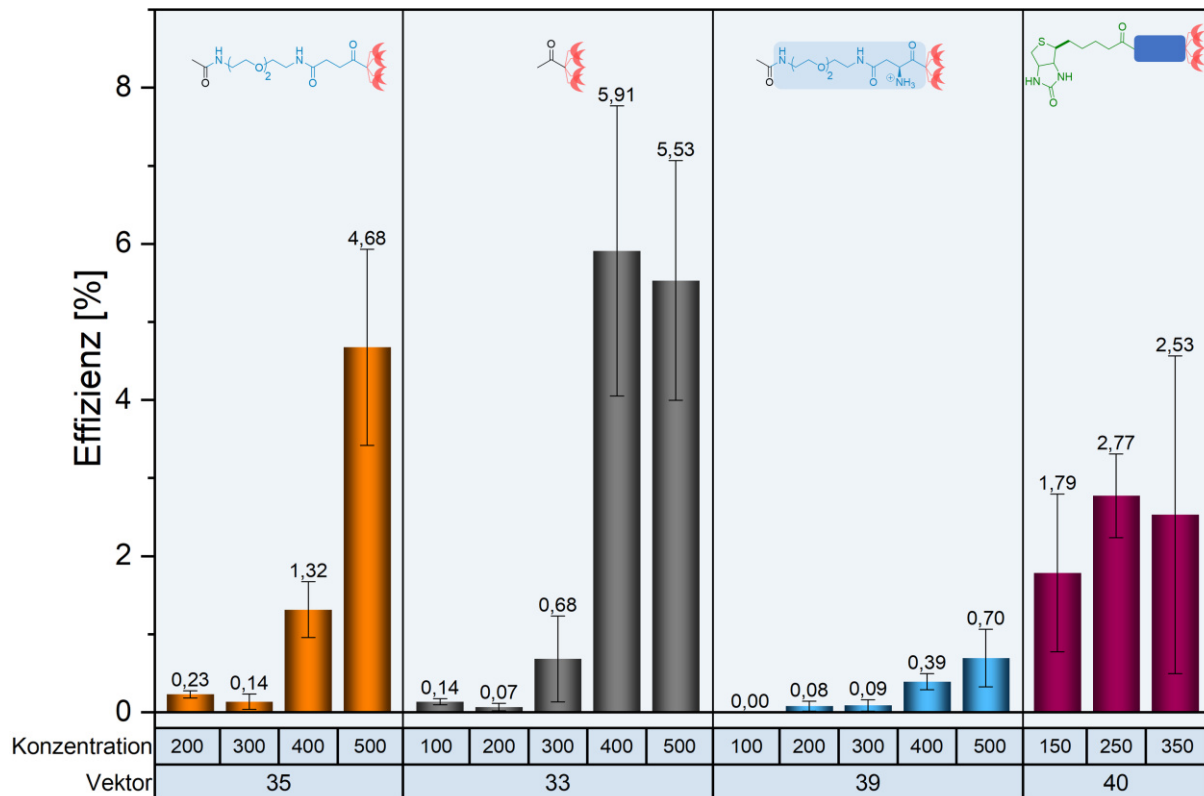


Abbildung 3-27. Zusammenfassung aller Transfektionseffizienzen der unterschiedlichen Vektoren an HeLa-Zellen; gezeigte Daten wurden mittels CellProfiler® ermittelt.

Die Transfektionseffizienz als neuer Maßstab für die Performance der Vektoren, wurde durch erneute biologische Messungen ermittelt. Hierzu wurden die Proben in DMSO gelöst und zum Plasmid in PBS-Puffer gegeben. Die so ermittelten Daten sind in **Abbildung 3-27** in einem Balkendiagramm zusammengefasst. Auf der y-Achse ist die Effizienz in Prozent dargestellt und die x-Achse zeigt die entsprechende Konzentration der einzelnen Vektoren. Hierbei erreicht **35** (Lys₄(GCP)-EDS-Ac) bei einer geringeren Konzentration von 200 – 300 µM nur eine niedrige Effizienz von unter einem Prozent. Mit steigendem Anteil des Vektors steigt jedoch auch exponentiell die Transfektionseffizienz an, so dass bei einer Konzentration von 500 µM ein Wert von etwa 5% erreicht wird. Der Vektor **33** (Lys₄(GCP)-Ac) mit acetyliertem N-Terminus zeigt im Gegensatz zu vorherigen Ergebnissen bereits eine positive Transfektion zwischen 100 und 300 µM. Dies sind jedoch falsch-positive Messergebnisse, welche durch das Programm hervorgerufen wurden. Eine detaillierte Analyse der Bilder mittels ImageJ zeigt keine transfizierten Zellen, jedoch nicht identifizierbares, fluoreszierendes Material, was die Auswertung mittels CellProfiler® erschwert. Bei einer höheren Konzentration erreicht **33** eine Effizienz von ca. 5%, welche auch durch eine Bildanalyse verifiziert werden konnte. Vektor **39** (Lys₄(GCP)-EDS⁺-Ac), welcher mit dem modifizierten Linker (EDS⁺) funktionalisiert wurde zeigt eine konzentrations-

abhängige Transfektionseffizienz, wobei bei 500 μM in etwa 1% der Zellen transfiziert wurden. Diese Ergebnisse führen jedoch in der rationalen Erklärung der Linker Entwicklung zu einem Problem, da nun der Vektor (**35**) mit einfachem EDS-Linker eine deutlich bessere Einzelleistung zeigt als die „verbesserte“ Variante mit EDS+ (**39**). Die Entwicklung ist zwar im Nachhinein mit den vorliegenden Daten nur schlecht zu begründen, widerlegt die zuvor aufgezeichneten Daten in einer Mischung aus DMSO/H₂O aber nicht. Des Weiteren ist zwar eine nur geringe Transfektionseffizienz nicht grundlegend als positiv zu bewerten, könnte jedoch wie bereits erwähnt förderlich für die gewünschte Zellspezifität sein. Vektor **40** (Lys₄(GCP)-EDS+-Biotin) zeigt bereits eine Transfektion ab 150 μM , welche bei Steigerung der Konzentration auf bis zu 2 – 3% wächst. Diese Ergebnisse im Vergleich zu **39** zeigen eindeutig, dass die Wahl aus Linker und hydrophober Erkennungseinheit einen positiven Effekt auf die Transfektionsleistung hat. Die vollständige Analyse der Toxizitätsprofile jedes einzelnen Vektors sind im Anhang dargestellt. Diese Ergebnisse zur Bewertung der einzelnen Vektoren liefert somit eine neue Grundlage für den Vergleich der einzelnen Systeme.

3.3.2.4 Physikochemische Evaluation der Vorläufermoleküle

Um die starken Unterschiede in den Transfektionseigenschaften von **35** (Lys₄(GCP)-EDS-Ac) und **39** (Lys₄(GCP)-EDS+-Ac) zu erklären, wurden zusätzlich DLS-Messungen durchgeführt, um so in Anlehnung an 3.3.2 einen Unterschied bedingt durch die Probenvorbereitung physikochemisch messbar zu machen. Hierzu wurden die Messungen aus 3.1.2.2 und 3.1.2.4 mit neuen Messungen bei denen die Vektoren aus DMSO zugegeben wurden, verglichen.

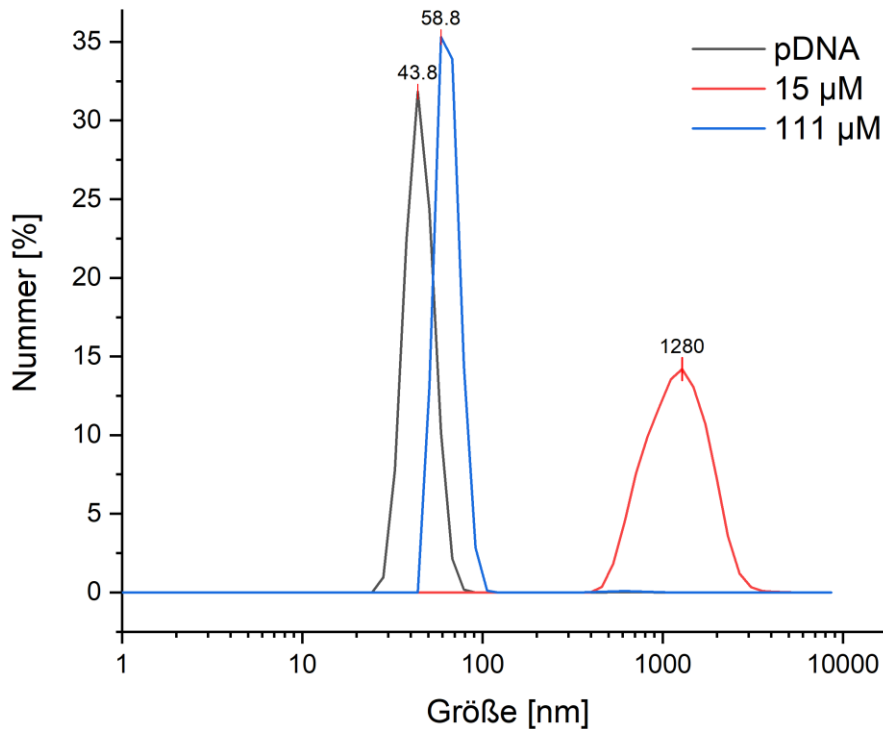


Abbildung 3-28. Darstellung der DLS-Größenverteilung (Zahl) von pDNA (10 µg/mL) mit Vektor 35 (Lys₄(GCP)-EDS-Ac) in den Konzentrationen 15 µM und 111 µM.

Die in **Abbildung 3-28** gezeigten DLS-Profile zeigen das Kondensationsverhalten von 35 (Lys₄(GCP)-EDS-Ac) nach Zugabe zum Plasmid. Hierbei wurde die Probe aus einer Lösung aus DMSO zugegeben und der Verlauf konzentrationsabhängig aufgezeichnet. In diesem Fall weist das genetische Material vor Zugabe eine Größe von ca. 40 nm auf. Wird der Vektor hinzu pipettiert kann bei einer Konzentration von 15 µM eine Größe über 1000 nm beobachtet werden. Bei weiterer Zugabe reduziert sich der hydrodynamische Durchmesser auf ca. 50 nm. Im Vergleich zu der vorherigen Messreihe (3.1.2.2) ist hierbei jedoch keine Veränderung des Kondensationsverhaltens zu beobachten. Sowohl beim Lösen der Probe in DMSO oder DMSO/H₂O ergeben sich ähnliche Werte für die DLS Ergebnisse.

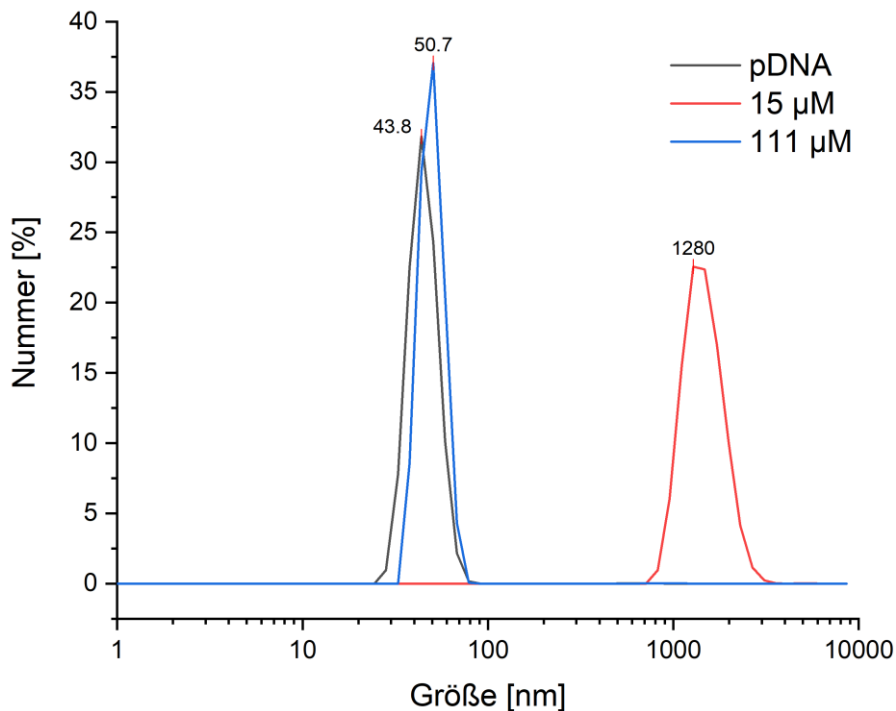


Abbildung 3-29. Darstellung der DLS-Größenverteilung (Zahl) von pDNA (10 µg/mL) mit Vektor **39** (Lys₄(GCP)-EDS⁺-Ac) in den Konzentrationen 15 µM und 111 µM.

Das Kondensationsverhalten von **39** (Lys₄(GCP)-EDS⁺-Ac) wurde ebenfalls erneut auf eine Abhängigkeit vom Lösungsmittel untersucht. Der in **Abbildung 3-29** dargestellte Verlauf der Titration, fasst die Ergebnisse dieser Messungen zusammen. Das Plasmid wird auch in diesem Fall durch eine geringe Konzentration des Vektors vergrößert und erreicht dabei Werte von über 1000 nm. Eine weitere Zugabe des Vektors führt bei einer Konzentration von ca. 100 µM zu einem hydrodynamischen Radius von 51 nm und ist damit in einer ähnlichen Größenordnung wie **35** (Lys₄(GCP)-EDS-Ac). Die so eruierten Ergebnisse zeigen keinen Unterschied zu den zuvor unternommenen Experimenten, bei denen der Vektor aus einer Mischung aus DMSO/H₂O zugegeben wurde. Auch ein Vergleich der Messungen von **35** und **39** zeigt in keinem der getesteten Lösungsmittel einen klaren Unterschied. Da die Kondensation der DNA von beiden Vektoren ähnliche Größen ergibt, muss der Unterschied in der Transfektionsfähigkeit durch andere Faktoren beeinflusst werden.

3.4 Optimierung des Transfektionsprotokolls und abschließende Ergebnisse des zellselektiven Vektors 41

3.4.1 Selektive Transfektion ausgewählter Zelllinien

Das Ziel dieser Arbeit, selektive Transfektion von Krebszellen zu ermöglichen, konnte nun, da alle weiteren Probleme behoben werden konnten, in Angriff genommen werden. Hierzu wurden fünf verschiedene Zelllinien ausgewählt, wobei Zwei eine hohe Zahl an Biotin Rezeptoren (BR) aufweisen und Drei eine Geringe.^[133,141] Als Positivkontrollen wurden A549 und HeLa-Zellen verwendet, wobei HEK293t, CHO und HCT116 als Negativkontrollen dienen sollten. Dieses Vorgehen sollte sicherstellen, dass weitere zelluläre Eigenschaften, welche die Transfektion beeinflussen, minimiert werden.^[87] Die erste weitere Zelllinie, welche als Negativkontrolle dienen sollte, war HEK293t. Auf der Zelloberfläche sind dementsprechend nur wenige Rezeptoren für Biotin vorhanden. Problematisch ist allerdings, dass diese Zelllinie bekannt ist einfach transfiziert werden zu können.^[181] In ersten biologischen Tests (**Abbildung 3-30**) zeigte sich, dass HEK293t Zellen ebenfalls gut mit **41** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Biotin)) transfizieren werden können.

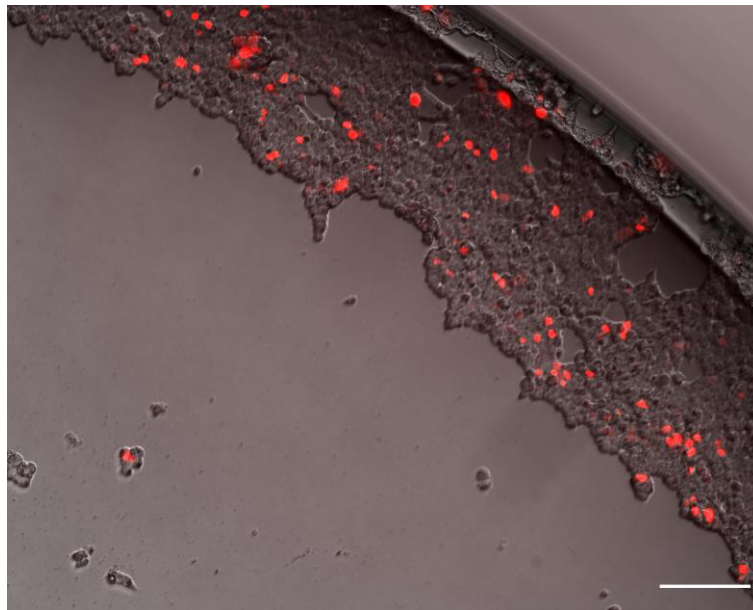


Abbildung 3-30. Fluoreszenzmikroskopie Aufnahme von **41** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Biotin)) an HEK293t Zellen; Konzentration des Vektors: 150 µM, Konzentration Plasmid 0.5 µg; Maßstab 150 µm.

Im nächsten Schritt der Entwicklung wurde die DNA-Menge pro Well verringert, so dass die Positivkontrolle weiterhin eine Expression zeigte und die Negativkontrolle dies nur in einem geringeren Umfang. Die so minimal benötigte DNA-Menge pro Well für eine erfolgreiche Transfektion betrug 0.1 µg pro Well und wurde entsprechend für alle weiteren Tests verwendet.

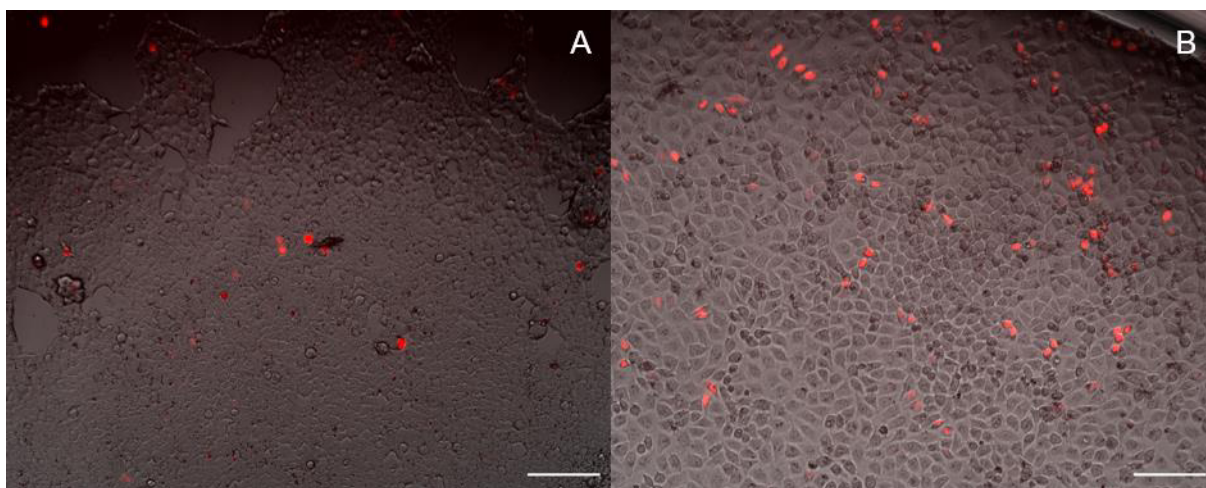
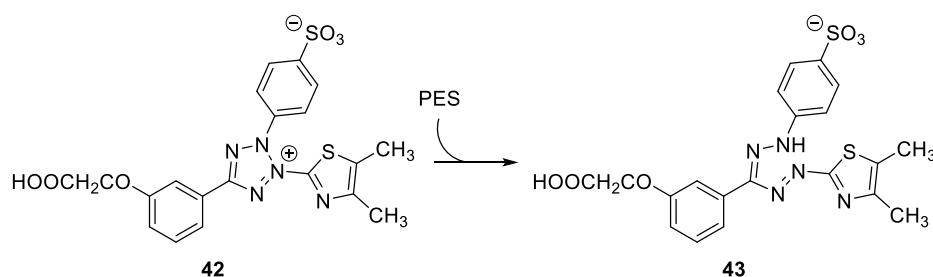


Abbildung 3-31. Fluoreszenzmikroskopie Aufnahmen von **41** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Biotin)) an HEK293t-Zellen (A) und HeLa-Zellen (B); Konzentration des Vektors 150 μ M, Konzentration Plasmid 0.1 μ g; Maßstab 150 μ m.

Eine Anpassung der DNA-Menge pro Well führte in vergleichenden Transfektions-experimenten zu Fluoreszenzaufnahmen (**Abbildung 3-31**) bei denen HEK293t-Zellen (wenig BR; A) deutlich weniger transfiziert wurden als HeLa-Zellen (viel BR; B). Diese vielversprechenden Ergebnisse sollten im Schritt ausgeweitet und verifiziert werden. Allerdings ist zu beachten, dass vor einer Anwendung an allen Zellen, die spezifische Toxizität der Verbindung an den entsprechenden Zelllinien getestet werden sollte, um auszuschließen, dass diese möglicherweise empfindlich auf die Transfektion reagieren. Daher sollten im nächsten Schritt die entsprechenden Daten erhoben werden.

3.4.2 Toxizitätsstudien von **41** an ausgewählten Zelllinien

Neben einer selektiven Transfektion sollte der Vektor nicht zelltoxisch sein, da dies einer Anwendung im Wege stehen würde. Hierzu wurden Toxizitätsmessung von **41** an allen Zelllinien mit Hilfe eines MTS Assays durchführt. Dies ermöglicht ein schnelles Screening, um sicherzustellen, dass weitere Transfektionsexperimente sinnvoll sind. Im Folgenden soll kurz auf die Funktionsweise des Assays eingegangen und die Ergebnisse interpretiert werden.



Schema 3-11. Reaktion des Tetrazoliumkations (**42**) zum Formazan (**43**) mittels PES.

Die in **Schema 3-11** zusammengefasste Reaktion des Toxizitätsassays zeigt die Reduktion des Tetrazoliumkations (**42**, MTS) durch PES (Phenazinethosulfat) zum Formazan **43**. Das verwendete PES ist im Gegensatz zu MTS zellgängig und kann daher durch NADH im Zytoplasma reduziert werden. Im Anschluss reagiert das Tetrazoliumkation zum gelben Formazan (**43**), so dass die NADH Konzentration der Zelle gemessen werden kann. Dies ist wiederum ein Indikator für die Zellviabilität, da tote Zellen keine Umsetzung zum Farbstoff ermöglichen.^[182] Die kolorimetrische Analyse der Absorption ermöglicht so die Bestimmung der Toxizität der Verbindung. Dieses Prinzip wurde auf alle in Frage kommenden Zelllinien angewendet und so eine konzentrationsabhängige Toxizität von **41** ermittelt. Hierzu wurde, wie auch bei der Transfektion, der Vektor mit Plasmid inkubiert und zum Zellmedium gegeben, um einen möglichst genauen Vergleich zwischen den beiden unterschiedlichen Tests zu gewährleisten. Jede einzelne Konzentration wurde als Triplikat vermessen und so eine Bestimmung des statistischen Fehlers ermöglicht.

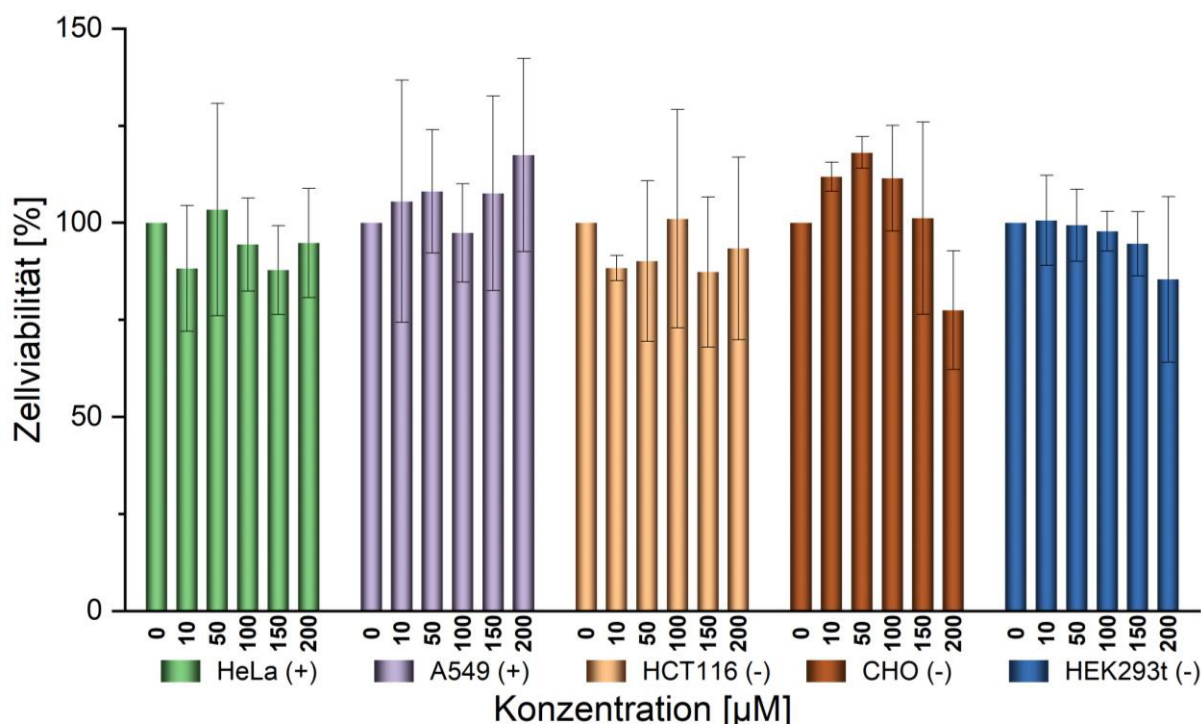


Abbildung 3-32. Balkendiagramm der Toxizitätsstudien zu **41** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Biotin)) an fünf verschiedenen Zelllinien; (+) und (-) stellen eine qualitative Beschreibung der Biotinrezeptordichte auf der Zelloberfläche dar.

Das in **Abbildung 3-32** gezeigte Balkendiagramm fasst die ermittelten Toxizitätsdaten von **41** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Biotin)) an fünf Zelllinien zusammen. Auf der y-Achse ist die relative Zell Viabilität in Prozent aufgetragen, welche nach der Normierung durch eine Mediumkontrolle ermittelt wurde. Die x-Achse zeigt die verschiedenen Konzentrationen in denen der Vektor getestet wurde, wobei die eingesetzte DNA Menge konstant bei 0.1 µg pro Well gehalten wurde. Die gewählten Farben kodieren für die jeweilige Zelllinie, welche in der Legende gezeigt sind. Eine Beschreibung der Biotinrezeptordichte wurde mit Hilfe der

qualitativen Beschreibung mittels (+) und (-) vorgenommen.^[133,141] Die Kontrollen, bei denen kein Vektor zum Medium gegeben wurde, wurden als 100%ige Überlebensrate gesetzt. Eine Erhöhung der Zellviabilität auf über 100% ist somit möglich, wenn mehr Formazan gebildet wurde als ohne Zugabe des Vektors. Deutlich zu erkennen ist, dass der Vektor an keiner der verwendeten Zellen eine hohe Toxizität zeigt, da die Überlebensrate nicht unter 75% fällt. Bei einer finalen Konzentration von 200 μM zeigen CHO Zellen jedoch eine geringe Toxizität, wobei diese mit einem Wert von 75% angegeben werden kann. Da alle Transfektionen jedoch bei einer Konzentration von 150 μM durchgeführt wurden ist dies als unbedenklich einzustufen.

Sowohl durch die Daten aus Transfektionsexperimenten und Toxizitätsstudien, als auch durch die Charakterisierung physikochemischer Eigenschaften (3.3.2) konnten die vielversprechenden Ergebnisse im Bezug auf eine Biotinrezeptor abhängige Aufnahme von **41** bestätigen. Der alleinige Vergleich zweier unterschiedlichen Zelllinien reicht in diesem Fall allerdings nicht aus, da durch die grundlegenden Unterschiede zwischen Diesen ein Vergleich nicht immer gewährleistet werden kann.^[87]

3.4.3 Ausweitung der Transfektionsexperimente

Um die Hypothese einer spezifischen Aufnahme von **41** ($\text{Lys}_4(\text{GCP})\text{-EDS+}\text{-Lys}(\text{Biotin})$) an ausgewählte Zelllinien zu belegen, wurden weitere Zellexperimente vorgenommen. Hierbei wurde der Vektor mit dem literaturbekannten Polyethylenimin (PEI) verglichen. Neben einer hohen Transfektionseffizienz, wird PEI über das Endosom in die Zelle aufgenommen.^[76,183] Es wurde vermutet, dass Vektor **41** dem gleichen Aufnahmemechanismus folgt, da auch der publizierte Vektor (**12**, $\text{Lys}_4(\text{GCP})\text{-NH}_2$) von Li *et al.* über das Endosom in die Zielzelle aufgenommen wurde.^[104] Diese Vermutung konnte durch Transfektionsexperimente mit Bafilomycin A bestätigt werden, was eine endosomale Aufnahme des Vektors verhindert.^[184] Ebenso sollte das Polymer keine Präferenz für Zellen in Abhängigkeit der Biotinrezeptordichte aufweisen. Die unternommenen Transfektionsexperimente vom Vektor und PEI werden zur besseren Veranschaulichung der Ergebnisse in einer Heatmap dargestellt, um die Effizienz durch einen Farbgradienten darzustellen.

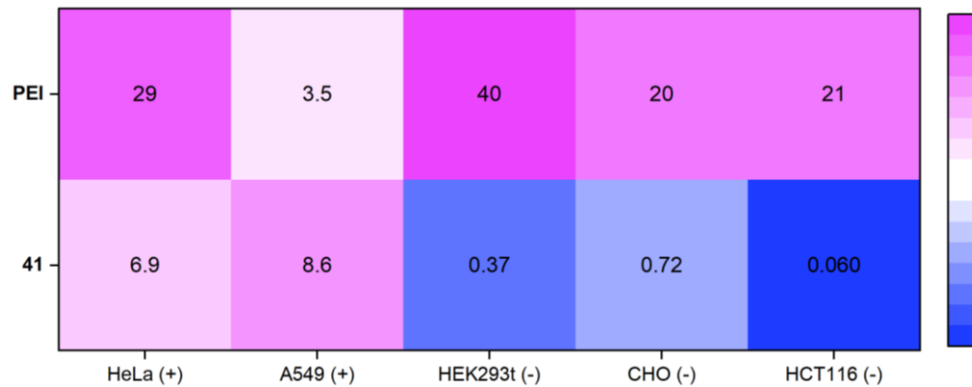


Abbildung 3-33. Zusammenfassung der Transfektionsergebnisse von **41** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Biotin)) im Vergleich zu PEI an unterschiedlichen Zelllinien; Konzentration des Vektors 150 µM, Konzentration Plasmid 0.1 µg; (+) und (-) stellen eine qualitative Beschreibung der Biotinrezeptordichte auf der Zelloberfläche dar.

Die in **Abbildung 3-33** dargestellte Heatmap zeigt in den Zeilen die eingesetzten Vektoren und in den Spalten die verschiedenen Zelllinien. Eine qualitative Beschreibung der Biotinrezeptordichte ist durch ein (+) und (-) gekennzeichnet.^[133,141] Beginnend in Zeile 1 sind die Transfektionseffizienzen von PEI darstellt, welche unabhängig von den Zelllinien, über 20% liegen. Dies wird allerdings durch eine nur geringe Effizienz bei A549 Zellen unterbrochen. In der zweiten Zeile zeigen die Effizienzen von **41** eine starke Präferenz für die Transfektion von Zelllinien mit einer hohen Biotinrezeptordichte. Hierbei fällt ein deutlicher Unterschied auch zwischen der PEI-Kontrolle und dem zellspezifischen Vektor auf, da dieser A549 Zellen deutlich besser transfiziert als das Polykation. Die so ermittelten Ergebnisse zeigen deutlich, dass **41** Zellen mit einer hohen Expression des Rezeptors besser transfiziert als Zellen mit Geringer. Die ermittelten Unterschiede in der Transfektionseffizienz zwischen den verschiedenen Zelllinien reichen allerdings für eine genaue Betrachtung noch nicht aus, weshalb ein „Competition-Assay“ mit Biotin unternommen wurde.

3.4.4 Bestätigung für eine Biotin Rezeptor abhängige Aufnahme

Ein Beleg für eine Beteiligung von Biotin Rezeptoren auf die Transfektionseigenschaften des Vektors **41** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Biotin)) an HeLa Zellen könnte ebenfalls durch ein Kompetitions-Assay mit freiem Biotin im Zellmedium unternommen werden. Hierzu wurden die Zellen im Gegensatz zu vorherigen Versuchen zuvor mit unterschiedlichen Konzentrationen von Biotin-FITC (**Abbildung 3-34, 44**) versetzt und inkubiert. Anschließend wurde der Vektor in doppelter Konzentration, sowie mit der doppelten Menge des bekannten Plasmids zu den Zellen gegeben. Dies sollte einen besseren Unterschied in der Transfektionseffizienz deutlich machen, da so eine Schwankung der Effizienz deutlich weniger ins Gewicht fallen sollte.

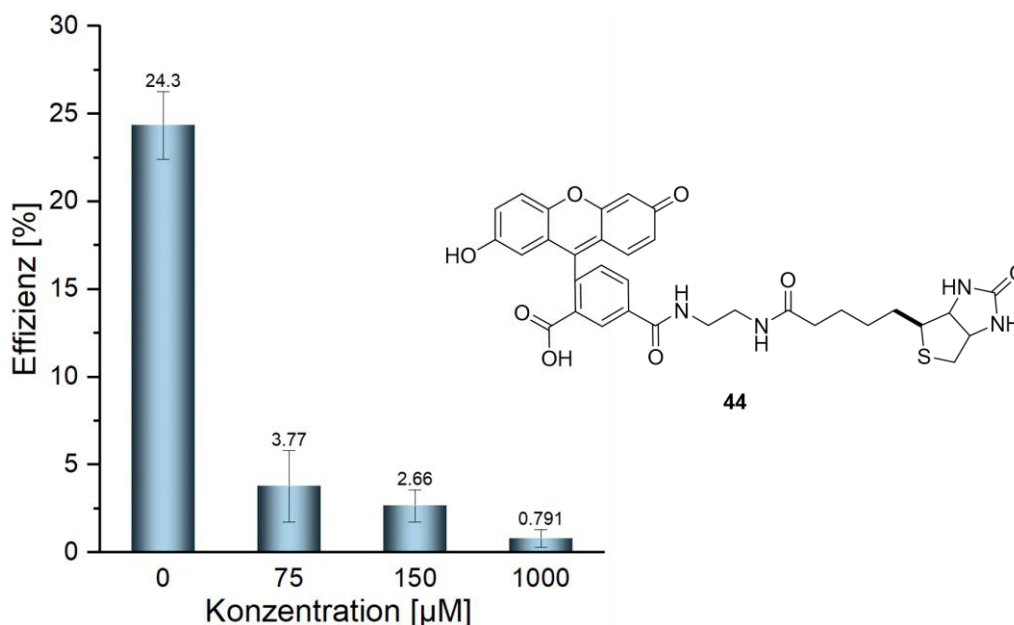
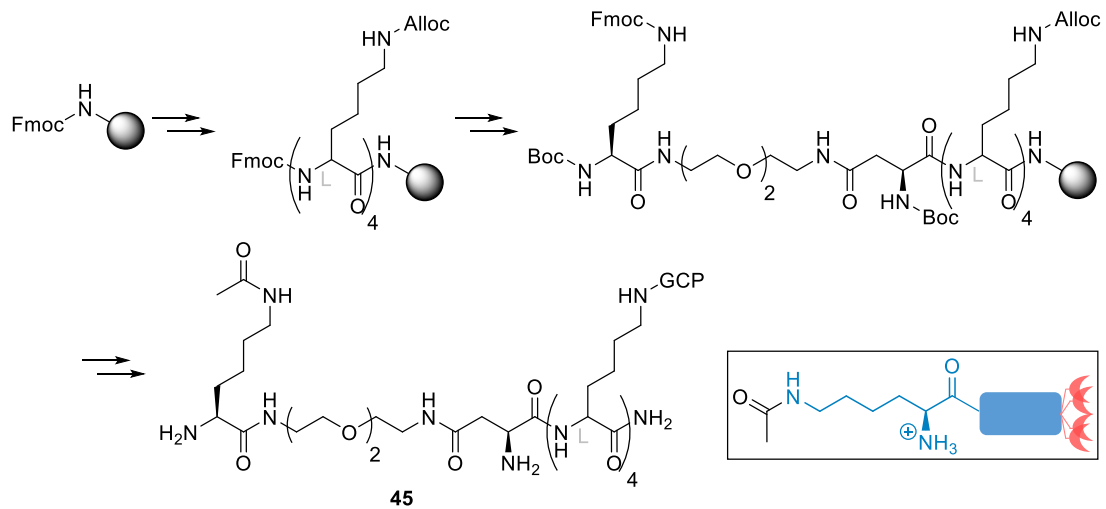


Abbildung 3-34. Balkendiagramm der Transfektionseffizienz von **41** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Biotin)) an HeLa-Zellen bei unterschiedlichen Biotin-Konzentrationen im Zellmedium; Konzentration des Vektors 300 µM, Konzentration Plasmid 0.2 µg.

In **Abbildung 3-34** ist die Transfektionseffizienz des Vektors **41** an HeLa-Zellen in Abhängigkeit von der Biotin-Konzentration gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Vektor ohne Zugabe des Vitamins eine Effizienz von 24% aufweist. Bereits bei einer Endkonzentration von 75 µM Biotin im Zellmedium fällt diese stark auf ca. 4% ab. Eine weitere Erhöhung der Konzentration führt zu einer signifikanten Abnahme der Transfektionseffizienz. Diese Experimente zeigen, dass eine Interaktion zwischen Vektor und den Biotinrezeptoren zu Grunde liegt. Ein weiterer Beleg könnte durch die Verwendung einer chemischen Negativkontrolle gefunden werden, bei dem das Vitamin durch eine nicht bindende, funktionelle Gruppe ersetzt wird.

3.4.5 Synthese der Negativkontrolle 45

Da die vorherigen Ergebnisse eine Aufnahme des Vektors über die Biotinrezeptoren nahelegten, sollte die Negativkontrolle kein Biotin aufweisen. Des Weiteren ist aus der Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehung (3.1.2) deutlich hervorgegangen, dass eine, auch nur minimale strukturelle Veränderungen (z.B. Anzahl der Ladungen), einen großen Einfluss auf die Transfektionsergebnisse haben kann. Somit sollte eine Negativkontrolle weder weitere positive Ladungen aufweisen, noch eine veränderte Distanz zwischen DNA-Bindungseinheit und dem N-Terminus vorliegen. Um dies zu erreichen, wurde anstatt Biotin, die Seitenkette des Lysins mit Essigsäureanhydrid acetyliert.



Schema 3-12. Zusammenfassung der Festphasenpeptidsynthese von **45** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Ac)).

Hierzu wurde ein Fmoc-Rink-Amid Harz verwendet, wobei die Synthese (**Schema 3-12**) von **45** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Ac)) ausschließlich mittels mikrowellengestützter Festphasenpeptidsynthese umgesetzt werden konnte, da keine oxidationsempfindlichen Bestandteile vorliegen. Nach erfolgreicher Synthese konnte das Produkt mittels präparativer HPLC (35% MeOH+0.1% TFA) isoliert und in einer Reinheit von 93% als das Salz der Trifluoressigsäure erhalten werden. Nach Identifikation des Produktes mittels ESI-MS wurden vergleichende biologische Versuche unternommen, um die zuvor aufgestellte Hypothese der Biotin Rezeptor abhängigen Transfektion zu bestätigen.

3.4.6 Erste Transfektionsergebnisse von 45

Ein Vergleich der beiden Vektoren (**41** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Biotin)) und **45** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Ac)) sollte vor allem sichtbar werden, wenn die gleichen Zelllinien in beiden Experimenten verwendet werden. Somit wurden Transfektionsexperimente an HEK293t und HeLa-Zellen nach dem bereits beschriebenen Schema durchgeführt.

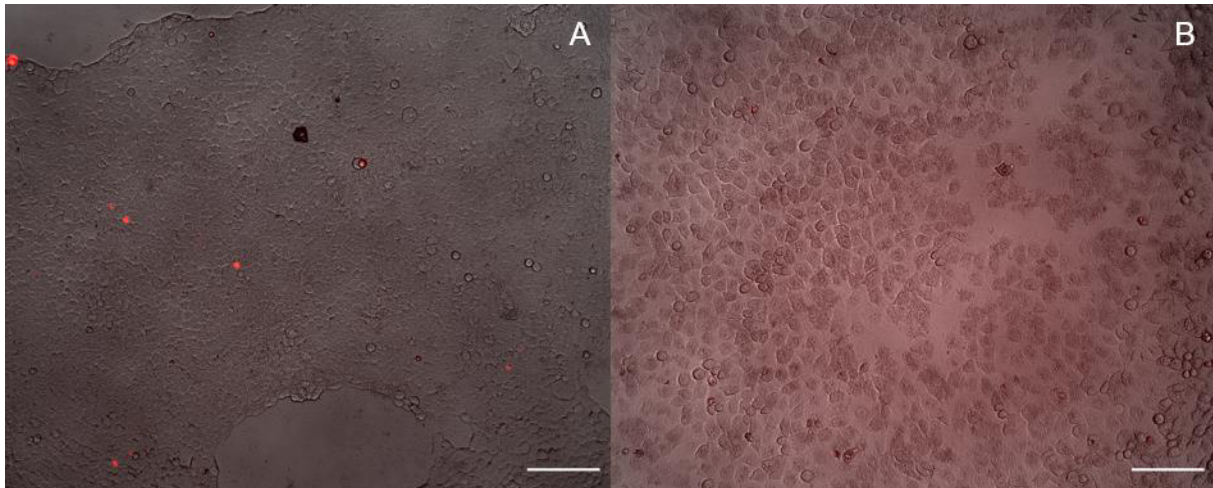


Abbildung 3-35 Fluoreszenzmikroskopie Aufnahmen von **45** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Ac)) an HEK293t-Zellen (A) und HeLa-Zellen (B); Konzentration des Vektors 150 μ M, Konzentration Plasmid 0.1 μ g; Maßstab 150 μ m.

Die in **Abbildung 3-35** dargestellten Mikroskopiebilder zeigen auf der linken Seite (A) die Transfektion von wenigen HEK293t Zellen (wenig BR, A). Im starken Gegensatz dazu lassen sich HeLa Zellen (viel BR, B) mit **45** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Ac)) nicht transfizieren.^[141] Die rote Färbung ist durch eine Erhöhung des Kontrastes bedingt und spricht nicht für eine erfolgreiche Transfektion des Zellkerns. Um auszuschließen, dass diese Ergebnisse allein durch eine zu geringe Konzentration des Vektors bedingt ist wurden Experimente bis zu einer finalen Konzentration von 600 μ M an HeLa Zellen durchgeführt, welche jedoch nach Mikroskopie ebenfalls keine erfolgreiche Transfektion zeigten. Hierdurch wird bereits jetzt schon der deutliche Einfluss des Biotins erkennbar, da selbst diese Erhöhung nicht zu einer erfolgreichen Transfektion führt. Um Sicherzustellen, dass der Vektor in der Lage ist DNA erfolgreich zu Kondensieren und einen besseren Vergleich zur Positivkontrolle zu schaffen, wurden physikochemische Messungen hierzu durchgeführt.

3.4.7 Vergleich physikochemischer Eigenschaften

3.4.7.1 Kondensationsverhalten von 45

Um sicherzustellen, dass **45** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Ac)) in der Lage ist pDNA zu kondensieren wurden konzentrationsabhängige DLS-Messungen durchgeführt. Hierzu wurde das Plasmid in H₂O gelöst und anschließend mit Aliquoten von **45** in DMSO (50 mM) versetzt.

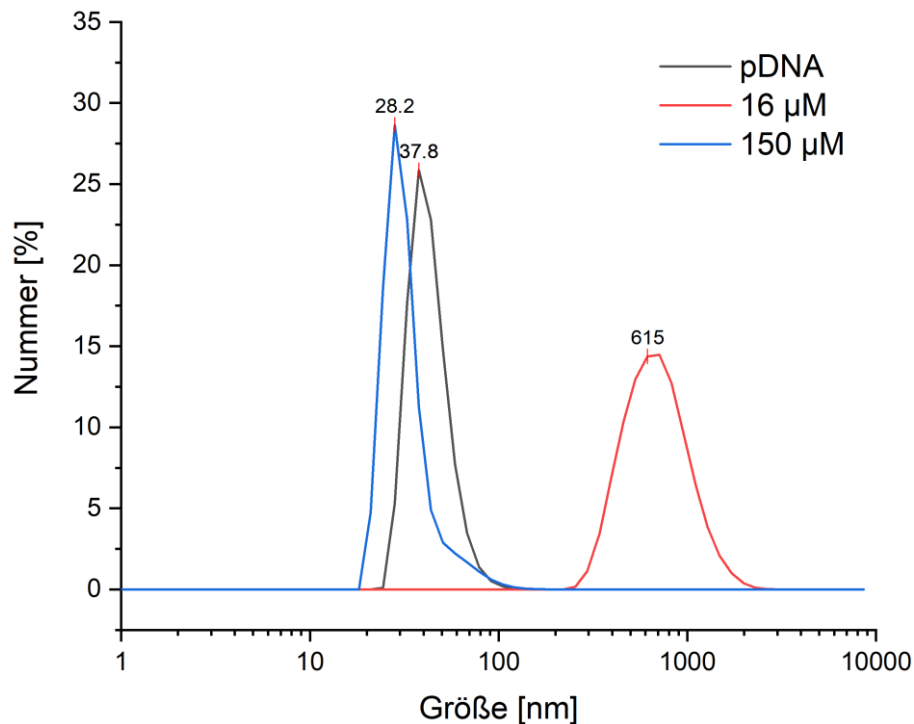


Abbildung 3-36. Darstellung der DLS-Größenverteilung (Nummer) von pDNA (10 µg/mL) mit Vektor **45** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Ac)) in den Konzentrationen 16 µM und 150 µM.

Die in **Abbildung 3-36** gezeigten DLS-Daten von Vektor **45** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Ac)) wurden in den gleichen Konzentrationsreihen durchgeführt, wie bereits für die Positivkontrolle (**41**, Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Biotin)), **Abbildung 3-20**, um so einen möglichst nahen Vergleich zu erhalten. Zu beobachten ist, dass die DNA selbst eine Größe von ca. 40 nm aufweist. Durch Zugabe des Vektors wird eine Größe von durchschnittlich 600 nm gemessen, welche bei einer Konzentration von 150 µM Werte von 28 nm annimmt. Dieser Wert ist zum ersten Mal sogar kleiner als das genetische Material selbst und steht im deutlichen Kontrast zu den Messungen der Positivkontrolle. Hier konnten bei gleicher Konzentration ein hydrodynamischer Radius von minimal 100 nm gemessen werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass **45** in Kombination dem Plasmid kleinere Partikel bildet als **41**, jedoch selbst bei erhöhter Konzentration keine Zellen transfizieren kann. Da die gleiche Anzahl an positiven Ladungen wie bereits zuvor unter physiologischen Bedingungen vorliegen, sollte das endosomale Entkommen des Vektors weiterhin möglich sein. Somit

könnte entweder die Aufnahme des Vektors in die Zelle oder der Transport zum Zellkern ein mögliches Hindernis darstellen.

3.4.7.2 Bestimmung der mittleren, effektiven Konzentration (EC_{50})

Eine qualitative Beschreibung der Bindungsstärke von **41** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Biotin)) und **45** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Ac)) ist mit Hilfe eines Ethidiumbromid-Verdrängungsassays möglich. Sollte die Negativkontrolle also schlechter DNA binden als die Positivkontrolle, könnte dies ein Hinweis für die unterschiedlichen Ergebnisse in den bisherigen biologischen Experimenten sein. Im Gegensatz zu den in **Abbildung 3-5** (3.1.1.2) unternommenen Versuchen wurde in diesem Fall die ctDNA gegen das Plasmid, welches auch für die Transfektion verwendet wurde, getauscht. Hierzu wurde eine Lösung aus Ethidiumbromid (2.0 μ M in H₂O) verdünnt und mittels Fluoreszenzspektroskopie vermessen (Exc.: 520 nm). Nach Zugabe des genetischen Materials (0.02 μ g/mL) und erneuter Messung, konnte dann eine Titration mit den jeweiligen Vektoren durchgeführt werden.^[185]

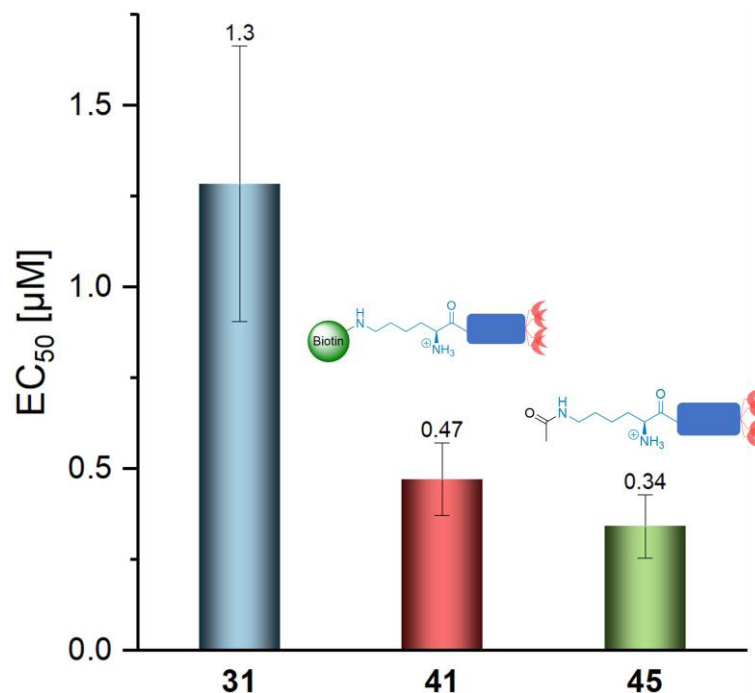


Abbildung 3-37. Zusammenfassung der Ethidiumbromid-Verdrängungsassays der zwei finalen Vektoren (**41** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Biotin)) und **45** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Ac))) und des ursprünglichen Prototyps.

Die Ergebnisse der EB-Verdrängungsassays sind in **Abbildung 3-37** dargestellt. Auf der y-Achse ist der berechnete EC_{50} -Wert abgebildet, der angibt, ab welcher Konzentration die Hälfte des Interkalators aus den Basenstapeln verdrängt wurde. Die x-Achse zeigt drei Vektoren, wobei **31** (Lys₄(GCP)-EDS-Biotin(sulfoxid)) aus Gründen der Übersicht ebenfalls dargestellt wurde. Da für diese Messreihe ctDNA verwendet wurde im Gegensatz zu dem Plasmid, sollte der Wert nicht als absolut angesehen werden. Für die Positivkontrolle **41**

(Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Biotin)) konnte ein Wert von 0.47 μ M ermittelt werden, welcher im Kontrast zu der Negativkontrolle **45** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Ac)) mit einem Wert von 0.34 μ M steht. Der ermittelte Wert von Li *et al.* von 0.85 μ M von **12** (Lys₄(GCP)-NH₂) weicht zwar deutlich ab, liegt jedoch ebenfalls in einer ähnlichen Größenordnung. Die gezeigten Messwerte liefern des Weiteren keine Erklärung dafür, dass **45** keine der getesteten Zellen transfiziert. Mit Hilfe all dieser Messungen konnte kein grundlegender, physikochemischer Unterschied zwischen dem Bindungsverhalten von **41** und **45** festgestellt werden. Um sicher zu stellen, dass der synthetisierte Vektor des Weiteren nicht zelltoxisch ist wurden Assays durchgeführt, um dies zu belegen.

3.4.8 Ermittlung der Toxizität von 45

Die Bestimmung der Transfektionseffizienz der Negativkontrolle (**45**, Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Ac)) zeigte, dass nur wenige Zellen transfiziert werden konnten. Diese Ergebnisse können zum einen durch eine schlechte Aufnahme in die Zelle oder aber durch eine hohe Toxizität des Vektors ausgelöst werden. Aus diesem Grund wurden Toxizitätsuntersuchungen an HeLa Zellen durchgeführt, um den Einfluss des Vektors auf die Zellviabilität zu quantifizieren.

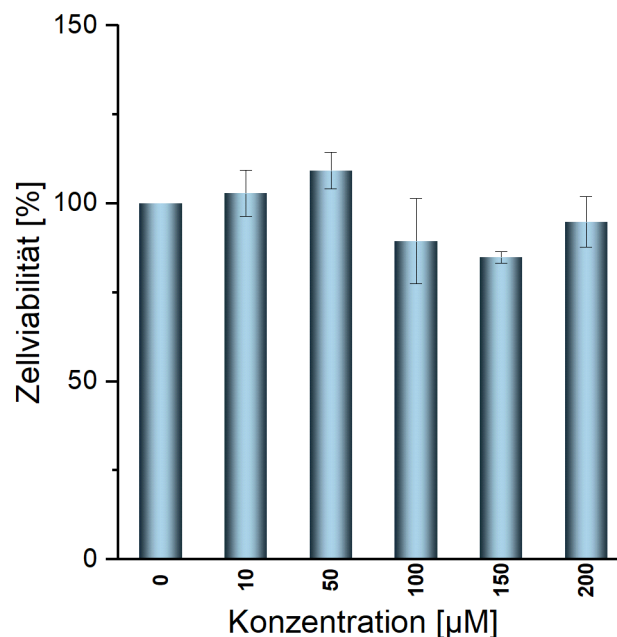


Abbildung 3-38. Balkendiagramm der Toxizitätsstudien zu **45** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Ac)) an HeLa Zellen in fünf verschiedenen Konzentrationen.

Wie in **Abbildung 3-38** gezeigt, verursacht **45** bei keiner der gemessenen Konzentrationen eine Abnahme der Zellviabilität an HeLa Zellen. Weitere toxikologische Untersuchungen wurden zu diesem Vektor nicht durchgeführt. Allerdings kann auch durch mikroskopische Untersuchungen eine qualitative Bewertung der Zelltoxizität ermittelt werden. Hierbei werden die Form und das Wachstum der Zellen beurteilt, da zwischen lebenden und toten Zellen ein

signifikanter, optischer Unterschied besteht. Tote Zellen erscheinen rund, wobei lebende Zellen eine definierte Form haben. Die Auswertung der Mikroskopiebilder des Vektors an allen Zelllinien, sowie bei höheren Konzentrationen (bis zu 600 μM) zeigten, dass der Vektor nicht toxisch ist. Die Negativkontrolle scheint dementsprechend entweder nicht in die Zelle aufgenommen zu werden oder nicht die Transfektion des Zellkerns zu ermöglichen. Der Vergleich der Transfektionseffizienzen zwischen **41** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Biotin)) und **45** an allen Zelllinien sollte für einen optimalen Vergleich der beiden Vektoren sorgen.

3.4.9 Gesamte Transfektionsergebnisse von **41** und **45**

Zum präzisen Vergleich zwischen **41** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Biotin)), 3.4.1) und **45** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Ac)) wurden die gleichen Zelllinien verwendet wie zuvor und keine weitere Veränderung des Transfektionsprotokolls vorgenommen. Die Auftragung der Effizienz mit Hilfe einer Heatmap macht die direkte Korrelation zwischen dem klassischen Vektor PEI, dem in dieser Arbeit entwickelten Biocytin-Konjugierten Vektor **41** und der Negativkontrolle **45** offensichtlich.

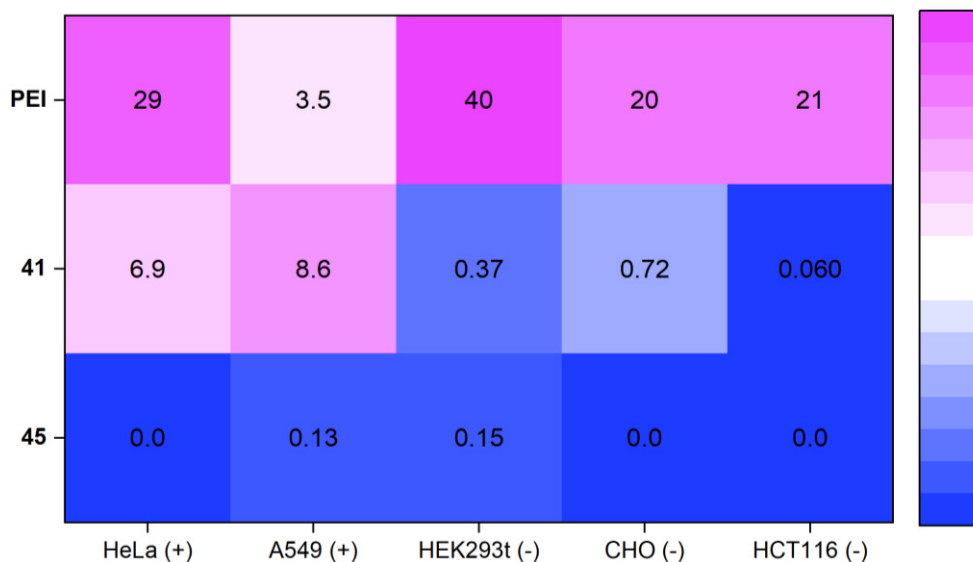


Abbildung 3-39. Zusammenfassung der Transfektionseffizienzen von **41** (Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Biotin)) im Vergleich zur Negativkontrolle (**45**, Lys₄(GCP)-EDS+-Lys(Ac)) und PEI an verschiedenen Zelllinien; Konzentration der beiden Vektoren: 150 μM , Konzentration Plasmid 0.1 μg ; (+) und (-) stellen eine qualitative Beschreibung der Biotinrezeptordichte auf der Zelloberfläche dar.

Wie in **Abbildung 3-39** dargestellt zeigt **45** bei keiner der getesteten Zelllinien eine erfolgreiche Transfektion. Selbst bei den als leicht zu transfizierend geltenden 293t Zellen konnten keine positiven Ergebnisse bei einer Konzentration von 150 μM beobachtet werden.^[181] Dies ist besonders Auffällig, da dies die Wirkung des Biotinlabels deutlich hervorhebt. Allerdings konnte hierbei der hydrophobe Charakter des Labels nicht dargestellt werden, was in weiteren Experimenten verbessert werden könnte. Dies wurde allerdings aus Zeitgründen nicht weiter verfolgt. Aus der Kombination der chemischen und biologischen

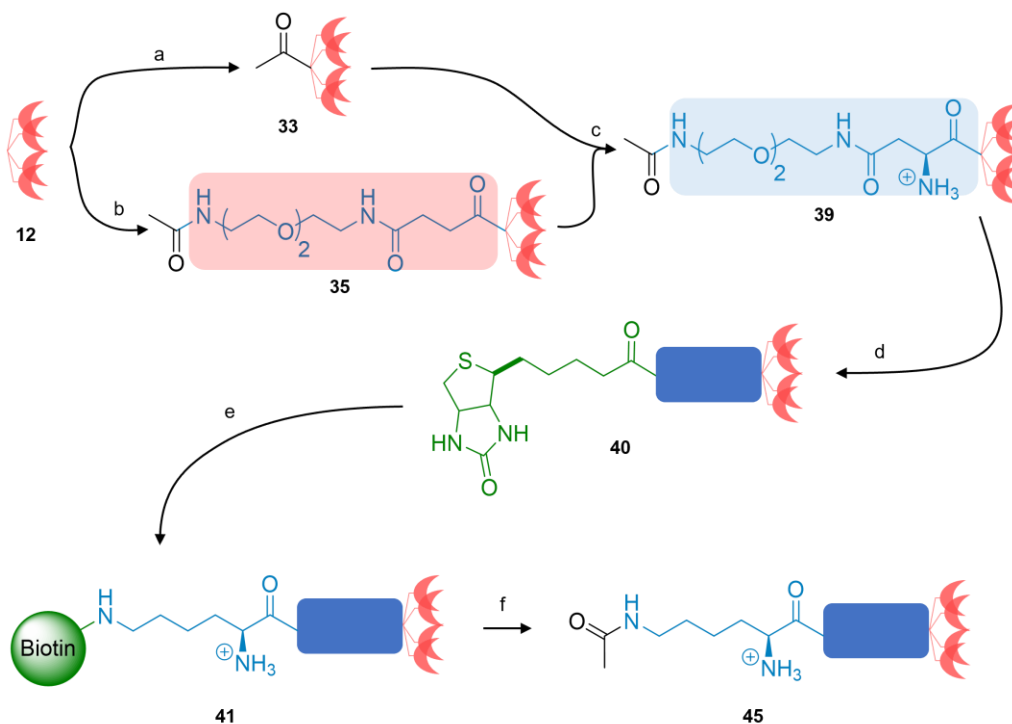
Positiv- und Negativkontrollen lässt sich eine deutliche Präferenz von Vektor **41** zu BR+ Zelllinien ableiten. Besonders auffällige ist hierbei erneut, dass HEK293t Zellen nur mit einer geringen Transfektionseffizienz transfiziert wurden. Wird die erreichte Effizienz von A549 Zellen betrachtet, fällt auf, dass der kommerzielle Vektor hier deutlich abfällt. Im Gegensatz dazu erreicht **41** hier die maximale Transfektionseffizienz. Die Signifikanz dieser Ergebnisse legt ein weiteres Mal die starke Bedeutung des Biotins dar. Die Resultate aus diesen Experimenten weisen einen deutlichen Einfluss des Biotins auf die Transfektionsergebnisse nach und sind somit ein signifikanter Schritt in Richtung Rezeptor abhängiger Transfektion.

3.4.10 Fazit

Ziel dieses Projektes war die selektive Transfektion spezifischer Zelllinien, welche sich durch die Konzentration eines Membrantransporters unterscheiden. Das hierzu ausgewählte Biotin wurde nach sorgfältigen Vorversuchen an den potenten DNA-Binder Tetralysin-TetraGCP (**12**, Lys₄(GCP)-NH₂) gekuppelt. Die Vorläufermoleküle wurden auf zwei Kriterien hin untersucht und bewertet. Dies waren die minimal benötigte Konzentration (c_{\min}) für eine erfolgreiche Transfektion und die Transfektionseffizienz welche durch Fluoreszenzmikroskopie ermittelt wurde. Die dabei entwickelte Linkereinheit wurde durch eine Analyse von Struktur-Wirkungsbeziehungen designt und in der Festphasenpeptidsynthese erfolgreich eingesetzt. Sie ermöglichte, durch eine zusätzliche positive Ladung, die erfolgreiche Transfektion der Zielzellen. Eine Anpassung der Probenvorbereitung ermöglichte reproduzierbare Ergebnisse, wobei der Vektor aus einer Lösung in DMSO zur DNA gegeben wurden. Die Verringerung der Plasmid-Menge pro Well stellte die Transfektion der Positivkontrollen sicher, wobei die Negativkontrollen nur zu einem geringen Teil transfiziert wurden. Die Berechnung der Transfektionseffizienzen erfolgte mit Hilfe von Computergestützter Bildanalysen mittels CellProfiler®. Die Resultate aus den biologischen Experimenten mit **41** legen eine Biotinrezeptor-abhängige Aufnahme in die jeweiligen Zellen nahe. Unter den fünf miteinander verglichenen Zelllinien konnten Zwei mit hoher Rezeptordichte mit einer Effizienz von bis 9% erfolgreich transfiziert werden. Bei den drei Negativkontrollen konnte im Gegensatz dazu maximal eine Effizienz von 0.7% bestimmt werden. Dieser Vergleich zeigt bereits eine deutliche Tendenz für spezifisch ausgewählte Zelllinien. Ein weiterer Beleg für die spezifische Transfektion konnte durch ein Kompetitions-Assay mit freiem Biotin im Zellmedium erreicht werden. Hierbei wurde die Transfektionseffizienz durch die Zugabe des Vitamins deutlich verringert. Um die somit aufgestellte These, dass eine zellspezifische Transfektion vorliegt, zu untermauern, wurde ebenfalls eine chemische Negativkontrolle synthetisiert, welche kein bioaktives Label trug. Vektor **45** zeigte in dem getesteten Konzentrationsbereich nur eine geringe Transfektion an den ausgewählten Zelllinien. Durch physikochemische Messungen konnte ein ähnliches Bindungsverhalten der beiden Vektoren zur DNA ermittelt werden. Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass durch die Wahl eines potenten DNA-Bindungsmotivs in Kombination mit einem bioaktiven Label eine rezeptorabhängige Transfektion erreicht werden konnte.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Die im Hauptteil dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse sollen in diesem Teil der Arbeit zusammengefasst und mit den, in der Aufgabenstellung geplanten Zielen, verglichen werden. Im Rahmen der Dissertation wurde ein neuer, zellselektiver Transfektionsvektor auf Grundlage des GCP-Bindungsmotives entwickelt. Dieser sollte aus dem Tetralysin-GCP Motiv **12** und einer Zellerkennungseinheit bestehen. Zu Beginn wurde daher eine Struktur-Wirkungsbeziehungsanalyse durchgeführt, um eine rationale Erklärungsgrundlage für kommende Ergebnisse zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurde die Gesamtladung von **12** ($\text{Lys}_4(\text{GCP})\text{-NH}_2$, **Schema 4-1**) durch Acetylierung des *N*-Terminus um eins reduziert (**33**, $\text{Lys}_4(\text{GCP})\text{-Ac}$, a)). Dies führte zu einer Verschlechterung der Transfektionsergebnisse welche an HeLa-Zellen erzielt werden konnte. Durch das Anbringen einer hydrophilen Linker-Einheit, welche einer schlechten Wasserlöslichkeit von Labeln entgegenwirken sollte, wurde ein zweiter Prototyp (**35**, $\text{Lys}_4(\text{GCP})\text{-EDS-Ac}$, b)) entwickelt. Dieser Vektor zeigte in biologischen Experimenten eine weitere Verschlechterung der Ergebnisse. Somit wurde geschlussfolgert, dass sowohl der Linker als auch die Anzahl positiver Ladungen entscheidend für die Transfektionsleistung eines Vektors sind.



Schema 4-1. Zusammenfassung der Ergebnisse der Strukturentwicklung des Vektors auf Basis des GCP-Anionenbinders und der Aminosäure Lysin; a) Verringerung der positiven Ladungen, b) Verwendung eines hydrophilen Linkers, c) Verwendung eines hydrophilen Linkers mit zusätzlicher positiver Ladung, d) Anbringen eines des Labels Biotin an optimierten Linker, e) Verwendung von Biocytin zur Verbesserung der Löslichkeit, f) Synthese der Negativkontrolle ohne das zellspezifische Label.

Deshalb wurde eine neue Linkereinheit entwickelt, welche eine positive Ladung enthält. Der damit synthetisierte Vektor (**39**, Lys₄(GCP)-EDS(+)-Ac, c)) zeigte bereits eine Verbesserung in biologischen Messungen, wodurch die These bestätigt werden konnte. Auf Grundlage dieses optimierten Linkerdesigns wurde der Vektor mit Biotin funktionalisiert. Dieses Vitamin wurde als sinnvolles Label angesehen, da es keine zusätzlichen Ladungen enthält und leicht synthetisch einzusetzen ist. Das Produkt der Synthese (**40**, Lys₄(GCP)-EDS(+)-Biotin, d)) zeigte allerdings keine erfolgreiche Transfektion von HeLa Zellen. Eine mögliche Ursache könnte die schlechte Löslichkeit in wässrigem Medium sein. Aus diesem Grund wurde versucht durch Kombination von **39** (Lys₄(GCP)-EDS(+)-Ac) mit **40** (Lys₄(GCP)-EDS(+)-Biotin) Mischungen herzustellen, welche sowohl gut in Wasser löslich sind aber auch eine Transfektion ermöglichen. Dieser Weg führte allerdings auch nicht zum Erfolg. Somit wurde Biotin, mit der Aminosäure Lysin modifiziert. Dieses Konjugat wird als Biocytin bezeichnet und findet breite Anwendung in biologischen Experimenten.^[175,176] Ein darauf basierenden Vektor (**41**, Lys₄(GCP)-EDS(+)-Lys(Biotin), e)) wurde synthetisiert und zeigte in ersten biologischen Tests vielversprechende Eigenschaften. Hierzu zählen eine Transfektion bei einer Konzentration von 150 µM und eine gute Effizienz, welche zu Beginn aus den Fluoreszenzbildern abgeschätzt wurde. An diesem Punkt wurde die Analyse von Struktur-Wirkungsbeziehungen beendet, um sich der Optimierung der Transfektionsresultate zu widmen. Somit wurde ein erstes wichtiges Teilziel der Arbeit erreicht, bei dem eine Struktur-Wirkungsbeziehungsanalyse eingesetzt werden sollte, um ein besseres Verständnis über die molekularen Eigenschaften des Vektors zu erlangen. Wichtige Erkenntnisse sind, dass die Anzahl der positiven Ladungen nicht kleiner als vier sein sollte. Des Weiteren sind jegliche Änderungen des Systems, durch z.B. Linker vorsichtig zu bewerten, da diese einen großen Einfluss auf die biologische Wirkung haben. Physikochemische Messungen lieferten keine Evaluationsgrundlage für die Fähigkeit des Vektors Zellen zu transfizieren. Auch positive Ergebnisse geben keine Garantie für eine erfolgreiche Transfektion.

Im darauf folgenden Teil der Arbeit wurde der zellselektive Charakter des Vektors **41** (Lys₄(GCP)-EDS(+)-Lys(Biotin)) untersucht. Nach anfänglich positiven Ergebnissen wurde allerdings eine schlechte Reproduzierbarkeit beobachtet. Diese Problematik wurde nach einigen Versuchen auf die Lösung des Vektors in wässrigen Lösungsmitteln zurückgeführt. Durch die Verwendung von hohen Konzentration von **41** in DMSO konnte die ursprünglichen Ergebnisse reproduziert werden. Im Gegensatz zu vorherigen Transfektionsexperimenten wurde ab diesem Punkt die Effizienz mit Hilfe von CellProfiler[®] ausgewertet. Somit konnten zuverlässige Transfektionseffizienzen ermittelt werden. Eine genaue Beschreibung der Funktionsweise dieser Methode findet sich in Kapitel 3.3.2.3 dieser Arbeit.

Durch die zuverlässige Reproduzierbarkeit der Ergebnisse konnte im nächsten Teil der Arbeit der zelleselektive Charakter des Vektors **41** (Lys₄(GCP)-EDS(+)-Lys(Biotin)) genauer untersucht werden. Neben der Biotinrezeptordichte weisen verschiedene Zelllinien noch weitere Unterschiede zwischen einander auf. Aus diesem Grund wurden fünf Zelllinien verwendet, um diese Unterschiede möglichst gering zu halten. Als Zelllinien wurden zwei Positivkontrollen (HeLa und A549) und drei Negativkontrollen (HEK293t, HCT116 und CHO) verwendet.^[133,141] Zur Sicherstellung der Ergebnisse wurde des weiteren noch eine chemische Negativkontrolle (**45**, Lys₄(GCP)-EDS(+)-Lys(Ac)) synthetisiert, bei der Biotin durch einen Acetylrest ersetzt wurde. Somit sollte keine zusätzliche Bindung des Vektors an die Zelloberfläche möglich sein. Um die Ergebnisse in Relation zu literaturbekannten Transfektionsvektoren zu setzen wurden PEI, CaPO₄ Nanopartikel und Lipofectamine 2000 verwendet. Für PEI-DNA Komplexe wird eine endozytische Aufnahme und ein Ausbruch aus dem Endosom mittels *Proton-Sponge-Effect* angenommen.^[76,183] Da frühere Studien einen ähnlichen Mechanismus für GCP-basierte Vektorsysteme nahegelegt haben,^[40,104] ist dieser Vergleich besonders sinnvoll und wird daher in **Abbildung 4-1** dargestellt. Hierbei wurden die Vektoren in einer Konzentration von 150 µM, mit 0.1 µg DNA zu den Zellen gegeben. PEI wurde entsprechend den Herstellervorgaben verwendet.

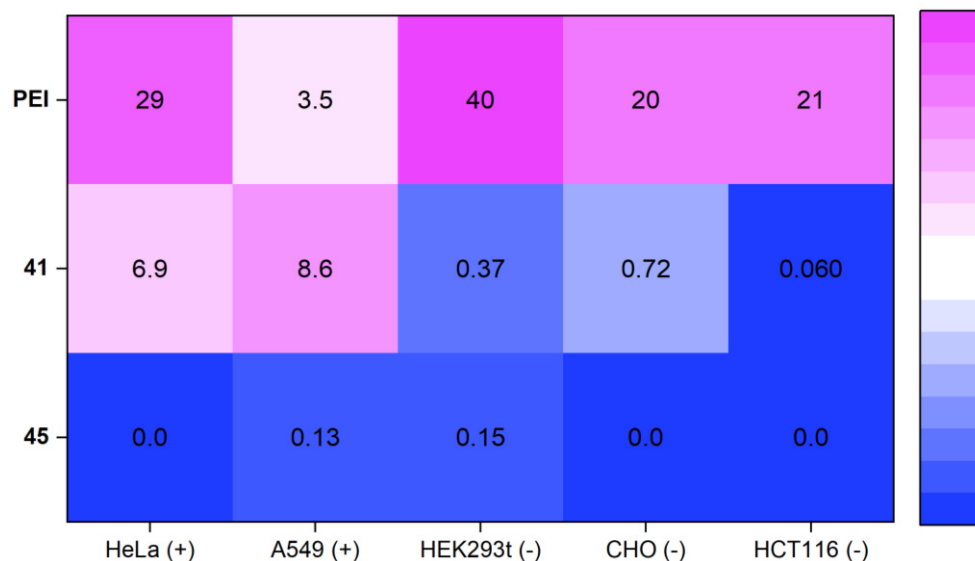


Abbildung 4-1. Zusammenfassung der Transfektionsergebnisse der beiden Vektoren (**41** und **45**) in einer Heatmap im Vergleich zu PEI; (+) und (-) stellen eine qualitative Beschreibung der Biotinrezeptordichte auf der Zelloberfläche dar.

Die Farbe der einzelnen Quadrate der Heatmap kodieren für die Transfektionseffizienz der Vektoren an den jeweiligen Zelllinien. Die Beschreibung der Biotinrezeptordichte für die Zellen wurde qualitativ mit + (Positivkontrolle) und - (Negativkontrolle) beschrieben. In der ersten Zeile sind die Transfektionseffizienzen von PEI dargestellt, welche bei allen Zelllinien über 20% liegen. Dies wird allerdings durch eine nur geringe Effizienz bei A549 Zellen unterbrochen, von denen nur 3.5% transfiziert werden. In der zweiten Zeile zeigen die

Effizienzen von **41** eine starke Präferenz für die Transfektion von Zelllinien mit einer hohen Biotinrezeptordichte (HeLa und A549). Hierbei fällt ein deutlicher Unterschied auch zwischen der PEI-Kontrolle und dem zellspezifischen Vektor auf, da dieser A549 Zellen deutlich besser transfiziert als das polykationische PEI. Zellen mit einer niedrigen Biotinrezeptordichte werden nur zu einem geringen Anteil transfiziert. Die so ermittelten Ergebnisse zeigen deutlich, dass **41** Zellen mit einer hohen Expression des Biotinrezeptors besser transfiziert als Zellen mit geringer. In der dritten Zeile zeigt die chemische Negativkontrolle (**45**, Lys₄(GCP)-EDS(+)-Lys(Ac)) nur sehr geringe Transfektionseffizienzen, unabhängig von der jeweiligen Zelllinie. Physikochemische und toxikologische Untersuchungen zu diesem Vektor liefern keine Ursache für diese Resultate. Daher ist das Fehlen des Labels der einzige Unterschied zwischen den beiden Vektoren und zeigt somit den Einfluss dessen. Biotin könnte daher für eine Adhäsion an der Zelloberfläche verantwortlich sein und so eine Endozytose des Vektor-DNA-Komplexes begünstigen. In diesem Rahmen kann dies daher als rezeptorspezifische Aufnahme bezeichnet werden.

Mit diesen Ergebnissen konnte auch das zweite Ziel dieser Arbeit erfolgreich erreicht werden, bei dem ein zellelektiver Vektor an verschiedenen Zelllinien getestet werden sollte. Zur Bestätigung des Biotinrezeptor abhängigen Aufnahmemechanismus wurde noch ein Konkurrenztest durchgeführt.

Das Kompetitions-Assay wurde in Anlehnung an die vorigen Transfektionsexperimente durchgeführt. Allerdings wurde die Konzentration des Vektors auf 300 µM erhöht, um einen möglichen Unterschied deutlicher sichtbar zu machen. Zum Nachweis einer kompetitiven Hemmung der Transfektion durch den Bindungspartner Biotin, wurde Biotin-FITC zum Medium gegeben. Anschließend konnte dann die Transfektionseffizienz in Abhängigkeit der Biotin Konzentration ermittelt werden.

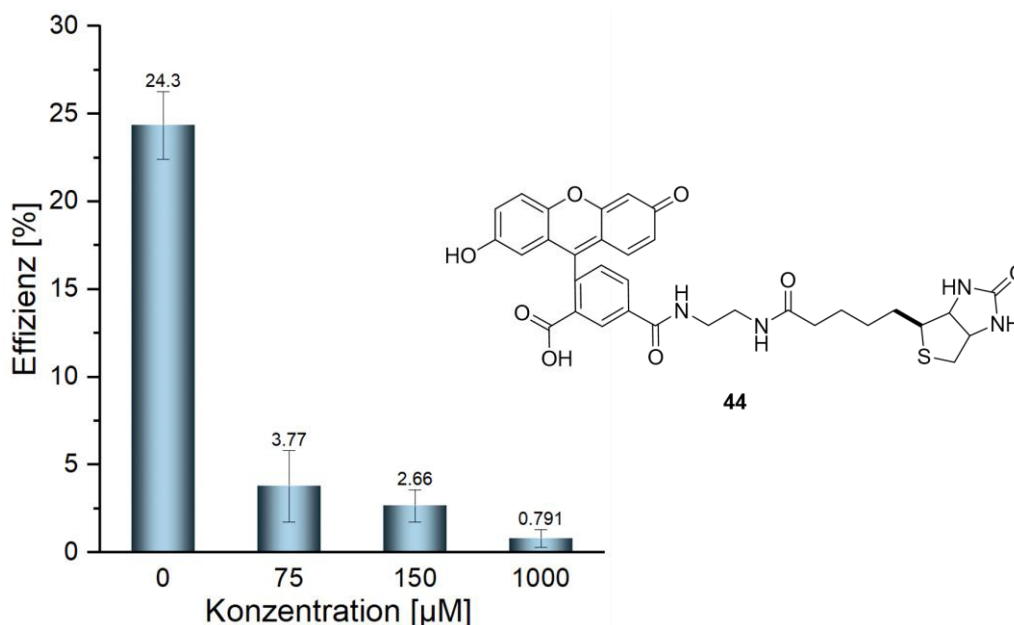


Abbildung 4-2. Balkendiagramm der Transfektionseffizienz von **41** (Lys₄(GFP)-EDS(+)-Lys(Biotin)) an HeLa-Zellen bei unterschiedlichen Biotin-Konzentrationen im Zellmedium.

In **Abbildung 4-2** ist die Transfektionseffizienz des Vektors in Abhängigkeit des freien Biotin-FITC in Zellmedium dargestellt. Der Transfektionsvektor **41** erreicht alleine eine Effizienz von 24% und setzt somit eine Basislinie für die Kompetitions-Experimente. Bereits bei einer geringen Endkonzentration von 75 µM des Biotinderivats, fällt die Transfektionseffizienz deutlich ab und erreicht nur noch ca. 4%. Eine weitere Erhöhung der Endkonzentration führt zu einer Verringerung der Transfektionseffizienz auf minimal 0.8% bei einer Biotin-Konzentration von 1000 µM. Diese Ergebnisse weisen noch einmal deutlich eine Biotin-Rezeptor abhängige Transfektion von **41** (Lys₄(GFP)-EDS(+)-Lys(Biotin)) nach.

Eine vollständige Beurteilung über den zellselektiven Vektors **41** ist allerdings erst nach der Betrachtung des toxikologischen Profils möglich. Hierzu wurde der Vektor in entsprechenden Experimenten genau, wie für die Transfektionsexperimente, zu den Zellen gegeben. Die Feststellung der Toxizität erfolgte mit Hilfe eines MTS-Assays. Eine Beschreibung der Funktionsweise ist in Kapitel 3.4.2 zu finden.

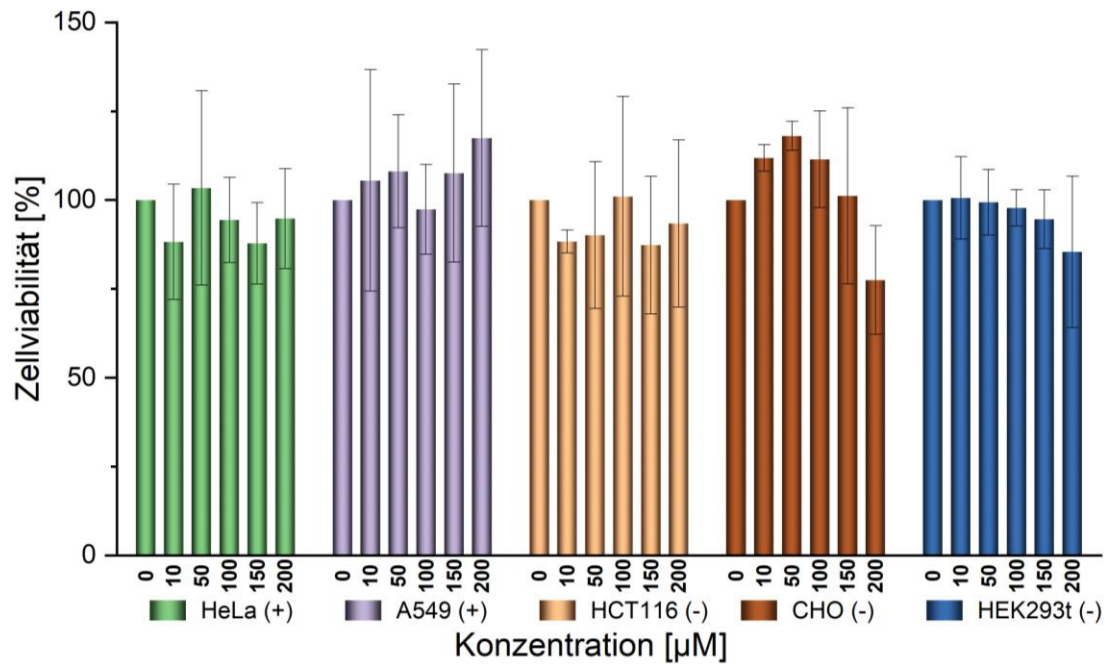


Abbildung 4-3. Balkendiagramm der Zellviabilität zu **41** (Lys₄(GCP)-EDS(+)-Lys(Biotin)) an fünf verschiedenen Zelllinien; (+) und (-) stellen eine qualitative Beschreibung der Biotinrezeptordichte auf der Zelloberfläche dar.

In **Abbildung 4-3** sind die Ergebnisse des MTS-Assays von **41** in Abhängigkeit der Konzentration und für die jeweiligen Zelllinien dargestellt. Für jede Zelllinie wurde eine Konzentration von 0 bis 200 µM getestet, was auf der x-Achse der Abbildung darstellt ist. Die y-Achse zeigt die relative Zellviabilität in Prozent, welche nach einer Normierung durch eine Mediumkontrolle erhalten wurde. Die gezeigten Farben kodieren für die entsprechenden Zelllinien, welche in der Legende dargestellt sind. Erneut wurde eine qualitative Beschreibung der Biotinrezeptordichte mittels + und – vorgenommen. Die Zellviabilität der Kontrollen bei denen Vektor **41** nicht eingesetzt wurde, wurden als 100% gesetzt. Aus diesem Grund fanden sich teilweise auch Werte über 100% in den Ergebnissen. Aus dem Balkendiagramm geht eindeutig hervor, dass der Vektor **41** bei keiner der Zelllinien einen toxischen Effekt zeigt, da die Überlebensrate an keiner Stelle unter 75% fällt. Der größte Effekt konnte bei CHO Zellen gemessen werden, allerdings erst ab einer Konzentration von 200 µM. Die Transfektionsexperimente wurden jedoch bei einer Konzentration von 150 µM durchgeführt, so dass dies keinen großen Einfluss auf die Ergebnisse hat.

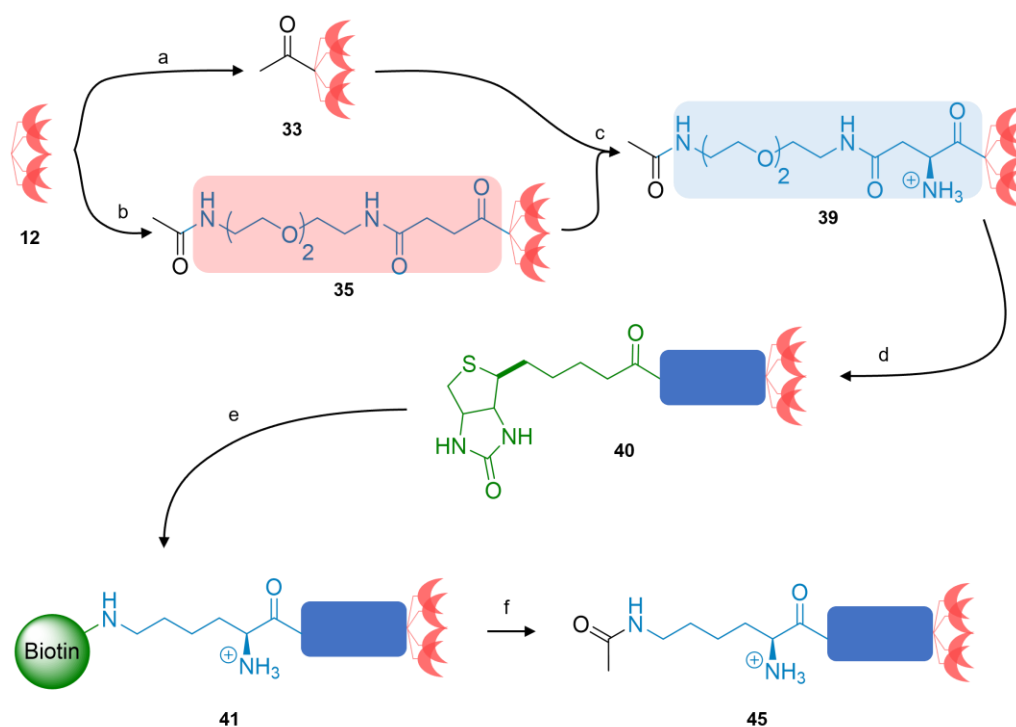
Die so erreichten Ergebnissen konnte die gesetzten Ziele somit vollständig erfüllen und leisten einen wichtigen Beitrag zu einem besseren Verständnis der Transfektionseigenschaften von Vektoren auf Peptidbasis.

Weitere Projekte welche ebenfalls bearbeitet wurden, werden aus Gründen der Übersicht und besseren Strukturierung der Arbeit im Anhang kurz thematisch zusammengefasst. Dies schließt Versuche zum selektiven Transport von zelltoxischen Substanzen in Krebszellen mit

ein. Als Leitstrukturen wurden hierzu Gossypol und eine Peptidsequenz verwendet. Die vielversprechenden Ergebnisse konnten aus Zeitgründen nicht weiter verfolgt werden. In einem weiteren Projekt wurde versucht, die Transfektionseigenschaften des zellselektiven Vektors **41** genauer zu eruieren. Dazu wurden Vektorkonjugate synthetisiert, die aus Zeitgründen keine Anwendung mehr fanden. Eine Darstellung der Synthesen, analytischer Daten, sowie Probleme und Lösungen sind im Experimentellen Teil (6.2.3) dieser Arbeit zusammengefasst.

5 SUMMARY

The results which are described in the main part of this work, will be summarized in this part and will be compared to the goals laid out in chapter two (chapter 2). Within the scope of this dissertation a new, cell selective transfection vector was developed, based on the GCP-binding-motif. This was supposed to be achieved by combining the Tetra-lysine-GCP motif **12** with a cell recognition unit. Due to this, a structure-activity relationship analysis was conducted, to derive an explanation for any future results. For this purpose the net charge of **12** (Lys₄(GCP)-NH₂, **Scheme 5-1**), was reduced by acetylation of the *N*-terminus (**33**, Lys₄(GCP)-Ac, a)). This change led to an impairment of transfection results, which were tested on HeLa cells. By attaching a hydrophile linker unit, which was supposed to counteract a poor water solubility of different cell specific labels, a second prototype (**35**, Lys₄(GCP)-EDS-Ac, b)) was developed. This vector showed a further decrease in the ability to transfect cells in biological experiments. Therefore it was deduced that the linker itself as well as the number of positive charges are crucial for the transfection ability of this vector.



Scheme 5-1 Summary of the results of the structure-activity relationship analysis of the vector based on the GCP-unit and the amino acid lysine; a) Reduction of positive charges, b) Introduction of a hydrophile linker unit, c) Introduction of a hydrophile linker unit with additional positive charge, d) Attachment of the biotin label to the optimized linker unit, e) Introduction of biocytin for an improved solubility in aqueous media, f) Synthesis of a negative control without the crucial biotin unit.

For this reason a new linker unit was developed which bears an additional positive charge. Using that a new vector (**39**, Lys₄(GCP)-EDS(+)-Ac, c)) was synthesized which showed an

improvement in biological measurements, whereby the previous thesis could be confirmed. On the basis of the optimized linker design the vector was functionalized with biotin. This vitamin was chosen as it bears no additional charge and can easily be used in synthesis. The product of the synthesis (**40**, Lys₄(GCP)-EDS(+)-Biotin, d)) however showed no successful transfection of HeLa cells. A possible cause for this might be the poor solubility in aqueous media. For this reason a combination of **39** (Lys₄(GCP)-EDS(+)-Ac) and **40** (Lys₄(GCP)-EDS(+)-Biotin) was tested to achieve water solubility as well as successful transfection. This way however did not yield positive results. Therefore biotin was modified with the amino acid lysin. This combination is called biocytin and is widely used in biological experiments.^[175,176] A vector (**41**, Lys₄(GCP)-EDS(+)-Lys(Biotin), e)) based on this motif was synthesized and showed promising results in first tests. A good efficiency, which was estimated from the fluorescent images at a concentration of 150 µM was achieved. From this point on the structure-activity relationship analysis was stopped and the focus was shifted towards the optimization of the transfection protocol. This concluded the first important aim of this study, where structure-activity relationship analysis should be used to improve the understanding of the molecular properties of the vector. Important findings are, that the number of positive charges should not be less than four. Furthermore any changes made to the system, e.g. linker units, should be evaluated accordingly as these can have an impact on the achieved results. Physicochemical measurements which were conducted did not yield the desired basis for the evaluation of the ability of the vector to transfect cells. Even positive results do not guarantee a successful transfection.

In the following part of this work the cell selective character of vector **41** (Lys₄(GCP)-EDS(+)-Lys(Biotin)) was examined. After primarily positive results, a poor reproducibility could be observed. This problem could, after some attempts, be traced back to dissolving the vector in aqueous media. By using a high concentrations of **41** in DMSO the initial results could be reproduced. In comparison to previous transfection experiments, the transfection efficiency was from now on deduced using CellProfiler®. By doing so reliable transfection efficiencies could be measured. A detailed description of the mode of operation can be found in chapter 3.3.2.3 of this work

Due to the reliable reproducibility of the results the cell selective character of the **41** (Lys₄(GCP)EDS(+)-Lys(Biotin) could be examined further. Besides the biotin receptor density, cells show a multitude of other differences between each other. For this reason five cell lines were chosen to keep said differences as little as possible. Two positive controls (HeLa and A549) and three negative control (HEK293t, HCT116 and CHO) cell lines were used.^[133,141] To improve reliability of the results a further chemical negative control was synthesized (**45**, Lys₄(GCP)-EDS(+)-Lys(Ac)) where biotin was replaced by a non-binding acetyl residue. Therefore there should be no binding of the vector to cellular surface present.

To compare the results to those published in the literature PEI, CaPO₄ and Lipofectamine 2000 was used for comparison. For PEI-DNA complexes, an endocytotic uptake pathway and an escape from the endosome employing the proton-sponge-effect is proposed.^[76,183] As previous studies suggest a similar mechanism for GCP-based vector systems.^[40,104] This comparison is especially useful and therefore depicted in **Figure 5-1**. For this the vectors were employed at a concentration of 150 µM with 0.1 µg DNA and added in the cell medium. PEI was used as described by the manufacturer.

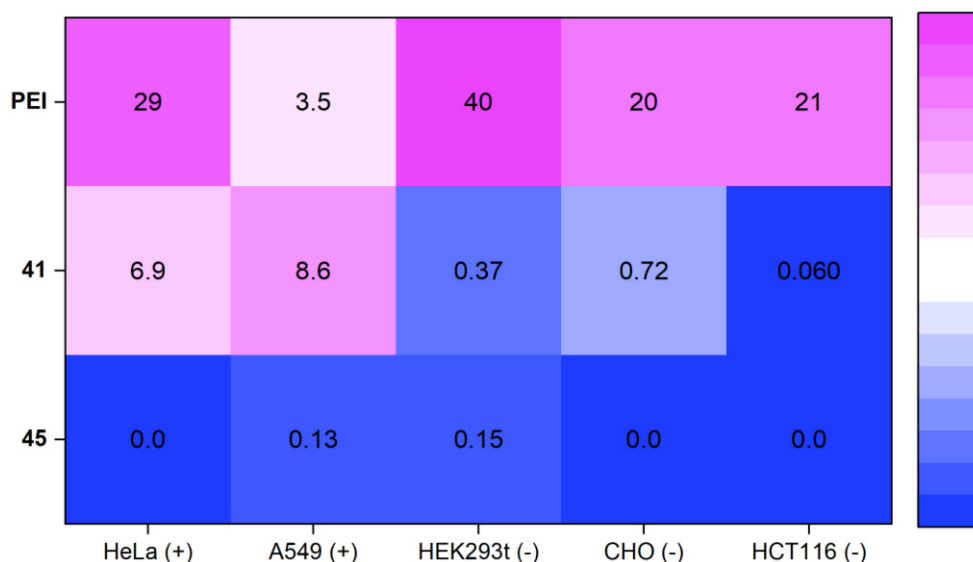


Figure 5-1. Summary of the transfection results of both vectors (**41** and **45**) in a heatmap in comparison to PEI; (+) and (+) depict a qualitative description of the biotin receptor density on the cellular surface.

The colours of each square in the heatmap represent the transfection efficiency of the vector at the given cell line. The description of the biotin density was described qualitative by (+) (positive control) and (-) (negative control). In the first row the transfection efficiencies of PEI are shown and reach values of more than 20% for all cell lines. This is however interrupted by a sharp decrease for A549 cells, where only 3.5% are transfected. In the second row the efficiencies of **41** show a high preference towards cell lines with a high biotin receptor density (HeLa and A549). In this specific case a stark contrast between the PEI-control and the cell selective vector becomes evident, as the latter transfects cells better than the polycationic PEI. Cells with a low biotin receptor density are only transfected to a marginal amount. The determined results show clearly, that **41** transfects cells with a high biotin receptor density better than ones with a low density. In the third row the chemical negative control (**45**, Lys₄(GCP)-EDS(+)-Lys(Ac)) shows only low over all transfection efficiencies, independent of the respective cell line. Physicochemical and toxicological analyses for this vector show no cause for these results. Therefore the missing of the label is the only difference between both vectors and shows the importance of the label. Biotin could therefore be responsible for the adhesion on the cellular surface and by this facilitate the endocytosis of the vector DNA

complex. In the scope of this work this behaviour can be described as a receptor specific uptake.

With these results the second aim of this work could be successfully completed, where a cell selective vector should be tested of different cell lines. To confirm the biotin receptor selective uptake mechanism a competition assay was conducted.

The competition assay was set up according to the previous transfection experiments. However the concentration of the vector was increased to 300 μM to make a possible difference more apparent. To confirm a competitive inhibition of transfection by the binding partner biotin, biotin-FITC was added to the cell medium. Subsequently the transfection efficiency could be measured in dependency of the biotin concentration.

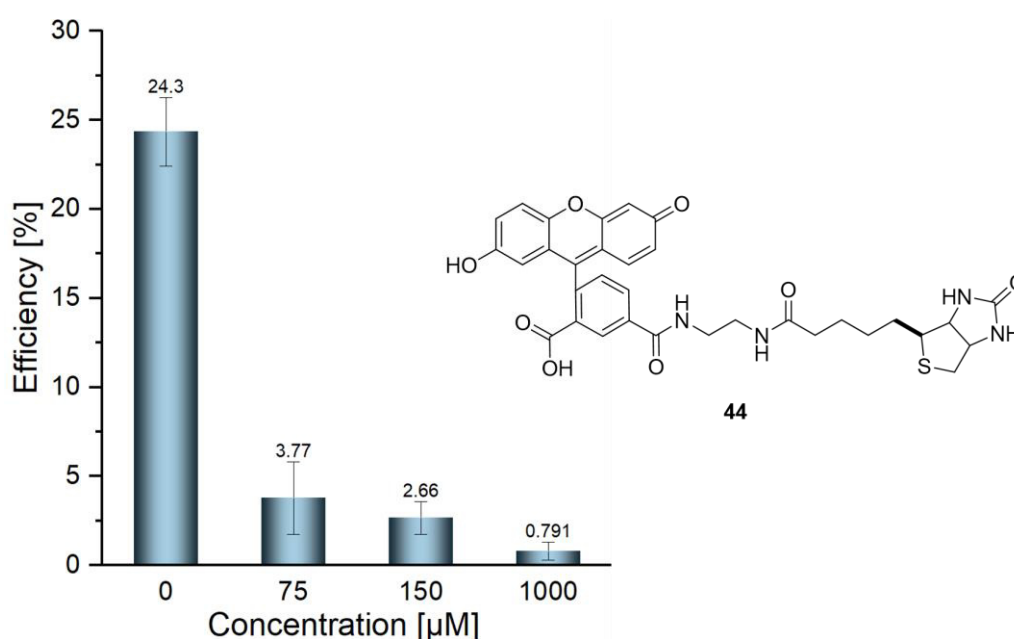


Figure 5-2. Bar chart of the transfection efficiency of **41** (Lys₄(GCP)-EDS(+)-Lys(Biotin)) on HeLa cells at different biotin concentrations in the cell medium.

Shown in **Figure 5-2** is the transfection efficiency the vectors depending on the free biotin-FITC in the cell medium. Transfection vector **41** achieves a maximum efficiency of 24% without biotin added and therefore draws a baseline for the competitions assay. At a low concentration of the biotin derivative of 75 μM , the transfection efficiency already drops to about 4%. Further increase of the final concentration leads to a further decrease in transfection efficiency up to a minimum of 0.8% at a concentration of 1000 μM . These results further underline the biotin receptor dependent transfection of **41** (Lys₄(GCP)-EDS(+)-Lys(Biotin)).

A full assessment of the cell selective vector **41** is however only possible after evaluation of the toxicological profile. For this the vector was used in similar experiments as for the transfection experiments to keep any variation as low as possible. The evaluation of toxicity

was achieved by using an MTS-assay. A detailed description of the method is given in chapter 3.4.2.

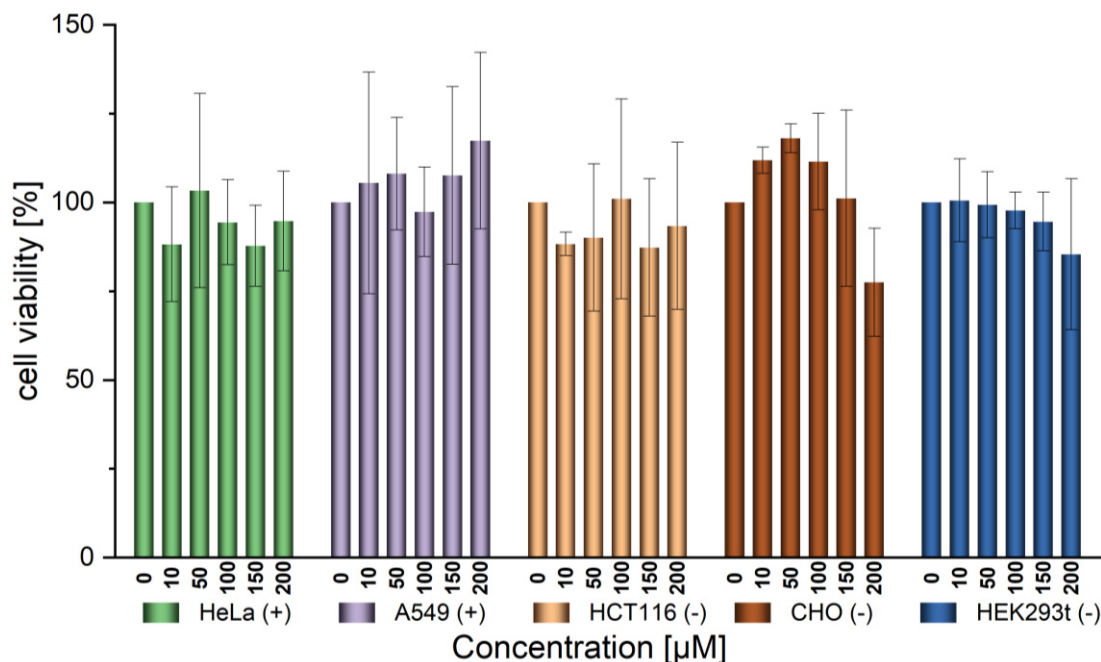


Figure 5-3. Bar chart of the cell viability of **41** (Lys₄(GCP)-EDS(+)-Lys(Biotin)) tested on five different cell lines; (+) and (-) depict a qualitative description of the biotin receptor density on the cellular surface.

In **Figure 5-3** are the results shown for the MTS-assay analysis of **41** depending of the concentration and each cell line. For every cell line used, a concentration range of 0 to 200 μM was tested which is shown on the x-axis. The y-axis shows the relative cell viability in percent which was deduced by standardisation of a medium control. The shown colours match the given cell lines in the bottom part of the diagram. Again a qualitative description of the biotin receptor density was used using + and -. The cell viability of the control, where the concentration of **41** is 0 were assigned as 100%. For this reason some results show results of 100% or more. The given diagram clearly shows that vector **41** does not show any toxicological effect on any cell type, as the cell viability does not drop below 75%. The largest effect can be seen for CHO cells however at a concentration of 200 μM. The transfection experiments were all conducted at a concentration of 150 μM so that these findings do not show a huge impact on the results.

The acquired results fulfil the targeted aims of this work and pose an important contribution to improve the understanding of transfection characteristics of peptide based vectors.

Further project which were additionally worked on were left out to improve readability and structuring of this work. In the appendix the topics are briefly summarized. This includes tests towards a selective transport of cell toxic substances to cancer cells. As a lead structure gossypol and a peptide sequence were used. The promising results could not be pursued

further due to time constraints. In another project it was tried to improve the understanding of the transfection characteristics of **41**. For this reason additional vector were synthesized but could not be employed in biological experiments due to too little time. A description of the syntheses, analytical data as well as problems and solutions are summarized in the experimental part of this work.

6 EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 Materialien und Methoden

6.1.1 Chemische Analysen und physikochemische Messungen

6.1.1.1 Allgemeiner Teil

Alle kommerziell erhältlichen Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet soweit nicht anderweitig erwähnt. Lösemittel wurden entweder frisch destilliert oder in entsprechender Reinheit erworben. Lösemittel wurden, wenn angegeben, mit einem Helium-Strom für 15 min entgast und maximal 24 h aufbewahrt und verwendet.

6.1.1.2 Säulenchromatographie

Zur Säulen-chromatographischen Trennung wurde Kieselgel (SiO_2 ; 60 M, 0.04 – 0.043 mm) als stationäre Phase der Firma Machery-Nagel GmbH & Co. KG verwendet. Dünnschichtchromatographie (DC) wurde auf Kunststoffplatten beschichtet mit Polygram® SIL G/UV254 (SiO_2 ; 0.2 mm, 40x80 mm) der Firma Machery-Nagel GmbH & Co. KG durchgeführt. Der Retentionsfaktor wird als R_f angegeben und errechnet sich aus der Lösemittelfront und der Retentionsstrecke des Analyten. Eine Analyse der Trennung erfolgte unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm und 360 nm. Eine Färbung der DC-Platten wurde, falls erwähnt, mit einer KMnO_4 -Lösung oder einer Vanillin-Lösung durchgeführt.

6.1.1.3 NMR-Spektroskopie

Alle angegebenen NMR-Spektren (^1H und ^{13}C) wurden mit den folgenden Geräten aufgenommen.

- Bruker DMX 300 (300 MHz für ^1H , 75 MHz für ^{13}C) von Bruker Corp.
- AV Neo 400 NMR (400 MHz für ^1H , 101 MHz für ^{13}C) von Bruker Corp.
- Bruker DMC 600 (600 MHz für ^1H , 151 MHz für ^{13}C) von Bruker Corp.

Alle Messungen wurde bei Raumtemperatur durchgeführt und die Analyten in den entsprechenden deuterierten Lösemitteln ($\text{DMSO}-d_6$, $\text{MeOH}-d_4$, CDCl_3) gelöst. Chemische Verschiebungen wurden in *part per million* (ppm) in Relation zum Restsignal des Lösemittels ($\text{DMSO}-d_6 = 2.50 \text{ ppm}$, $\text{MeOH}-d_4 = 3.31 \text{ ppm}$, $\text{CDCl}_3 = 7.26 \text{ ppm}$) angegeben. Kopplungskonstanten (J) wurde in Hertz (Hz) aus der Differenz der Verschiebung der Spektrometer-Frequenz berechnet und angegeben. Die Multiplizität der Signale wurde mit folgenden Abkürzungen beschrieben: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, br. = breit. Alle Spektren wurden mit der Software MestReNova (Version: 12.0.0-20080) von Mestrelab Research S.L. ausgewertet. Die Vorhersage von NMR-Spektren wurde mit der gleichen Software durchgeführt.

6.1.1.4 Massenspektrometrie

Massenspektren mit niedriger Auflösung wurden an einem Bruker amaZon SL (Bruker Corp.) vermessen. Hoch aufgelöste Spektren wurden mit einem Bruker maXis 4G (Bruker Corp.) aufgenommen. MALDI-TOF Spektren wurden mit einem Bruker autoFlex Speed aufgenommen. Die Analyten wurde im Fall von ES-Ionisation in MeOH, H₂O, ACN oder DCM gelöst. Die verwendeten Matrizen für eine Analyse mittels MALDI-TOF wurden an den entsprechenden Stellen angegeben. Alle Messungen wurden mit Hilfe der Software Compass DataAnalysis (Version 4.1) von Bruker Corp. ausgewertet.

6.1.1.5 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

DLS-Messungen wurden mit Hilfe eines Zetasizer-Nano ZS von Malvern Panalytical bei einer Zelltemperatur von 25 °C gemessen. Alle Messungen erfolgten durch Lichteinstrahlung durch einen HeNe-Laser (633 nm) und einem Streuwinkel von 173°. Die zu analysierenden Proben wurden in semi-micro PMMA Küvetten der Firma Brand GmbH & Co. KG vermessen.

6.1.1.6 Fourier-Transformation Infrarot (FT-IR)

FT-IR Spektren wurden an einem FT-IR 430 Spektrometer der Firma JASCO GmbH aufgenommen. Die Beschreibung der Signale wird mit b = breit und s = scharf vorgenommen.

6.1.1.7 Schmelzpunktbestimmung

Schmelzpunkte wurden an einem B-540 von Büchi Labortechnik GmbH mittels offener Glaskapillaren bestimmt.

6.1.1.8 pH-Wert Bestimmung

Der pH-Wert von Pufferlösungen wurde mit Hilfe eines Labor-pH-Meter 766 von Knick GmbH & Co. KG in Kombination mit einer Minitrode von Hamilton Bonaduz AG als Sensor durchgeführt.

6.1.1.9 Fluoreszenz-Spektroskopie

Die Fluoreszenzspektren wurden mit einem RF-6000 von Shimadzu Corp. aufgenommen. Messungen wurden in Quarzküvetten durchgeführt.

6.1.1.10 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

AFM-Aufnahmen wurden mit einem InnovaNanoDrive AFM-Kontroller und einem Innova Raster-Kraft-Mikroskop von Bruker Corp. im Semikontakt-Modus durchgeführt. Die Messnadel bestand aus N-dotiertem Silizium-Cantilever des Typs OMCL-AC160TS-R3 von Olympus K.K.. Als Probenträger wurden Mica-Platten (V1-2, Durchmesser = 9.9 mm, Höhe =

0.1 mm) der Firma Plano verwendet. Das Auftragen der Substanzen erfolgte auf einem Spincoater Serie SCV der Firma Oriol für 60 min. Die Analyse der Daten erfolgte mit Gwyddion (Version 2.58).

6.1.1.11 Gefriertrocknung

Die vollständige Entfernung von H₂O wurde mit Hilfe einer Gefriertrocknungsanlage (Alpha 1-2 LD Plus) von Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH erreicht.

6.1.1.12 RP-MPLC

Die Trennung mittels MPLC erfolgte mit einem Spot II, Modell Liquid Chromatographie Flash der Firma Armen Instruments. Für die Umkehrphase wurden entsprechende Säulen von YMC (YMC-Gel ODS-A oder ODS-AQ, 50 µm, 12 nm) verwendet.

6.1.1.13 RP-HPLC

Die Bestimmung der Reinheiten hergestellter Produkte wurde mit Hilfe einer RP-HPLC-Anlage mit einer UltiMate 3000 Pumpe von Dionex, einem UltiMate 3000 Säulenofen, von Dionex, einem ASI-100 automatisierten Probeninjektor von Dionex und einem UVD340U UV-Detektor von Dionex erreicht. Entsprechende Säulen von YMC (YMC-Pack ODS-AQ oder YMC-Triart C18, S-5 µm, 12 nm, 150 x 3.0 mm) wurden für eine Trennung verwendet. Die mobilen Phasen bestanden auf MeOH, H₂O, MeOH+0.1% TFA und H₂O+0.1% TFA.

Eine Reinigung der Produkte wurde mit einer präparativen HPLC zusammengesetzt aus einer Azura 2.1L HPLC Pumpe von Knauer, einem TIDAS S500 MCS UV/NIR Detektor der Firma J&M und einem LABOCOL Vario-4000 Fraktionssammler der Firma Labomatic erreicht. Eine Säule von YMC (YMC-Actus ODS-AQ, S-5 µm, 12 nm, 150 x 20 mm) wurde verwendet.

6.1.2 Analysen und Messungen mit biologischer Relevanz

6.1.2.1 Transfektionsexperimente

Für die Transfektionsexperimente wurde der Vektor in einer entsprechenden Menge DMSO (entgast mit Helium für 15 min) gelöst und bei oxidationsempfindlichen Substanzen mit Argon überschichtet. Anschließend wurde eine entsprechende Menge pDNA mit PBS-Puffer verdünnt und nach Zugabe der Vektorlösung für 15 min bei 37 °C inkubiert. Es wurden 30 µL des Wachstumsmediums aus jedem Well entnommen und durch 30 µL der Transfektionslösung ersetzt, so dass die finale Konzentration erreicht wurde. Nach einer Inkubationszeit von 5 h wurden die Zellen mit warmen PBS-Puffer (2x) gewaschen und mit Medium überschichtet. Die Zellen wurden nach 24 h mit Hoechst 33342 angefärbt (1:1000, 15 min) und mikroskopisch untersucht.

6.1.2.2 Toxizitätsstudien

Die Bestimmung der Toxizitätsprofile von Produkten wurde kolorimetrisch mittels CellTiter 96® AQueous One Solutions Cell Proliferation Assay (MTS) der Firma Promega durchgeführt. Hierzu wurden entsprechende 24 h zuvor Zellen in einem 96-well Platte der Firma Greiner bio-one mit einer Konfluenz von $1 - 5 \times 10^4$ in 100 μ L Wachstumsmedium ausgesät. Die Zellen wurden mit einer entsprechenden Konzentration von Vektor und Plasmid-DNA (1 μ g/mL) für 5 h inkubiert. Das Assay wurde entsprechend der Anweisungen des Herstellers angewendet und anschließend die Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm mit einem GloMax-Multi Plate Reader der Firma Promega ermittelt. Die Rohdaten wurden nach Subtraktion der Leierzelle und einer DMSO-Kontrolle normalisiert und mit Excel und Origin Pro ausgewertet und geplottet.

6.1.2.3 Fluoreszenzmikroskopie

Für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde ein Zeiss Axio Observer 7 von Zeiss mit einer Colibri 7 Festkörperlichtquelle von Zeiss verwendet. Die Übersichtsaufnahmen in 10x Vergrößerung wurden mit einem EC Plan-Neofluar 10x/0.3 Objektiv und Nahaufnahmen mit einem Plan-Neofluar 20x/0.50 Objektiv gemacht.

6.1.2.4 Bestimmung Transfektionseffizienz

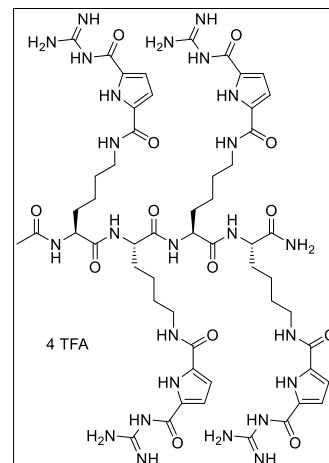
Die Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe von CellProfiler® durchgeführt. Hierzu wurde ein Programm erstellt und entsprechend konfiguriert, so dass entsprechende Fluoreszenzbilder in die Fluoreszenzkanäle getrennt wurden. Anschließend wurden in dem blauen Kanal alle Zellen mittels der Funktion „IdentifyPrimaryObjects“ und einer globalen Schwellenwert Analyse mittels Otsu ermittelt. Innerhalb dieser Objekte werden dann nach „MeasureObjectIntensity“, Objekte mit einer definierten Intensität gesucht („FilterObjects“). Die so ermittelten Objekte entsprechen den transfizierten Zellen. Die exportierten Daten wurden anschließend mittels Excel und Origin ausgewertet und graphisch aufgetragen.

6.2 Synthese

6.2.1 Peptidsynthesen

6.2.1.1 Synthese von **33**

Die Festphasenpeptidsynthese von **33** wurde mit einer CEM Mikrowelle in einer 25.0 mL transparenten, Polyethylen Spritze mit einer Fritte durchgeführt. Als Harz wurde Fmoc-Rink-Amid (200 mg, 0.320 mmol/g) verwendet und in 10 mL DCM/DMF (1:1) für 2 h bei RT gequollen. Die erste Fmoc-Abspaltung wurde durch Hinzufügen von einer 20% Lösung aus Piperidin in DMF (2x5 mL) und Mikrowellenbestrahlung für 1 min und 5 min bei 20 W mit einer maximalen Temperatur von 60 °C erreicht. Das Harz wurde mit DMF (6x5 mL) gewaschen. Für die Kupplung mit Fmoc-Lys(Alloc)-OH (58.0 mg, 0.128 mmol, 2.00 eq) wurde PyBOP (67.0 mg, 0.128 mmol, 2.00 eq), DiPEA (44.0 µL, 0.256 mmol, 4.00 eq) und DMF (5 mL) unter Argon Atmosphäre zum Harz gegeben und die Reaktionsmischung durch Mikrowellenbestrahlung bei 20 W und einer maximalen Temperatur von 60 °C für 30 min. Diese erste Kupplung wurde wiederholt, um einen vollständigen Umsatz zu erzielen. Das Harz wurde mit DMF (3x5 mL) gewaschen. Die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe und die Kupplung von Fmoc-Lys(Alloc)-OH für die zweite bis zur vierten Aminosäure wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die letzte Fmoc-Schutzgruppe wurde entfernt und das Harz mit DMF (6x5 mL) gewaschen. Die Acetylierung des *N*-Terminus wurde mit Essigsäureanhydrid (58.0 µL, 0.610 mmol, 9.50 eq) und DiPEA (109 µL, 0.640 mmol, 10.0 eq) in DMF (5 mL) unter Mikrowellenbestrahlung bei 20 W für 10 min bei einer maximalen Temperatur von 60 °C erreicht. Die Alloc-Schutzgruppen wurden mit Hilfe von Mikrowellenbestrahlung mit Pd(PPh₃)₄ (30.0 mg, 0.0256 mmol, 0.400 eq) und PhSiH₃ (758 µL, 6.14 mmol, 96.0 eq) in DCM (5 mL) bei 20 W für 10 min bei einer maximalen Temperatur von 30 °C entfernt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Nachfolgend wurde das Harz mit DCM, DMF, 0.5% DiPEA/DMF, 0.2 M Diethyldithiocarbamat/DMF Lösung, MeOH, DCM und DMF (3x5 mL, 3 min) gewaschen. Die Kupplung der GCP-Gruppen wurde mit Hilfe von GCP(Boc)-OH*NEt₃ (204 mg, 0.512 mmol, 8.00 eq), PyBOP (266 mg, 0.512 mmol, 8.00 eq) und DiPEA (175 µL, 1.02 mmol, 16.0 eq) in DMF (7 mL) unter Mikrowellenbestrahlung bei 20 W für 20 min und einer maximalen Temperatur von 60 °C durchgeführt. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt und mittels Kaiser-Test kontrolliert. Anschließend wurde das Harz mit DMF, MeOH und DCM (je 3x5 mL), 3 min) gewaschen und unter Vakuum für 1 h getrocknet. Das Harz wurde in einen Runden Schlenk Kolben mit einer Fritte gegeben und das Peptid mit einer Mischung aus 10 mL TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) für 1 h bei RT von der festen Phase abgespalten. Dies wurde zweimal für 10 min wiederholt.



Die vereinigten Abspalllösungen wurden unter Vakuum auf ca. 2 mL eingengt und das Produkt in 40 mL kaltem Et₂O gefällt. Das ausgefallene Material wurde zentrifugiert, erneut mit 40 mL kaltem Et₂O gewaschen und anschließend mittels Gefriertrocknung getrocknet. Das Produkt wurde mittels RP-MPLC (30 – 50% MeOH+0.1% TFA) isoliert und als weißer Feststoff (9.10 mg, 5.22 µmol, 8.2%) erhalten.

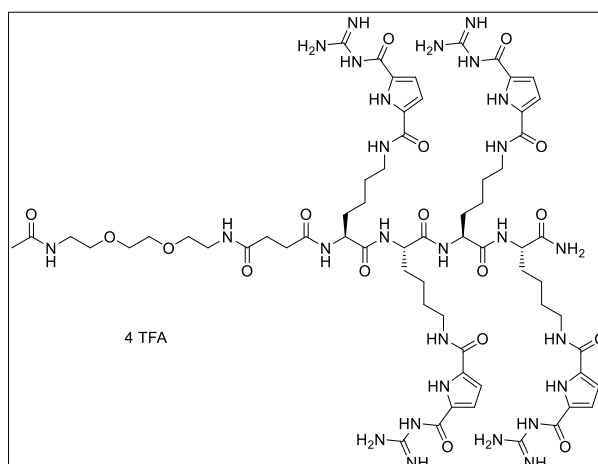
HRMS (ESI): m/z berechnet für C₅₄H₇₇N₂₅O₁₃+3H: 428.8784 [M+3H]³⁺; gefunden: 428.8779

Reinheit ermittelt via RP-HPLC: (30 – 50% MeOH+0.1% TFA): 99%

Schmelzpunkt: 259 °C (Zersetzung)

6.2.1.2 Synthese von 35

Die Festphasenpeptidsynthese von **35** wurde mit einer CEM Mikrowelle in einer 25.0 mL transparenten, Polyethylen Spritze mit einer Fritte durchgeführt. Als Harz wurde Fmoc-Rink-Amid (400 mg, 0.320 mmol/g) verwendet und in 10 mL DCM/DMF (1:1) für 2 h bei RT gequollen. Die erste Fmoc-Abspaltung wurde durch Hinzufügen von einer 20% Lösung aus Piperidin in DMF (2x5 mL) und Mikrowellenbestrahlung für



1 min und 5 min bei 20 W mit einer maximalen Temperatur von 60 °C erreicht. Das Harz wurde mit DMF (6x5 mL) gewaschen. Für die Kupplung mit Fmoc-Lys(Alloc)-OH (116 mg, 0.256 mmol, 2.00 eq) wurde PyBOP (133.0 mg, 0.256 mmol, 2.00 eq), DiPEA (87.4 µL, 0.512 mmol, 4.00 eq) und DMF (7 mL) unter Argon Atmosphäre zum Harz gegeben und die Reaktionsmischung durch Mikrowellenbestrahlung bei 20 W und einer maximalen Temperatur von 60 °C für 30 min. Diese erste Kupplung wurde wiederholt, um einen vollständigen Umsatz zu erzielen. Das Harz wurde mit DMF (3x5 mL) gewaschen. Die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe und die Kupplung von Fmoc-Lys(Alloc)-OH für die zweite bis zur vierten Aminosäure wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Linkereinheit **34** (120 mg, 0.256 mmol, 2.00 eq) wurde mit PyBOP (133 mg, 0.256 mg, 2.00 eq) und DiPEA (87.4 µL, 0.512 mmol, 4.00 eq) in DMF (7 mL) unter Mikrowellenbestrahlung bei 20 W und einer maximalen Temperatur von 60 °C gekuppelt. Die letzte Fmoc-Schutzgruppe wurde entfernt und das Harz mit DMF (6x5 mL) gewaschen. Die Acetylierung des *N*-Terminus wurde mit Essigsäureanhydrid (115 µL, 1.22 mmol, 9.50 eq) und DiPEA (219 µL, 1.28 mmol, 10.0 eq) in DMF (7 mL) unter Mikrowellenbestrahlung bei 20 W für 10 min bei einer maximalen Temperatur von 60 °C erreicht. Die Alloc-Schutzgruppen wurden mit Hilfe von Mikrowellenbestrahlung mit Pd(PPh₃)₄ (59.2 mg, 0.0512 mmol, 0.400 eq) und PhSiH₃ (1.52 mL, 12.3 mmol, 96.0 eq) in DCM (6 mL) bei 20 W für 10 min bei einer maximalen Temperatur von 30 °C entfernt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Nachfolgend wurde das Harz mit DCM, DMF, 0.5% DiPEA/DMF, 0.2 M Diethyldithiocarbamat/DMF Lösung, MeOH, DCM und DMF (3x5 mL, 3 min) gewaschen. Die Kupplung der GCP-Gruppen wurde mit Hilfe von GCP(Boc)-OH*NEt₃ (407 mg, 1.02 mmol, 8.00 eq), PyBOP (533 mg, 1.02 mmol, 8.00 eq) und DiPEA (350 µL, 2.05 mmol, 16.0 eq) in DMF (10 mL) unter Mikrowellenbestrahlung bei 20 W für 20 min und einer maximalen Temperatur von 60 °C durchgeführt. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt und mittels Kaiser-Test kontrolliert. Anschließend wurde das Harz mit DMF, MeOH und DCM (je 3x5 mL, 3 min) gewaschen und unter Vakuum für 1 h getrocknet. Das Harz wurde in einen

Runden Schlenkkolben mit einer Fritte gegeben und das Peptid mit einer Mischung aus 10 mL TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) für 1 h bei RT von der festen Phase abgespalten. Dies wurde zweimal für 10 min wiederholt. Die vereinigten Abspaltlösungen wurden unter Vakuum auf ca. 2 mL eingengt und das Produkt in 40 mL kaltem Et₂O gefällt. Das ausgefallene Material wurde zentrifugiert, erneut mit 40 mL kaltem Et₂O gewaschen und anschließend mittels Gefriertrocknung getrocknet. Das Produkt wurde mittels RP-MPLC (30 – 50% MeOH+0.1% TFA) isoliert und als weißer Feststoff (5.20 mg, 2.64 µmol, 2.1%) erhalten.

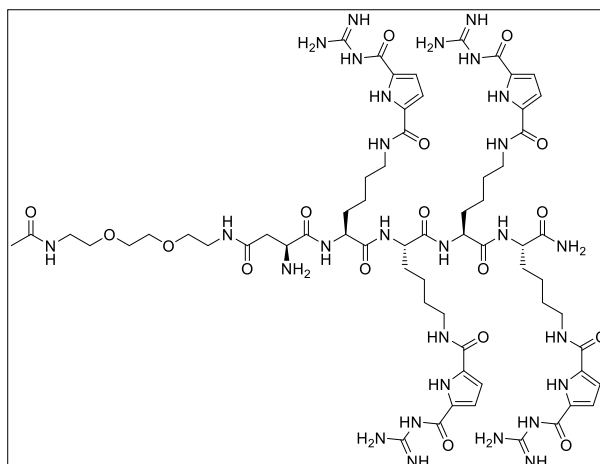
HRMS (ESI): m/z berechnet für C₆₄H₉₅N₂₇O₁₇: 505.5873 [M+3H]³⁺; gefunden: 505.5874

Reinheit ermittelt via RP-HPLC: (30 – 50% MeOH+0.1% TFA): 94%

Schmelzpunkt: 230 °C (Zersetzung)

6.2.1.3 Synthese von **39**

Die Festphasenpeptidsynthese von **39** wurde mit einer CEM Mikrowelle in einer 25.0 mL transparenten, Polyethylen Spritze mit einer Fritte durchgeführt. Als Harz wurde Fmoc-Rink-Amid (200 mg, 0.320 mmol/g) verwendet und in 10 mL DCM/DMF (1:1) für 2 h bei RT gequollen. Die erste Fmoc-Abspaltung wurde durch Hinzufügen von einer 20% Lösung aus Piperidin in DMF (2x5 mL) und Mikrowellen-



bestrahlung für 1 min und 5 min bei 20 W mit einer maximalen Temperatur von 60 °C erreicht. Das Harz wurde mit DMF (6x5 mL) gewaschen. Für die Kupplung mit Fmoc-Lys(Alloc)-OH (58.0 mg, 0.128 mmol, 2.00 eq) wurde PyBOP (67.0 mg, 0.128 mmol, 2.00 eq), DiPEA (44.0 μ L, 0.256 mmol, 4.00 eq) und DMF (5 mL) unter Argon Atmosphäre zum Harz gegeben und die Reaktionsmischung durch Mikrowellenbestrahlung bei 20 W und einer maximalen Temperatur von 60 °C für 30 min. Diese erste Kupplung wurde wiederholt, um einen vollständigen Umsatz zu erzielen. Das Harz wurde mit DMF (3x5 mL) gewaschen. Die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe und die Kupplung von Fmoc-Lys(Alloc)-OH für die zweite bis zur vierten Aminosäure wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Linkereinheit **36** (75.0 mg, 0.128 mmol, 2.00 eq) wurde mit PyBOP (67.0 mg, 0.128 mg, 2.00 eq) und DiPEA (44.0 μ L, 0.256 mmol, 4.00 eq) in DMF (5 mL) unter Mikrowellenbestrahlung bei 20 W und einer maximalen Temperatur von 60 °C gekuppelt. Die letzte Fmoc-Schutzgruppe wurde entfernt und das Harz mit DMF (6x5 mL) gewaschen. Die Acetylierung des *N*-Terminus wurde mit Essigsäureanhydrid (58.0 μ L, 0.610 mmol, 9.50 eq) und DiPEA (109 μ L, 0.640 mmol, 10.0 eq) in DMF (5 mL) unter Mikrowellenbestrahlung bei 20 W für 10 min bei einer maximalen Temperatur von 60 °C erreicht. Die Alloc-Schutzgruppen wurden mit Hilfe von Mikrowellenbestrahlung mit Pd(PPh₃)₄ (30.0 mg, 0.0256 mmol, 0.400 eq) und PhSiH₃ (758 μ L, 6.14 mmol, 96.0 eq) in DCM (5 mL) bei 20 W für 10 min bei einer maximalen Temperatur von 30 °C entfernt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Nachfolgend wurde das Harz mit DCM, DMF, 0.5% DiPEA/DMF, 0.2 M Diethyldithiocarbamat/DMF Lösung, MeOH, DCM und DMF (3x5 mL, 3 min) gewaschen. Die Kupplung der GCP-Gruppen wurde mit Hilfe von GCP(Boc)-OH*NEt₃ (204 mg, 0.512 mmol, 8.00 eq), PyBOP (266 mg, 0.512 mmol, 8.00 eq) und DiPEA (175 μ L, 1.02 mmol, 16.0 eq) in DMF (7 mL) unter Mikrowellenbestrahlung bei 20 W für 20 min und einer maximalen Temperatur von 60 °C durchgeführt. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt und mittels Kaiser-Test kontrolliert. Anschließend wurde das Harz mit DMF, MeOH und DCM (je 3x5 mL, 3 min) gewaschen und unter Vakuum für 1 h getrocknet. Das Harz wurde in einen

Runden Schlenkkolben mit einer Fritte gegeben und das Peptid mit einer Mischung aus 10 mL TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) für 1 h bei RT von der festen Phase abgespalten. Dies wurde zweimal für 10 min wiederholt. Die vereinigten Abspaltlösungen wurden unter Vakuum auf ca. 2 mL eingengt und das Produkt in 40 mL kaltem Et₂O gefällt. Das ausgefallene Material wurde zentrifugiert, erneut mit 40 mL kaltem Et₂O gewaschen und anschließend mittels Gefriertrocknung getrocknet. Das Produkt wurde mittels RP-MPLC (30 – 50% MeOH+0.1% TFA) isoliert und als weißer Feststoff (7.80 mg, 3.72 µmol, 5.8%) erhalten.

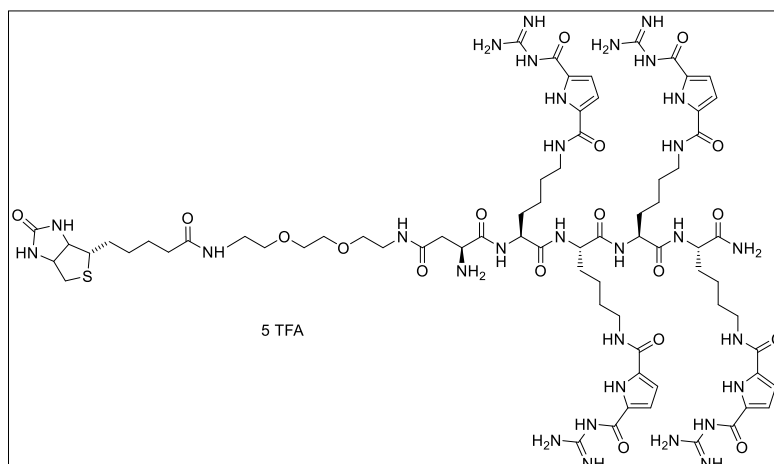
HRMS (ESI): m/z berechnet für C₆₄H₉₆N₂₈O₁₇: 383.1950 [M+4H]⁴⁺; gefunden: 383.1947

Reinheit ermittelt via RP-HPLC: (30 – 50% MeOH+0.1% TFA): 93%

Schmelzpunkt: 230 °C (Zersetzung)

6.2.1.4 Synthese von 40

Die Festphasensynthese von **40** wurde in einem runden Schlenkgefäß mit einer Fritte durchgeführt. Als Harz wurde Fmoc-Rink-Amid (100 mg, 0.500 mmol/g) verwendet und in 10 mL DCM/DMF (1:1) für 2 h bei RT gequollen. Die erste Fmoc-Abspaltung wurde durch Hinzufügen von einer 20% Lösung aus Piperidin in



DMF (2x5 mL) und Schütteln bei RT für 20 min erreicht. Das Harz wurde mit DMF (6x5 mL) gewaschen. Für die Kupplung mit Fmoc-Lys(Alloc)-OH (67.9 mg, 0.150 mmol, 3.00 eq) wurde PyBOP (78.1 mg, 0.150 mmol, 3.00 eq), DiPEA (51.2 μ L, 0.300 mmol, 6.00 eq) und DMF (5 mL) unter Argon Atmosphäre zum Harz gegeben und die Reaktionsmischung für 1 h bei RT geschüttelt. Das Harz wurde mit DMF (3x5 mL) gewaschen. Die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe und die Kupplung von Fmoc-Lys(Alloc)-OH für die zweite bis zur vierten Aminosäure wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Linkereinheit **36** (87.8 mg, 0.150 mmol, 3.00 eq) wurde mit PyBOP (78.1 mg, 0.150 mg, 3.00 eq) und DiPEA (51.2 μ L, 0.300 mmol, 6.00 eq) in DMF (5 mL) für 1 h bei RT gekuppelt. Die letzte Fmoc-Schutzgruppe wurde entfernt und das Harz mit DMF (6x5 mL) gewaschen. Biotin (36.6 mg, 0.150 mmol, 3.00 eq) wurde mit PyBOP (78.1 mg, 0.150 mmol, 3.00 eq) und DiPEA (48.5 μ L, 0.300 mmol, 6.00 eq) in DMF (6 mL) für 1 h bei RT unter Schütteln gekuppelt. **Alle weiteren Arbeiten wurden, um eine Oxidation des Biotins zu verhindern, unter Argon ausgeführt.*** Die Alloc-Schutzgruppen wurden mit Hilfe von Pd(PPh₃)₄ (28.9 mg, 0.0250 mmol, 0.500 eq) und PhSiH₃ (770 μ L, 6.00 mmol, 120 eq) in DCM (2x6 mL, 45 min) bei RT unter Schütteln entfernt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Nachfolgend wurde das Harz mit DCM, DMF, 0.5% DiPEA/DMF, 0.2 M Diethyldithiocarbamat/DMF Lösung, MeOH, DCM und DMF (3x5 mL, 3 min) gewaschen. Die Kupplung der GCP-Gruppen wurde mit Hilfe von GCP(Boc)-OH*NEt₃ (239 mg, 0.600 mmol, 12.0 eq), PyBOP (312 mg, 0.600 mmol, 12.0 eq) und DiPEA (295 μ L, 1.80 mmol, 36.0 eq) in DMF (7 mL) bei RT für 1 h durch Schütteln erreicht. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt und mittels Kaiser-Test kontrolliert. Anschließend wurde das Harz mit DMF, MeOH und DCM (je 3x5 mL), 3 min) gewaschen und unter Vakuum für 1 h getrocknet. Das Peptid wurde mit einer Mischung aus 10 mL TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) für 1 h bei RT von der festen Phase abgespalten. Dies wurde zweimal für 10 min wiederholt. Die vereinigten Abspalllösungen wurden unter Vakuum auf ca. 2 mL eingedunstet und unter Argon gesetzt. Das Produkt wurde in 40 mL kaltem Et₂O

gefällt, das ausgefallene Material zentrifugiert und erneut mit 40 mL kaltem Et₂O gewaschen. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Gefriertrocknung getrocknet. Das Produkt wurde mittels RP-HPLC (30 – 50% MeOH+0.1% TFA) isoliert und als weißer Feststoff (10.3 mg, 4.51 µmol, 9.0%) erhalten.

HRMS (ESI): m/z berechnet für C₇₂H₁₀₈N₃₀O₁₈S: 429.2117 [M+4H]⁴⁺; gefunden: 429.2123

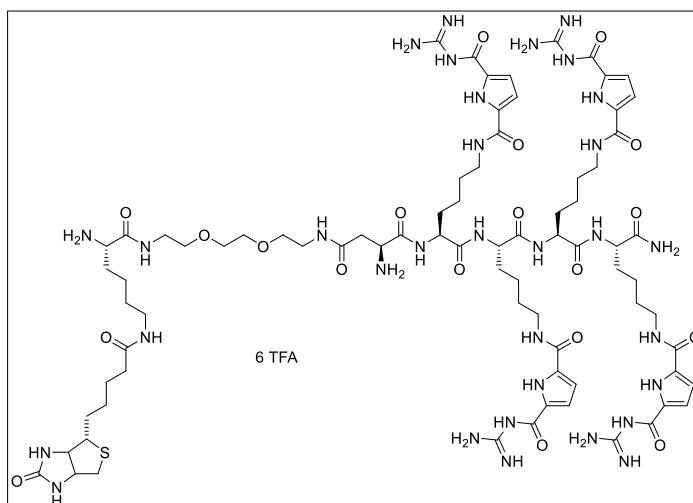
Reinheit ermittelt via RP-HPLC: (30 – 50% MeOH+0.1% TFA): 96%

Schmelzpunkt: 170 °C (Zersetzung)

*Der Thioether des Biotins wird leicht durch Luftsauerstoff oxidiert. Dies konnte bei der Synthese eines Vorläufermoleküls beobachtet werden. Ein Beispiel NMR wurde im Hauptteil (3.1.1.1) der Arbeit diskutiert. Ein vollständiges NMR ist im Anhang der Arbeit zu finden

6.2.1.5 Synthese von 41

Die Festphasensynthese von **41** wurde in einem runden Schlenkgefäß mit einer Fritte durchgeführt. Als Harz wurde Fmoc-Rink-Amid (200 mg, 0.360 mmol/g) verwendet und in 10 mL DCM/DMF (1:1) für 2 h bei RT gequollen. Die erste Fmoc-Abspaltung wurde durch Hinzufügen von einer 20% Lösung aus Piperidin in DMF (2x5 mL) und Schütteln bei RT für 20 min unter



Argon erreicht. Das Harz wurde mit DMF (6x5 mL) gewaschen. Für die Kupplung mit Fmoc-Lys(Alloc)-OH (98.0 mg, 0.216 mmol, 3.00 eq) wurde HCTU (89.0 mg, 0.216 mmol, 3.00 eq), DiPEA (74.0 μ L, 0.432 mmol, 6.00 eq) und DMF (5 mL) unter Argon Atmosphäre zum Harz gegeben und die Reaktionsmischung für 1 h bei RT geschüttelt. Das Harz wurde mit DMF (3x5 mL) gewaschen. Die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe und die Kupplung von Fmoc-Lys(Alloc)-OH für die zweite bis zur vierten Aminosäure wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Linkereinheit **36** (126 mg, 0.216 mmol, 3.00 eq) wurde mit HCTU (89.0 mg, 0.216 mg, 3.00 eq) und DiPEA (74.0 μ L, 0.432 mmol, 6.00 eq) in DMF (5 mL) für 1 h bei RT gekuppelt. Nachdem die Fmoc-Schutzgruppe entfernt wurde, das Harz mit DMF (6x5 mL) gewaschen wurde, wurde Boc-Lys(Fmoc)-OH (101 mg, 0.216 mmol, 3.00 eq) mit HCTU (89.0 mg, 0.216 mmol, 3.00 eq) und DiPEA (74.0 μ L, 0.432 mmol, 6.00 eq) in DMF (6 mL) bei RT für 1 h gekuppelt. Anschließend wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit der zuvor beschriebenen Lösung entfernt (2x5 mL, 20 min). Biotin (53.0 mg, 0.216 mmol, 3.00 eq) wurde mit PyBOP (122 mg, 0.216 mmol, 3.00 eq) und DiPEA (74.0 μ L, 0.432 mmol, 6.00 eq) in DMF (6 mL) für 1 h bei RT unter Schütteln gekuppelt. **Alle weiteren Arbeiten wurden, um eine Oxidation des Biotins zu verhindern unter Argon ausgeführt.*** Die Alloc-Schutzgruppen wurden mit Hilfe von Pd(PPh₃)₄ (42.0 mg, 0.0360 mmol, 0.500 eq) und PhSiH₃ (1.10 mL, 8.60 mmol, 120 eq) in DCM (2x6 mL, 45 min) bei RT unter Schütteln entfernt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Nachfolgend wurde das Harz mit DCM, DMF, 0.5% DiPEA/DMF, 0.2 M Diethyldithiocarbamat/DMF Lösung, MeOH, DCM und DMF (3x5 mL, 3 min) gewaschen. Die Kupplung der GCP-Gruppen wurde mit Hilfe von GCP(Boc)-OH*NEt₃ (343 mg, 0.768 mmol, 12.0 eq), PyBOP (450 mg, 0.768 mmol, 12.0 eq) und DiPEA (393 μ L, 1.54 mmol, 32.0 eq) in DMF (7 mL) bei RT für 1 h durch Schütteln erreicht. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt und mittels Kaiser-Test kontrolliert. Anschließend wurde das Harz mit DMF, MeOH und DCM (je 3x5 mL), 3 min) gewaschen und unter Vakuum für 1 h getrocknet. Das Peptid wurde mit

einer Mischung aus 10 mL TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) für 1 h bei RT von der festen Phase abgespalten. Dies wurde zweimal für 10 min wiederholt. Die vereinigten Abspalllösungen wurden unter Vakuum auf ca. 2 mL eingeeengt und unter Argon gesetzt. Das Produkt wurde in 40 mL kaltem Et₂O gefällt, das ausgefallene Material zentrifugiert und erneut mit 40 mL kaltem Et₂O gewaschen. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Gefrierdrying getrocknet. Das Produkt wurde mittels RP-HPLC (36% MeOH+0.1% TFA) isoliert und als weißer Feststoff (6.58 mg, 2.60 µmol, 3.6%) erhalten.

¹H-NMR: (600 MHz, DMSO-d₆): δ/ppm: 12.25 (s, 4H), 11.34 (s, 4H), 7.75-8.59 (m, 27H), 7.32 (s, 2H), 7.19 (s, 1H), 7.04-7.10 (m, 8H), 6.81 (br.s, 4H, Pyrrole-CH), 6.54 (s, 2H), 6.42 (s, 1H, Biotin-NH), 6.39 (s, 1H, Biotin-NH), 5.32-5.33 (m, 1H), 4.13-4.31 (m, 7H), 3.70 (t, J = 6.30 Hz, 1H), 3.59 (m, 1H), 3.50 (br. s, 3H), 3.42 (m, 3H),** 3.19-3.20 (m, 6H), 3.07-3.10 (m, 2H), 2.99-3.00 (m, 2H), 2.77 (dd, J = 4.92 Hz, 12.51 Hz, 1H, Biotin-CH), 2.73-2.75 (m, 2H), 2.54 (d, J = 12.51 Hz, 1H, Biotin-CH), 2.52 (br. s, 2H), 1.97-2.05 (m, 4H), 1.23-1.68 (m, 30H).

¹³C-NMR: (150 MHz, DMSO-d₆): 173.5, 171.9, 171.6, 171.2, 168.7, 168.6, 168.2, 162.7 (Biotin-N-(C=O)-N), 159.0, 158.5, 158.3, 158.1, 158.0, 157.9, 132.4-132.5 (Pyrrol-C_{quart}), 125.5-125.8***, 120.2, 118.2, 116.2, 115.0-115.2, 114.3, 112.3, 69.5, 68.8, 68.8 (Glycol-CH₂), 61.0 (Biotin-Brückenkopf), 59.2 (Biotin-Brückenkopf), 55.4 (Biotin-CH), 53.1, 53.0, 52.8, 52.6, 52.3, 52.1, 49.1, 40.0, 38.7, 38.1, 35.7 (CH₂), 35.1-35.2 (CH₂), 34.4 (CH₂), 31.2-31.9 (CH₂), 30.9 (CH₂), 28.7-28.9 (CH₂), 28.2 (Biotin-CH₂), 28.0 (Biotin-CH₂), 25.3, 23.1 (CH₂), 22.7-22.9 (CH₂), 21.6 (CH₂).

Zuordnungen von Signalen wurden nur angegeben, wenn diese eindeutig durch 2D-NMR (COSY, HSQC, HMBC) Daten und/oder einen Vergleich mit Referenzspektren zugeordnet werden konnten.^[161]

HRMS (ESI): m/z berechnet für C₇₈H₁₂₀N₃₂O₁₉S: 461.2355 [M+4H]⁴⁺; gefunden: 461.2354

Reinheit ermittelt via RP-HPLC: (30 – 50% MeOH+0.1% TFA): 99%

Schmelzpunkt: 160 °C (Zersetzung)

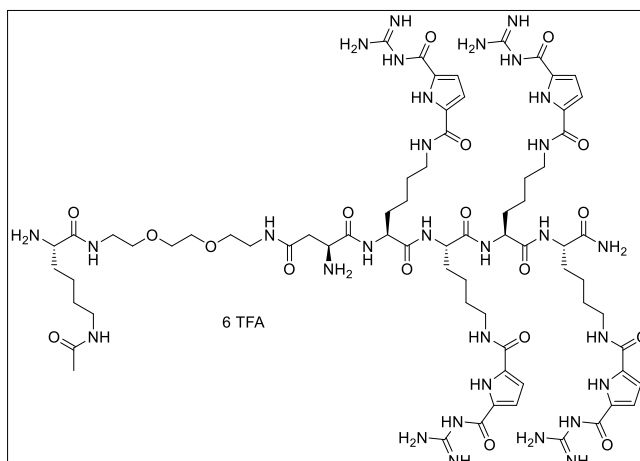
*Der Thioether des Biotins wird leicht durch Luftsauerstoff oxidiert. Dies konnte bei der Synthese eines Vorläufermoleküls beobachtet werden. Ein Beispiel NMR wurde im Hauptteil (3.1.1.1) der Arbeit diskutiert. Ein vollständiges NMR ist im Anhang der Arbeit zu finden

**Weitere Peaks sind durch das DMSO Signal nicht zu definieren.

***Diese Signale konnten nun nach Anwendung einer Lorenz-Gauß Fensterfunktion identifiziert werden und konnte mittels Vergleichsspektrum bestätigt werden.

6.2.1.6 Synthese von 45

Die Festphasenpeptidsynthese von **45** wurde mit einer CEM Mikrowelle in einer 25.0 mL transparenten, Polyethylen Spritze mit einer Fritte durchgeführt. Als Harz wurde Fmoc-Rink-Amid (300 mg, 0.500 mmol/g) verwendet und in 10 mL DCM/DMF (1:1) für 2 h bei RT gequollen. Die erste Fmoc-Abspaltung wurde durch Hinzufügen von einer 20% Lösung aus Piperidin in DMF (2x5 mL) und Mikrowellenbestrahlung für 1 min



und 5 min bei 20 W mit einer maximalen Temperatur von 60 °C erreicht. Das Harz wurde mit DMF (6x5 mL) gewaschen. Für die Kupplung mit Fmoc-Lys(Alloc)-OH (204 mg, 0.450 mmol, 3.00 eq) wurde HCTU (186 mg, 0.450 mmol, 3.00 eq), DiPEA (154 μ L, 0.900 mmol, 6.00 eq) und DMF (7 mL) unter Argon Atmosphäre zum Harz gegeben und die Reaktionsmischung durch Mikrowellenbestrahlung bei 20 W und einer maximalen Temperatur von 60 °C für 30 min. Diese erste Kupplung wurde wiederholt, um einen vollständigen Umsatz zu erzielen. Das Harz wurde mit DMF (3x5 mL) gewaschen. Die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe und die Kupplung von Fmoc-Lys(Alloc)-OH für die zweite bis zur vierten Aminosäure wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Linkereinheit **36** (263 mg, 0.450 mmol, 3.00 eq) wurde mit HCTU (186 mg, 0.450 mg, 3.00 eq) und DiPEA (154 μ L, 0.900 mmol, 6.00 eq) in DMF (7 mL) unter Mikrowellenbestrahlung bei 20 W und einer maximalen Temperatur von 60 °C gekuppelt. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde entfernt und das Harz mit DMF (6x5 mL) gewaschen. Anschließend wurde Boc-Lys(Fmoc)-OH (211 mg, 0.450 mmol, 3.00 eq) mit HCTU (186 mg, 0.450 mmol, 3.00 eq) und DiPEA (154 μ L, 0.900 mmol, 6.00 eq) für 30 min bei 20 W Mikrowellenbestrahlung und einer maximalen Temperatur von 60 °C gekuppelt. Nach der Entfernung der letzten Fmoc-Schutzgruppe wurde der *N*-Terminus mit Essigsäureanhydrid (135 μ L, 1.42 mmol, 9.50 eq) und DiPEA (256 μ L, 1.50 mmol, 10.0 eq) in DMF (7 mL) unter Mikrowellenbestrahlung bei 20 W für 10 min bei einer maximalen Temperatur von 60 °C blockiert. Die Alloc-Schutzgruppen wurden mit Hilfe von Mikrowellenbestrahlung mit Pd(PPh₃)₄ (8.67 mg, 0.0750 mmol, 0.500 eq) und PhSiH₃ (2.22 μ L, 18.0 mmol, 120 eq) in DCM (8 mL) bei 20 W für 10 min bei einer maximalen Temperatur von 30 °C entfernt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Nachfolgend wurde das Harz mit DCM, DMF, 0.5% DiPEA/DMF, 0.2 M Diethyldithiocarbamat/DMF Lösung, MeOH, DCM und DMF (3x5 mL, 3 min) gewaschen. Die Kupplung der GCP-Gruppen wurde mit Hilfe von GCP(Boc)-OH*NEt₃ (715 mg, 1.20 mmol, 12.0 eq), PyBOP (937 mg, 1.20 mmol, 12.0 eq) und DiPEA (820 μ L, 1.02 mmol, 32.0 eq) in DMF (10 mL) unter

Mikrowellenbestrahlung bei 20 W für 30 min und einer maximalen Temperatur von 60 °C durchgeführt. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt und mittels Kaiser-Test kontrolliert. Anschließend wurde das Harz mit DMF, MeOH und DCM (je 3x5 mL), 3 min) gewaschen und unter Vakuum für 1 h getrocknet. Das Harz wurde in einen Runden Schlenkkolben mit einer Fritte gegeben und das Peptid mit einer Mischung aus 10 mL TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) für 1 h bei RT von der festen Phase abgespalten. Dies wurde zweimal für 10 min wiederholt. Die vereinigten Abspalllösungen wurden unter Vakuum auf ca. 2 mL eingeeengt und das Produkt in 40 mL kaltem Et₂O gefällt. Das ausgefallene Material wurde zentrifugiert, erneut mit 40 mL kaltem Et₂O gewaschen und anschließend mittels Gefriertrocknung getrocknet. Das Produkt wurde mittels RP-MPLC (30 – 50% MeOH+0.1% TFA) isoliert und als weißer Feststoff (7.80 mg, 3.33 µmol, 2.2%) erhalten.

¹H-NMR: (600 MHz, DMSO-d₆): δ/ppm = 8.59-8.58 (d, *J* = 7.84 Hz, 2H, Amid-NH), 8.51-8.50 (t, *J* = 5.20 Hz, Amid-NH), 8.41 (br. s, 6H, Guanidin-NH), 8.35-8.33 (t, *J* = 5.30 Hz, 3H, Amid-NH), 8.18-8.17 (d, *J* = 7.84 Hz, 2H, Amid-NH), 7.87-7.85 (d, *J* = 7.84 Hz, 1H, Amid-NH), 7.81-7.78 (m, 3H, Amid-NH), 7.32 (br. s, 1H, Amide-NH), 7.03 (m, 4H, Pyrrol-CH), 6.82 (br. s, 4H, Pyrrole-CH), 4.27-4.15 (m, 6H, alpha-CH), 3.71-3.69 (t, *J* = 6.42 Hz, 1H), 3.49 (br. s, 4H), 3.42-3.41 (m, 4H), 3.21 (m, 12H, Glycol-CH, Lys-CH), 3.00-2.97 (q, *J* = 6.48 Hz, 3H), 2.75-2.72 (m, 1H, CH), 1.78 (br. s, 3H, Acetyl-CH₃), 1.67 (m, 8H, Lys-CH), 1.54-1.48 (m, 16H, Lys-CH), 1.38-1.22 (m, 22H, Lys-CH).

¹³C-NMR: (150 MHz, DMSO-d₆): δ/ppm = 173.48 (C_q), 171.24 (C_q), 169.08 (C_q), 168.68 (C_q), 168.61 (C_q), 159.12 (C_q), 158.53-157.91 (q, *J*_{CF} = 30.5 Hz, CF₃CO₂), 120.23-114.25 (q, *J*_{CF} = 307 Hz, CF₃CO₂), 112.28 (Pyrrol-C), 69.49 (CH₂), 69.47 (CH₂), 68.86 (CH₂), 52.94 (α-CH), 52.83 (α-CH), 52.55 (α-CH), 52.29 (α-CH), 52.16 (α-CH), 49.11 (α-CH), 40.06 (Glycol-CH), 39.91 (Glycol-CH), 38.75 (CH₂), 38.19 (CH₂), 31.64 (Lys-CH₂), 30.83 (Lys-CH₂), 28.85 (Lys-CH₂), 28.70 (Lys-CH₂), 23.07 (Lys-CH₂), 22.75 (Acetyl-CH₃), 21.57 (Lys-CH₂).

Zuordnungen wurden an Hand von ¹H-NMR, ¹³C-NMR (DEPT-Q) und 2D-NMR (COSY, HSQC, HMBC) Experimenten erstellt.

HRMS (ESI): *m/z* berechnet für C₇₀H₁₀₈N₃₀O₁₈: 415.2198 [*M*+4H]⁴⁺; gefunden: 415.2187

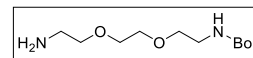
Reinheit ermittelt via RP-HPLC: (30 – 50% MeOH+0.1% TFA): 93%

Schmelzpunkt: 230 °C (Zersetzung)

6.2.2 Synthesen der Linkereinheiten

6.2.2.1 Synthese von 46

Basierend auf einer literaturbekannten Vorschrift wurde 2,2'-(ethyldioxy)bis(ethylamin) (7.09 mL, 48.3 mmol, 6.00 eq) in DCM (41 mL) gelöst und di-*tert*-Butyldicarbonat (1.76 g, 8.05 mmol, 1.00 eq) in DCM (16 mL) mit einem Präzisionstropftrichter über 2 h bei 0 °C hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 18 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das farblose Öl in H₂O (16 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit DCM (4x20 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde als farbloses Öl (2.04 g, 8.20 mmol, quant.) erhalten.



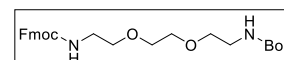
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 5.15 (s, 1H), 3.61 (s, 4H), 3.55-3.50 (m, 4H), 3.32-3.27 (t, *J* = 5.00 Hz, 2H), 2.90-2.87 (t, *J* = 5.00 Hz, 2H), 1.43 (s, 9H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 156.15, 79.29, 73.26, 70.33, 41.74, 40.45, 28.53.

Die spektroskopischen Daten stehen in Einklang mit der Literatur.^[169]

6.2.2.2 Synthese von 47

Basierend auf einer literaturbekannten Vorschrift wurde eine Lösung aus **46** (1.00 g, 4.00 mmol, 1.00 eq) in THF (20 mL) zu einer Lösung aus K₂CO₃ (2.80 g) in H₂O (20 mL) gegeben. Anschließend wurde Fmoc-Cl (1.14 g, 4.40 mmol, 1.10 eq) hinzugegeben und die Reaktionslösung für 18 h bei RT gerührt. Das THF wurde unter vermindertem Druck entfernt und die wässrige Phase mit EtOAc (3x20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt (1.80 g, 4.00 eq, quant.) wurde als farbloses Öl erhalten.



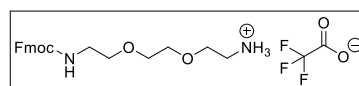
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 7.78-7.75 (d, *J* = 7.30 Hz, 2H), 7.61-7.59 (d, *J* = 7.30 Hz, 2H), 7.42-7.38 (t, *J* = 7.50 Hz, 2H), 7.34-7.28 (td, *J* = 7.40, 1.20 Hz, 2H), 4.42-4.40 (d, *J* = 7.00 Hz, 2H), 4.25-4.21 (t, *J* = 7.00 Hz, 1H), 3.62-3.52 (m, 8H), 3.41 (br. s, 2H), 3.33-3.29 (t, *J* = 4.90 Hz, 2H), 1.43 (s, 9H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 156.59, 156.09, 144.07, 141.40, 128.01, 127.13, 125.16, 120.05, 70.35, 70.28, 66.70, 65.24, 47.36, 41.03, 28.50.

Die spektroskopischen Daten stehen in Einklang mit der Literatur.^[169]

6.2.2.3 Synthese von 37

Basierend auf einer literaturbekannten Vorschrift wurde **47** (1.80 g, 4.00 mmol, 1.00 eq) in DCM (23 mL) gelöst. TFA (10 mL) würde hinzugefügt und für 30 min bei RT gerührt.



Anschließend wurden die Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, das Rohprodukt in DCM (5 mL) gelöst und über Nacht in Et₂O (200 mL) gefällt. Der weiße Feststoff wurde abfiltriert und *in vacuo* getrocknet. Das Produkt **37** (1.00 g, 2.80 mmol, 70%) wurde als weißer Feststoff erhalten.

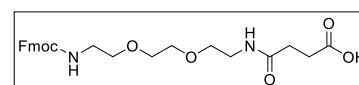
¹H-NMR (300 MHz, DMSO d₆): δ/ppm = 7.84-7.81 (d, *J* = 7.20 Hz, 2H), 7.68-7.66 (d, *J* = 7.40 Hz, 2H), 7.45-7.41 (t, *J* = 7.40 Hz, 2H), 7.36-7.31 (td, *J* = 7.40, 1.30 Hz, 2H), 4.40-3.38 (d, *J* = 6.80 Hz, 2H), 4.25-4.21 (t, *J* = 6.80 Hz, 1H), 3.76-3.67 (m, 8H), 3.17-3.14 (m, 2H), 3.12-3.08 (m, 2H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 158.04, 156.21, 143.90, 140.76, 127.62, 127.06, 125.14, 120.15, 69.66, 69.39, 69.09, 66.67, 65.31, 46.72, 40.05, 38.61.

Die spektroskopischen Daten stehen in Einklang mit der Literatur.^[169]

6.2.2.4 Synthese von 34

Basierend auf einer literaturbekannten Vorschrift wurde **37** (1.00 g, 2.80 mmol, 1.00 eq) mit Bernsteinsäureanhydrid



(311 mg, 3.10 mmol, 1.10 eq) in DCM (20 mL) gelöst. NEt₃ (1.30 mL, 9.20 mmol, 3.30 eq) wurde hinzugegeben und für 1 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit wässriger NaHSO₄ (5x15 mL, 0.5 M) gewaschen und die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, das Rohprodukt in 1 mL DCM gelöst und 10 mL H₂O zugegeben. Die zweiphasige Mischung wurde für 30 min im Ultraschallbad behandelt. Dieses Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Die wässrige Lösung wurde abdekantiert und das Lösungsmittel der organischen Phase unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt **34** (421 mg, 0.900 mmol, 32%) wurde als gelbes Öl erhalten.

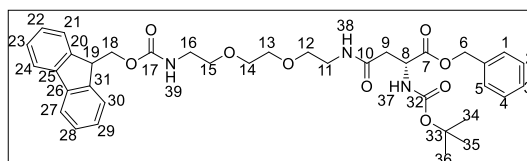
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 7.77-7.75 (d, *J* = 7.50 Hz, 2H), 7.61-7.55 (d, *J* = 7.40 Hz, 2H), 7.42-7.38 (t, *J* = 7.30 Hz, 2H), 7.33-7.28 (td, *J* = 7.40, 1.00 Hz, 2H), 4.47-4.41 (m, 2H), 4.26-4.22 (t, *J* = 6.60 Hz, 1H), 3.59-3.34 (m, 12H), 2.66 (br. s, 2H), 2.48-2.46 (m, 2H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 177.54, 173.30, 158.29, 143.81, 141.48, 127.93, 127.24, 125.00, 120.16, 70.45, 70.31, 69.98, 69.63, 67.71, 47.25, 41.52, 39.57, 31.37, 30.38.

Die spektroskopischen Daten stehen in Einklang mit der Literatur.^[169]

6.2.2.5 Synthese von **38**

Basierend auf einer literaturbekannten Vorschrift wurde Boc-Asp-OBzl (678 mg, 2.10 mmol, 1.00 eq), HOBt (284 mg, 2.10 mmol, 1.00 eq), EDC-HCl (651 mg, 4.20 mmol, 2.00 eq) in DCM



(20 mL) bei 0 °C gelöst und für 30 min gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus **37** (1.00 g, 2.10 mmol, 1.00 eq) in DCM (15 mL) und DiPEA (732 µL, 4.20 mmol, 2.00 eq) hinzugegeben und für 3 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit wässriger Zitronensäure (2x40 mL, 5%) und gesättigter NaCl-Lösung (2x40 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Isolation des Produkts erfolgte mittels Säulenchromatographie (EtOAc/DCM 4:1), so dass das Produkt **38** (1.00 g, 1.49 mmol, 71%) als farbloser, klebriger Feststoff erhalten wurde.

R_f (EtOAc/DCM, 4:1, KMnO₄) = 0.32

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 7.77-7.76 (d, J = 7.5 Hz 2H, 24-H, 27-H), 7.60-7.58 (d, J = 7.4 Hz, 2H, 21-H, 30-H), 7.41-7.38 (t, J = 7.5 Hz, 2H, 22-H, 29-H), 7.34-7.29 (m, 7H, 1-H, 2-H, 3-H, 4-H, 5-H, 23-H, 28-H), 6.06 (s, 1H, 38-H), 5.81-5.79 (m, 1H, 37-H), 5.36 (s, 1H, 39-H), 5.20-5.12 (m, 2H, 6-H), 4.54 (s, 1H, 8-H). 4.43-4.41 (d, J = 6.9 Hz, 2H, 18-H), 4.23-4.20 (t, J = 6.7 Hz, 1H, 19-H), 3.61-3.46 (m, 8H, 12-H, 13-H, 14-H, 15-H), 3.41-3.35 (m, 4H, 11-H, 16-H), 2.89-2.84 (m, 1H, 9-H), 2.69-2.63 (m, 1H, 9-H), 1.41 (s, 9H, 34-H, 35-H, 36-H).

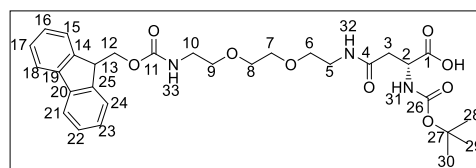
¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃) δ/ppm = 171.54 (7-C), 169.93 (10-C), 156.63 (17-C), 155.82 (32-C), 144.02 (25-C, 26-C), 141.43 (20-C, 30-C), 128.59 (2-C, 4-C), 128.33 (3-C), 128.20 (1-C, 5-C), 127.82 (22-C, 29-C), 127.17 (23-C, 28-C), 125.12 (21-C, 30-C), 120.10 (24-C, 27-C), 79.99 (33-C), 70.38 (13-C), 70.17 (14-C), 69.73 (12-C, 15-C), 67.34 (6-C), 66.64 (18-C), 50.68 (8-C), 47.37 (19-C), 40.98 (11-C), 39.31 (16-C), 37.86 (9-C), 28.41 (34-C, 35-C, 36-C).

HRMS (ESI): m/z berechnet für C₃₇H₄₅N₃O₉+Na⁺: 698.3048 [M +Na]⁺; gefunden: 698.3050.

IR: $\tilde{\nu}$ =3325 (b), 2974 (b), 2935 (b), 2881 (b) 1685 (s), 1647 (s), 1529 (s), 1450 (s) 1365 (s), 1252 (s), 1161 (s), 1105 (vs) 1055 (s), 739 (vs), 698 (s) cm⁻¹.

6.2.2.6 Synthese von 36

Basierend auf einer literaturbekannten Vorschrift wurde **38** (270 mg, 0.400 mmol, 1.00 eq) in MeOH (20 mL) gelöst und der Reaktionskolben mit Argon befüllt. Anschließend wurde Pd/C 10% (54.0 mg,



20%) hinzugegeben und unter starkem Rühren Et_3SiH (638 μL , 4.00 mmol, 10.0 eq) hinzugegeben. Nach Rühren für 10 min bei RT wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der ölige Rückstand wurde in DCM (10 mL) gelöst und die organische Phase mit gesättigter NaCl (2x20 mL) gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 , wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand in DCM (1 mL) aufgenommen. Hexan (10 mL) wurde vorsichtig hinzugegeben und die Mischung für 15 min ruhen gelassen. Die überstehende Lösung wurde entfernt und der Rückstand unter vermindertem Druck getrocknet, so dass das Produkt **36** in einer 11.5:1 Mischung mit Et_3SiH (140 mg, 0.239 mmol, 54%)* als weißer Feststoff erhalten wurde.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 7.77-7.75 (d, J = 7.50 Hz, 2H, 18-H, 21-H), 7.61-7.59 (d, J = 7.80 Hz, 2H, 15-H, 24-H), 7.41-7.38 (t, J = 7.40 Hz, 2H, 16-H, 23-H), 7.33-7.29 (t, J = 7.50 Hz, 2H, 17-H, 22-H), 6.71 (s, 0.61H, 32-H), 5.88-5.84 (d, J = 6.7 Hz, 1H, 31-H), 5.59 (s, 0.63H, 33-H), 4.46-4.41 (m, 3H, 2-H, 12-H), 4.23-4.21 (m, 1H, 13-H), 3.64-3.50 (m, 8H, 6-H, 7-H, 8-H, 9-H), 3.47-3.29 (m, 4H, 5-H, 10-H), 2.91-2.83 (m, 1H, 3-H), 2.68-2.59 (m, 1H, 3-H), 1.42 (s, 9H, 28-H, 29-H, 30-H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3) δ/ppm = 172.61 (1-C), 171.73 (4-C), 156.75 (11-C), 155.64 (26-C), 144.01 (19-C, 20-C), 141.44 (14-C, 25-C), 127.85 (16-C, 23-C), 127.20 (17-C, 22-C), 125.16 (15-C, 24-C), 120.12 (18-C, 21-C), 80.32 (26-C), 70.36 (6-C, 9-C), 66.71 (12-C), 50.51 (2-C), 47.36 (13-C), 39.79 (5-C, 10-C), 38.12 (3-C), 28.43 (28-C, 29-C, 30-C).

HRMS (ESI): m/z berechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_9+\text{Na}^+$: 608.2579 [$M+\text{Na}$] $^+$; gefunden: 608.2581.

IR: $\tilde{\nu}$ =3323 (b), 2962 (w), 2929 (w), 2873 (w), 1699 (vs), 1660 (s), 1523 (s), 1450 (s), 1365 (m), 1248 (s), 1157 (vs), 1101 (s), 852 (w), 760 (s), 741 (vs) cm^{-1} .

Schmelzpunkt: 67 °C

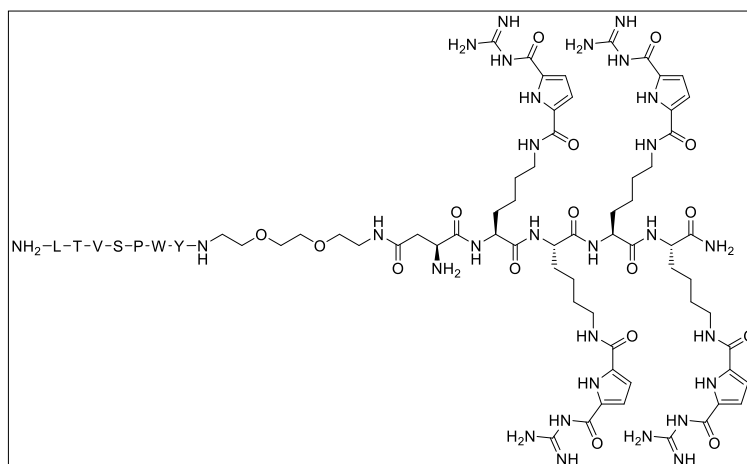
*Die Ausbeute wurde um eine Verunreinigung mit Et_3SiH korrigiert, welches aber während der Festphasenpeptidsynthese entfernt wurde, bei der **36** im Überschuss eingesetzt wurde.

6.2.3 Synthesen von weiteren Projekten

6.2.3.1 Synthese von 48

Das verfolgte Ziel war die zellspezifische Transfektion von Her-2/neu Brustkrebszellen in Anlehnung an die Literatur.^[186] Hierzu hätten SKOV-3 Zellen als Positivkontrolle verwendet werden können.^[187]

Die Festphasenpeptidsynthese von **48** wurde mit einer CEM Mikrowelle in einer 25.0 mL transparenten, Polyethylen Spritze mit einer Fritte durchgeführt. Als Harz wurde Fmoc-Rink-Amid (100 mg, 0.5 mmol/g) verwendet und in 5 mL DCM/DMF (1:1) für 2 h bei RT gequollen. Die erste Fmoc-



Abspaltung wurde durch Hinzufügen von einer 20% Lösung aus Piperidin in DMF (2x5 mL) und Mikrowellenbestrahlung für 1 min und 5 min bei 20 W mit einer maximalen Temperatur von 60 °C erreicht. Das Harz wurde mit DMF (6x5 mL) gewaschen. Für die Kupplung mit Fmoc-Lys(Alloc)-OH (67.9 mg, 0.150 mmol, 3.00 eq) wurde PyBOP (78.1 mg, 0.150 mmol, 3.00 eq), DiPEA (51.2 µL, 0.300 mmol, 6.00 eq) und DMF (5 mL) unter Argon Atmosphäre zum Harz gegeben und die Reaktionsmischung durch Mikrowellenbestrahlung bei 20 W und einer maximalen Temperatur von 60 °C für 20 min gekuppelt. Diese erste Kupplung wurde wiederholt, um einen vollständigen Umsatz zu erzielen. Das Harz wurde mit DMF (3x5 mL) gewaschen. Die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe und die Kupplung von Fmoc-Lys(Alloc)-OH für die zweite bis zur vierten Aminosäure wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Linkereinheit **36** (87.8.0 mg, 0.150 mmol, 3.00 eq) wurde mit PyBOP (78.1.0 mg, 0.150 mg, 3.00 eq) und DiPEA (51.2 µL, 0.300 mmol, 6.00 eq) in DMF (5 mL) unter Mikrowellenbestrahlung bei 20 W und einer maximalen Temperatur von 60 °C für 30 min gekuppelt. Nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe wurden der Reihe nach folgende Aminosäuren gekuppelt. Fmoc-Tyr(tBu)-OH (68.9 mg, 0.150 mmol, 3.00 eq), Fmoc-Trp(tBu) (79.0 mg, 0.150 mmol, 3.00 eq), Fmoc-Pro-OH (50.6 mg, 0.150 mmol, 3.00 eq), Fmoc-Val-OH (50.9 mg, 0.150 mmol, 3.00 eq; 2x30 min), Fmoc-Ser(tBu)-OH (57.5 mg, 0.150 mmol, 3.00 eq), Fmoc-Thr(tBu) (59.6 mg, 0.150 mmol, 3.00 eq; 2x10 min) und Boc-Leu-OH (34.7 mg, 0.150 mmol, 3.00 eq) mit PyBOP (je 78.1 mg, 0.150 mmol, 3.00 eq) und DiPEA (51.2 µL, 0.150 mmol, 6.00 eq) in DMF (je 5 mL) unter Mikrowellenbestrahlung bei 20 W und einer maximalen Temperatur von 60 °C für je 10 min gekuppelt, wenn nicht anders

angegeben. Das Harz wurde mit DCM gewaschen, *in vacuo* getrocknet und in ein rundes Schlenkgefäß mit Fritte überführt. Die Alloc-Schutzgruppen wurden mit Hilfe von Pd(PPh₃)₄ (28.9 mg, 0.0250 mmol, 0.500 eq) und PhSiH₃ (740 µL, 6.00 mmol, 120 eq) in DCM (2x5 mL, 45 min) bei RT unter Schütteln entfernt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Nachfolgend wurde das Harz mit DCM, DMF, 0.5% DiPEA/DMF, 0.2 M Diethyldithiocarbamat/DMF Lösung, MeOH, DCM und DMF (3x5 mL, 3 min) gewaschen. Die Kupplung der GCP-Gruppen wurde mit Hilfe von GCP(Boc)-OH*NEt₃ (239 mg, 0.600 mmol, 12.0 eq), PyBOP (312 mg, 0.600 mmol, 12.0 eq) und DiPEA (273 µL, 1.60 mmol, 32.0 eq) in DMF (8 mL) bei RT für 1 h durch Schütteln erreicht. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt und mittels Kaiser-Test kontrolliert. Anschließend wurde das Harz mit DMF, MeOH und DCM (je 3x5 mL), 3 min) gewaschen und unter Vakuum für 1 h getrocknet. Das Peptid wurde mit einer Mischung aus 10 mL TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) für 1 h bei RT von der festen Phase abgespalten. Dies wurde zweimal für 10 min wiederholt. Die vereinigten Abspalllösungen wurden unter Vakuum auf ca. 2 mL eingengt. Das Produkt wurde in 40 mL kaltem Et₂O gefällt, das ausgefallene Material zentrifugiert und erneut mit 40 mL kaltem Et₂O gewaschen. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Gefriertrocknung getrocknet. Das Produkt konnte mittels prep. HPLC mit einem Gradienten von 40 – 60% MeOH+0.1% TFA isoliert werden.

HRMS (ESI): m/z berechnet für C₁₀₅H₁₅₂N₃₆O₂₆+4H⁺: 584.5499 [M+4H]⁴⁺; gefunden: 584.5513.

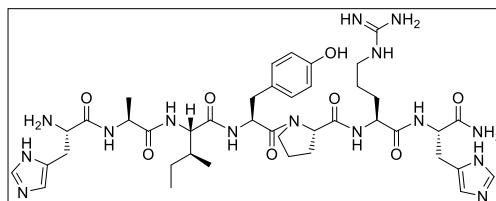
Reinheit ermittelt via RP-HPLC: (40 – 60% MeOH+0.1% TFA): 96%

Das Produkt konnte in einer entsprechenden Reinheit und Menge isoliert werden. Für biologische Messungen waren allerdings nicht die entsprechenden Zelllinien vorrätig, so dass es nicht zu einer Anwendung kam.

6.2.3.2 Synthese von HAIYPRH

Ziel war es eine Peptidsequenz für die Kupplung an Gossypol herzustellen.

Die Festphasensynthese von **49** wurde in einem runden Schlenkgefäß mit einer Fritte durchgeführt. Als Harz wurde Fmoc-Rink-Amid (400 mg, 0.500 mmol/g) verwendet und in 10 mL DCM/DMF (1:1) für 2 h bei RT gequollen. Die erste Fmoc-



Abspaltung wurde durch Hinzufügen von einer 20% Lösung aus Piperidin in DMF (2x5 mL) und Schütteln bei RT für 15 min unter Argon erreicht. Das Harz wurde mit DMF (6x5 mL) gewaschen. Anschließend wurden die Aminosäuren Fmoc-His(Trt)-OH (372 mg, 0.600 mmol, 3.00 eq), Fmoc-Arg(Pbf)-OH (389 mg, 0.600 mmol, 3.00 eq), Fmoc-Pro-OH (202 mg, 0.600 mmol, 3.00 eq), Fmoc-Tyr(tBu)-OH (276 mg, 0.600 mmol, 3.00 eq), Fmoc-Ile-OH (212 mg, 0.600 mmol, 3.00 eq), Fmoc-Ala-OH (187 mg, 0.600 mmol, 3.00 eq), Boc-His(Trt)-OH (299 mg, 0.600 mmol, 3.00 eq) mit HCTU (je 248 mg, 0.600 mmol, 3.00 eq) und DiPEA (je 205 µL, 1.20 mmol, 6.00 eq) für 1 h bei RT unter Schütteln gekuppelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF, MeOH und DCM (je 3x5 mL), 3 min) gewaschen und unter Vakuum für 1 h getrocknet. Das Peptid wurde mit einer Mischung aus 10 mL TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) für 1 h bei RT von der festen Phase abgespalten. Dies wurde zweimal für 10 min wiederholt. Die vereinigten Abspaltlösungen wurden unter Vakuum auf ca. 2 mL eingengt und unter Argon gesetzt. Das Produkt wurde in 40 mL kaltem Et₂O gefällt, das ausgefallene Material zentrifugiert und erneut mit 40 mL kaltem Et₂O gewaschen. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Gefriertrocknung getrocknet. Das Produkt konnte mittels prep. MPLC mit einem Gradienten von 10 – 100% MeOH+0.1% TFA isoliert werden.

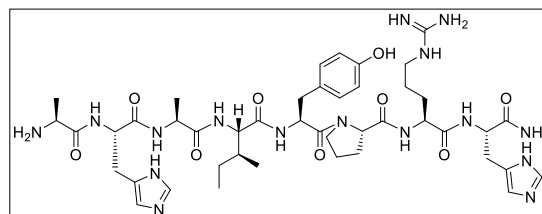
HRMS (ESI): m/z berechnet für C₄₁H₆₁N₁₅O₈+2H⁺: 446.7487 [M+2H]²⁺; gefunden: 446.7490.

Reinheit ermittelt via RP-HPLC: (10 – 100% MeOH+0.1% TFA): 98%

6.2.3.3 Synthese von AHAIYPRH

Ziel war es eine Peptidsequenz mit stabilerer Imin-Bindung zu Gossypol zu synthetisieren.

Die Festphasenpeptidsynthese von **50** wurde mit einer CEM Mikrowelle in einer 25.0 mL transparenten, Polyethylen Spritze mit einer Fritte durchgeführt. Als Harz wurde Fmoc-Rink-Amid (400 mg, 0.5 mmol/g) verwendet und in 10 mL DCM/DMF (1:1) für 2 h bei RT gequollen.



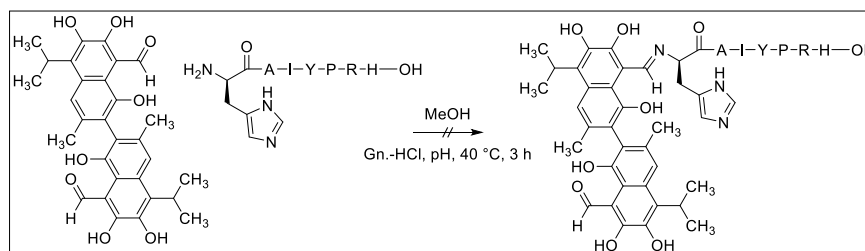
Die erste Fmoc-Abspaltung wurde durch Hinzufügen von einer 20% Lösung aus Piperidin in DMF (2x5 mL) und Mikrowellenbestrahlung für 1 min und 5 min bei 20 W mit einer maximalen Temperatur von 60 °C erreicht. Das Harz wurde mit DMF (6x5 mL) gewaschen. Anschließend wurden die Aminosäuren Fmoc-His(Trt)-OH (372 mg, 0.600 mmol, 3.00 eq), Fmoc-Arg(Pbf)-OH (389 mg, 0.600 mmol, 3.00 eq), Fmoc-Pro-OH (202 mg, 0.600 mmol, 3.00 eq), Fmoc-Tyr(tBu)-OH (276 mg, 0.600 mmol, 3.00 eq), Fmoc-Ile-OH (212 mg, 0.600 mmol, 3.00 eq), Fmoc-Ala-OH (187 mg, 0.600 mmol, 3.00 eq), Fmoc-His(Trt)-OH (372 mg, 0.600 mmol, 3.00 eq), Boc-Ala-OH (142 mg, 0.600 mmol, 3.00 eq) mit HCTU (je 248 mg, 0.600 mmol, 3.00 eq) und DiPEA (je 205 μ L, 1.20 mmol, 6.00 eq) unter Mikrowellenbestrahlung bei 20 W und einer maximalen Temperatur von 60 °C für 20 min gekuppelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF, MeOH und DCM (je 3x5 mL), 3 min) gewaschen und unter Vakuum für 1 h getrocknet. Das Harz wurde in ein rundes Schlenkgefäß mit Fritte gegeben und das Peptid mit einer Mischung aus 10 mL TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) für 1 h bei RT von der festen Phase abgespalten. Dies wurde zweimal für 10 min wiederholt. Die vereinigten Abspalllösungen wurden unter Vakuum auf ca. 2 mL eingeeengt und unter Argon gesetzt. Das Produkt wurde in 40 mL kaltem Et₂O gefällt, das ausgefallene Material zentrifugiert und erneut mit 40 mL kaltem Et₂O gewaschen. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Gefriertrocknung getrocknet. Das Produkt konnte mittels prep. HPLC mit einem Gradienten von 10 – 100% MeOH+0.1% TFA isoliert werden.

LRMS (ESI): m/z berechnet für C₄₄H₆₆N₁₆O₉+H⁺: 963.5 [M+H]⁺; gefunden: 963.5.

6.2.3.4 Gossypol Konjugation mit HAIYPRH

Ziel war es das Peptid über ein Imin mit Gossypol zu verknüpfen was in Anlehnung an Kumar *et al.* selektiv die Toxizität an definierten Krebszelllinien erhöht.^[188] Die Peptidsequenz sollte entsprechend ihres Bindungsverhaltens an TfR-überexprimierende Zellen binden. Eine labile Verbindung zwischen Peptid und Gossypol war notwendig, um das Freisetzen des Wirkstoffes innerhalb der Zelle zu ermöglichen.

Die Synthese der Gossypol Konjugation sollte in Anlehnung an die Literatur von Maity *et al.* mit einer kürzeren Peptidsequenz durch-



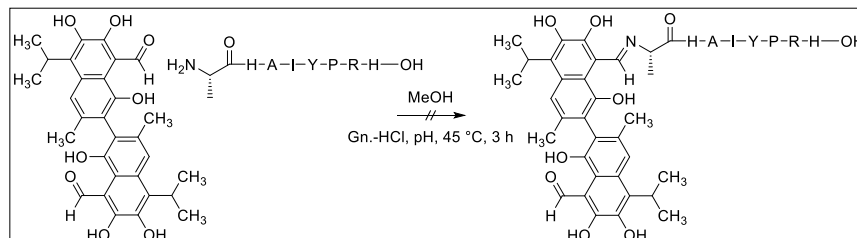
geführt werden. Hierzu wurde Gossypol (3.4 mg, 6.56 μmol , 5.80 eq) in MeOH (500 μL) gelöst, mit einer Lösung aus Peptid **49** (1.00 mg, 1.12 μmol , 1.00 eq) in einem Guanidin-HCl-Puffer (pH 5, 75.0 μL) versetzt und für bis zu 3 h bei 40 °C erhitzt. Um die Dauer der Reaktion einzuschätzen wurden zeitabhängige HPLC-Läufe durchgeführt. Hierzu wurde alle 30 min eine Probe von 5 μL entnommen und in einer Mischung aus MeOH/Wasser/0.1% TFA (100 μL , 1/1) verdünnt und mit einem Gradienten von 50 – 100% MeOH+0.1% TFA über 15 min getrennt. Nach einer Reaktionszeit von 3 h war das maximale Integral für die Bildung einer neuen Spezies erreicht. In weiteren Versuchen unter gleichen Bedingungen wurde die gesamte Reaktionslösung nach 3 h mit MeOH/H₂O/0.1% TFA (1:1, 4 mL) verdünnt und mittels präparativer-HPLC die neuen Fraktionen von den bekannten abgetrennt. Nach Zusammenführen der Produktfraktionen wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden zwei verschiedene Stoffe erhalten, welche farblich voneinander unterschieden werden konnten. Beide konnten als die Edukte (Peptid, weißer Feststoff und Gossypol, gelber Feststoff) mittels HPLC identifiziert werden. Es wurde geschlussfolgert, dass es zu einer Zersetzung des Produktes während der Entfernung des Lösemittels gekommen sein musste. Somit wurde Versucht eine säurebedingte Spaltung des Imins durch eine Anpassung der TFA-Menge zu verhindern. Eine Verringerung des TFA-Gehalts von 0.1% auf 0.05% zeigte keine jedoch keinen Erfolg. HPLC-Versuche zeigten, dass eine Trennung ohne die Säure nicht möglich war.

Eine Isolation des Produktes war somit nicht möglich. Es wurde vermutet, dass dies mit der zu geringen Stabilität der Imin-Bindung zusammenhing. Ein Vergleich zu Maity *et al.* zeigte, dass eventuell die Erweiterung der Peptidkette um Alanin einen Erfolg herbeiführen könnte.^[188]

6.2.3.5 Gossypol Konjugation mit AHAIYPRH

Es wurde versucht die Stärke der Imin-Bindung, zwischen Peptid und Gossypol durch das Einbringen einer sterisch weniger anspruchsvollen Aminosäure wie Alanin, zu erhöhen.

Die Synthese der Gossypol Konjugation sollte in Anlehnung an die Literatur von Maity *et al.* mit einer kürzeren Peptidsequenz durch-



geführt werden. Hierzu wurde Gossypol (2.12 mg, 6.56 μ mol, 5.80 eq) in MeOH (500 μ L) gelöst, mit einer Lösung aus Peptid **50** (1.00 mg, 0.705 μ mol, 1.00 eq) in einem Guanidin-HCl-Puffer (pH 5, 75.0 μ L) versetzt und für bis zu 3 h bei 45 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wurde mit MeOH/H₂O/0.05% TFA (7/3, 4.00 mL) verdünnt und präparativ mit einem Gradienten von 70 –100% MeOH+0.1% TFA mittels HPLC getrennt. Die Entfernung des Lösemittels wurde diesmal bei einer geringeren Temperatur von 35 °C durchgeführt und nicht bis zur vollständigen Trockenheit. Das verbleibende Lösemittel, vor allem bestehend aus H₂O (pH = 1), wurde mittels Gefriertrocknung entfernt. Erneut wurden nur die beiden Edukte erhalten. Der Einfluss der Säure könnte demnach immer noch für die Spaltung des Imins verantwortlich sein, weshalb alle isolierten Fraktionen in einem erneuten Versuch mit einer äquimolaren Menge Pyridin versetzt wurden. Nach Entfernung des Lösemittels unter vermindertem Druck, wurde der hochviskose Feststoff in MeOH (0.500 mL) gelöst und in MTBE (10 mL) gefällt. Der ausgefallene Feststoff wurde zentrifugiert, das organische Lösemittel dekantiert. in H₂O (10 mL) gelöst und mittels Gefriertrocknung getrocknet. Der erhaltene Feststoff konnte jedoch nicht als das gewünschte Produkt mittels NMR oder HPLC identifiziert werden.

Die labile Imin-Bindung konnte nicht durch das Einbringen von Alanin signifikant stabilisiert werden. Eine Änderung der Verbindung von Imin zu Hydrazon wurde erwogen, aus Zeitgründen jedoch nicht weiter verfolgt.

6.2.3.6 Synthese von Fmoc-Dap(NBD)-OH

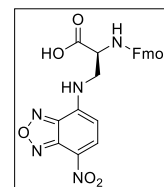
Ziel war die Synthese eines kleinen, fluoreszierenden Bausteins für einen Einsatz in der Festphasenpeptidsynthese und letztendlich in der Markierungen eines Transfektionsvektors.

Die Synthese von **51** wurde in Anlehnung an die Literatur durchgeführt.^[189]

Hierzu wurde NBD-Cl (200 mg, 0.613 mmol, 1.00 eq) in 16 mL MeOH gelöst und Fmoc-Dap-OH (184 mg, 0.920 mmol, 1.50 eq) in 5 mL H₂O zugegeben.

Anschließend wurde NaHCO₃ (154 mg, 1.93 mmol, 3 eq) in 10 mL zur Reaktionslösung gegeben und bei 55 °C für 2.5 h gerührt. Die

Reaktionslösung wurde mit HCl (aq., 1 M) versetzt, bis pH 2 erreicht wurde. Die Reaktionslösung wurde mit Et₂O (3x30 mL) extrahiert, die vereinten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde auf SiO₂ aufgetragen und mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH 10:1 → DCM/MeOH/AcOH 10:1:0.1) aufgetrennt. Das Produkt wurde als intensiv orangener Feststoff (220 mg, 0.450 mmol, 73%) erhalten.



R_f (DCM/MeOH, 10:1, Vanillin) = 0.42

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 8.44-8.42 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.86-7.83 (dd, *J* = 7.4 Hz, 3.1 Hz, 2H), 7.63-7.59 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.39-7.34 (m, 2H), 7.26-7.22 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.20-7.18 (d, 7.4 Hz, 1H), 6.47-6.44 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.28-4.13 (m, 4H), 3.78 (br. s, 2H).

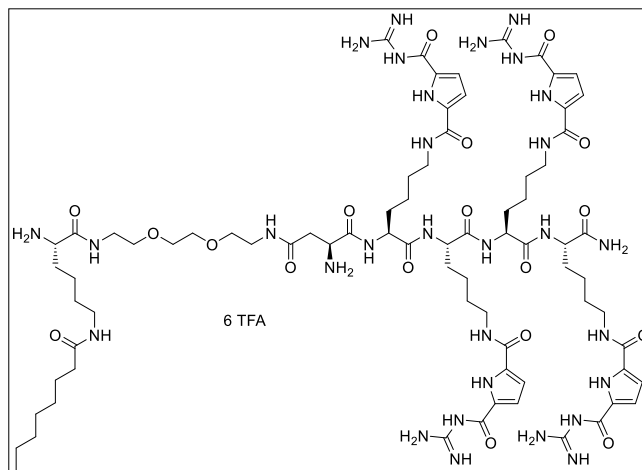
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 155.91, 145.21, 144.35, 143.97, 143.76, 140.66, 137.82, 127.56, 127.00, 126.96, 125.11, 125.07, 120.64, 120.08, 99.42, 65.64, 54.16, 46.61, 45.72.

Die Verbindung wurde in der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt. Das Peptid konnte jedoch nicht erfolgreich synthetisiert/isoliert werden.

6.2.3.7 Synthese von Lys₄(GCP)-EDS(+)-Lys(Oktansäure)

Das zu synthetisierende Peptid **52** sollte im Vergleich zu dem zellspezifischen Transfektionsvektor **41** einen besseren Vergleich zwischen Positiv- und Negativkontrolle ermöglichen. Ein hydrophober Rest, wie Oktansäure, weist eine deutlich höhere, chemische Ähnlichkeit zu Biotin auf.

Die Festphasenpeptidsynthese von **52** wurde mit einer CEM Mikrowelle in einer 25.0 mL transparenten, Polyethylen Spritze mit einer Fritte durchgeführt. Als Harz wurde Fmoc-Rink-Amid (268 mg, 0.360 mmol/g) verwendet und in 10 mL DCM/DMF (1:1) für 2 h bei RT gequollen. Die erste Fmoc-Abspaltung wurde durch Hinzufügen von einer 20% Lösung aus Piperidin in DMF (2x5 mL) und Mikrowellenbestrahlung für 1 min



und 5 min bei 20 W mit einer maximalen Temperatur von 60 °C erreicht. Das Harz wurde mit DMF (6x5 mL) gewaschen. Für die Kupplung mit Fmoc-Lys(Alloc)-OH (131 mg, 0.288 mmol, 3.00 eq) wurde HCTU (120 mg, 0.288 mmol, 3.00 eq), DiPEA (98.8 µL, 0.576 mmol, 6.00 eq) und DMF (7 mL) unter Argon Atmosphäre zum Harz gegeben und die Reaktionsmischung durch Mikrowellenbestrahlung bei 20 W und einer maximalen Temperatur von 60 °C für 30 min. Das Harz wurde mit DMF (3x5 mL) gewaschen. Die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe und die Kupplung von Fmoc-Lys(Alloc)-OH für die zweite bis zur vierten Aminosäure wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Linkereinheit **36** (169 mg, 0.288 mmol, 3.00 eq) wurde mit HCTU (120 mg, 0.288 mg, 3.00 eq) und DiPEA (98.8 µL, 0.576 mmol, 6.00 eq) in DMF (7 mL) unter Mikrowellenbestrahlung bei 20 W und einer maximalen Temperatur von 60 °C gekuppelt. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde entfernt und das Harz mit DMF (6x5 mL) gewaschen. Anschließend wurde Boc-Lys(Fmoc)-OH (136 mg, 0.288 mmol, 3.00 eq) mit HCTU (120 mg, 0.288 mmol, 3.00 eq) und DiPEA (98.8 µL, 0.576 mmol, 6.00 eq) in DMF (7 mL) für 30 min bei 20 W Mikrowellenbestrahlung und einer maximalen Temperatur von 60 °C gekuppelt. Nach Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe wurde Oktansäure (45.9 µL, 0.288 mmol, 3.00 eq) mit PyBOP (151 mg, 0.288 mmol, 3.00 eq) und DiPEA (98.8 µL, 0.576 mmol, 6.00 eq) in DMF (6 mL) unter Mikrowellenbestrahlung bei 20 W, einer Maximaltemperatur von 60 °C für 30 min gekuppelt. Das Harz wurde mit DCM gewaschen, *in vacuo* getrocknet und in ein rundes Schlenkgefäß mit Fritte überführt. Die Alloc-Schutzgruppen wurden mit Hilfe von Pd(PPh₃)₄ (55.7 mg, 0.0480 mmol, 0.500 eq) und PhSiH₃ (1.43 mL, 11.5 mmol, 120 eq) in DCM (2x7 mL, 45 min)

bei RT unter Schütteln entfernt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Nachfolgend wurde das Harz mit DCM, DMF, 0.5% DiPEA/DMF, 0.2 M Diethyldithiocarbamat/DMF Lösung, MeOH, DCM und DMF (3x5 mL, 3 min) gewaschen. Die Kupplung der GCP-Gruppen wurde mit Hilfe von GCP(Boc)-OH*NEt₃ (460 mg, 1.15 mmol, 12.0 eq), PyBOP (603 mg, 1.15 mmol, 12.0 eq) und DiPEA (527 µL, 2.30 mmol, 32.0 eq) in DMF (8 mL) bei RT für 1 h durch Schütteln erreicht. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt und mittels Kaiser-Test kontrolliert. Anschließend wurde das Harz mit DMF, MeOH und DCM (je 3x5 mL), 3 min gewaschen und unter Vakuum für 1 h getrocknet. Das Peptid wurde mit einer Mischung aus 10 mL TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) für 1 h bei RT von der festen Phase abgespalten. Dies wurde zweimal für 10 min wiederholt. Die vereinigten Abspalllösungen wurden unter Vakuum auf ca. 2 mL eingengt und unter Argon gesetzt. Das Produkt wurde in 40 mL kaltem Et₂O gefällt, das ausgefallene Material zentrifugiert und erneut mit 40 mL kaltem Et₂O gewaschen. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Gefriertrocknung getrocknet.

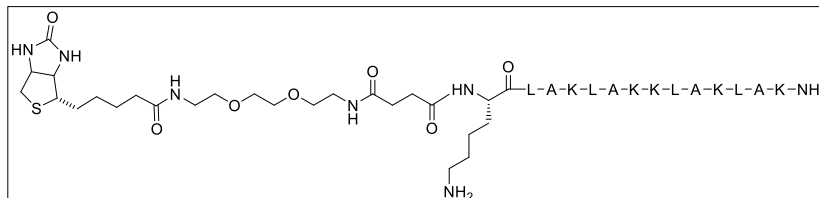
HRMS (ESI): m/z berechnet. für C₇₆H₁₂₀N₃₀O₁₈+H⁴⁺: 436.2422 [M+4]⁴⁺; gefunden: 436.2430.

Es wurden vor der Anwendung nur eine unzureichende Menge und Reinheit der Verbindung isoliert, so dass keine biologischen Experimente unternommen wurden.

6.2.3.8 Synthese von Biotin-EDS-KLAKLAKKLAKLAK

Die (KLAKLAK)₂-Sequenz sollte durch die Verknüpfung an Biotin in Zellen aufgenommen werden und zu einer erhöhten Toxizität an Zielzellen führen, welche einen Biotin Rezeptor aufweisen.^[190]

Die Festphasenpeptid-synthese von **53** wurde mit einer CEM Mikrowelle in einer 25.0 mL transparenten, Polyethylen



Spritze mit einer Fritte durchgeführt. Als Harz wurde Fmoc-Rink-Amid (500 mg, 0.500 mmol/g) verwendet und in 10 mL DCM/DMF (1:1) für 2 h bei RT gequollen. Die erste Fmoc-Abspaltung wurde durch Hinzufügen von einer 20% Lösung aus Piperidin in DMF (2x5 mL) und Mikrowellenbestrahlung für 1 min und 5 min bei 20 W mit einer maximalen Temperatur von 60 °C erreicht. Das Harz wurde mit DMF (6x5 mL) gewaschen. Anschließend wurden die drei Aminosäuren Fmoc-Lys(Boc)-OH (351 mg, 0.750 mmol, 3.00 eq), Fmoc-Ala-OH (233 mg, 0.750 mmol, 3.00 eq) und Fmoc-Leu-OH (265 mg, 0.750 mmol, 3.00 eq) je mit HCTU (310 mg, 0.750 mmol, 3.00 eq) und DiPEA (384 µL, 2.25 mmol, 9.00 eq) in DMF (7 mL) in folgender Reihenfolge bei Mikrowellenbestrahlung von 20 W, einer Maximaltemperatur von 60 °C für 30 min gekuppelt. Die Reihenfolge der Aminosäuren lautet Lys-Ala-Leu-Lys-Ala-Leu-Lys-Lys-Ala-Leu-Lys-Ala-Leu-Lys. Nach den erfolgreichen Kupplungsschritten wurde die Linkereinheit **36** (353 mg, 0.750 mmol, 3.00 eq) mit HCTU (310 mg, 0.750 mmol, 3.00 eq) und DiPEA (384 µL, 2.25 mmol, 9.00 eq) in DMF (7 mL) unter Mikrowellenbestrahlung bei 20 W einer Maximaltemperatur von 60 °C für 30 min gekuppelt. Anschließend wurde das Harz mit DCM gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in ein rundes Schlenkgefäß mit Fritte überführt. Nach Entfernung der letzten Fmoc-Schutzgruppe unter den beschriebenen Bedingungen, wurde Biotin (183 mg, 0.750 mmol, 3.00 eq) mit HCTU (310 mg, 0.750 mmol, 3.00 eq) und DiPEA (384 µL, 2.25 mmol, 9.00 eq) in DMF (8 mL) für 1 h bei RT unter Schütteln gekuppelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF, MeOH und DCM (je 3x5 mL), 3 min) gewaschen und unter Vakuum für 1 h getrocknet. Das Peptid wurde mit einer Mischung aus 10 mL TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) für 1 h bei RT von der festen Phase abgespalten. Dies wurde zweimal für 10 min wiederholt. Die vereinigten Abspalllösungen wurden unter Vakuum auf ca. 2 mL eingeeengt und unter Argon gesetzt. Das Produkt wurde in 40 mL kaltem Et₂O gefällt, das ausgefallene Material zentrifugiert und erneut mit 40 mL kaltem Et₂O gewaschen. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Gefriertrocknung getrocknet. Das Produkt konnte mittels prep. HPLC mit einem Gradienten von 60 – 80% MeOH+0.1% TFA isoliert werden.

HRMS (ESI): m/z berechnet für $C_{92}H_{171}N_{25}O_{20}S+4H^{4+}$: 495.8293 $[M+4H]^{4+}$; gefunden: 495.8318.

Reinheit ermittelt via RP-HPLC: (60 – 80% MeOH+0.1% TFA): 82%

Zellexperimente zeigten einen umgekehrten Verlauf der Toxizität als erwartet. Hierbei wurde eine erhöhte Überlebensrate von HeLa-Zellen (BR+) im Vergleich zu HEK293t (BR-) gemessen.

6.2.3.9 Synthese von KLAKLAKKLAKLAK-HAIYPRH

In diesem Fall wurde die gleiche Wirkung wie zuvor angestrebt, jedoch mit einem anderen Label. Die Peptidsequenz sollte an den Tf-Rezeptor binden und so in die Zellen aufgenommen werden.

Die Festphasenpeptidsynthese von **54** wurde mit einer CEM Mikrowelle in einer 25.0 mL transparenten, Polyethylen Spritze mit einer Fritte durchgeführt. Als Harz wurde Fmoc-Rink-Amid (400 mg, 0.600 mmol/g) verwendet und in 10 mL DCM/DMF (1:1) für 2 h bei RT gequollen. Die erste Fmoc-Abspaltung wurde durch Hinzufügen von einer 20% Lösung aus Piperidin in DMF (2x5 mL) und Mikrowellenbestrahlung für 1 min und 5 min bei 20 W mit einer maximalen Temperatur von 60 °C erreicht. Das Harz wurde mit DMF (6x5 mL) gewaschen. Anschließend wurden die folgenden Aminosäuren in der angegebenen Reihenfolge nacheinander unter Mikrowellenbestrahlung von 20 W, einer Maximaltemperatur von 60 °C für je 30 min gekuppelt. Fmoc-His(Trt)-OH (446 mg, 0.720 mmol, 3.00 eq), Fmoc-Arg(Pbf)-OH (467 mg, 0.720 mmol, 3.00 eq), Fmoc-Pro-OH (243 mg, 0.720 mmol, 3.00 eq), Fmoc-Tyr(tBu)-OH (331 mg, 0.720 mmol, 3.00 eq), Fmoc-Ile-OH (254 mg, 0.720 mmol, 3.00 eq), Fmoc-Ala-OH (224 mg, 0.720 mmol, 3.00 eq) und erneut Fmoc-His(Trt)-OH (gleiche Einwaage wie zuvor) jeweils mit HCTU (298 mg, 0.720 mmol, 3.00 eq) und DiPEA (246 µL, 1.44 mmol, 6.00 eq) in DMF (7 mL). Nach erfolgreicher Kupplung der sieben Aminosäuren wurde die nachfolgende Peptidsequenz angehängt. Bestehend aus Fmoc-Lys(Boc)-OH (337 mg, 0.720 mmol, 3.00 eq), Fmoc-Ala-OH (224 mg, 0.720 mmol, 3.00 eq), Fmoc-Leu-OH (255 mg, 0.720 mmol, 3.00 eq) in wurde die Sequenz Lys-Ala-Leu-Lys-Ala-Leu-Lys-Lys-Ala-Leu-Lys-Ala-Leu mit HCTU (298 mg, 0.720 mmol, 3.00 eq) und DiPEA (246 µL, 1.44 mmol, 6.00 eq) in DMF (8 mL) unter Mikrowellenbestrahlung bei 20 W, einer Maximaltemperatur von 60 °C, für je 30 min gekuppelt. Nach der letzten Fmoc-Entschützung wurde und Boc-Lys(Boc)-OH (380 mg, 0.720 mmol, 3.00 eq) in DMF (8 mL) unter den gleichen Bedingungen gekuppelt. Anschließend wurde das Harz mit DCM gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in ein rundes Schlenkgefäß mit Fritte überführt. Anschließend wurde das Harz mit DMF, MeOH und DCM (je 3x5 mL), 3 min) gewaschen und unter Vakuum für 1 h getrocknet. Das Peptid wurde mit einer Mischung aus 10 mL TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) für 1 h bei RT von der festen Phase abgespalten. Dies wurde zweimal für 10 min wiederholt. Die vereinigten Abspalllösungen wurden unter Vakuum auf ca. 2 mL eingeeengt und unter Argon gesetzt. Das Produkt wurde in 40 mL kaltem Et₂O gefällt, das ausgefallene Material zentrifugiert und erneut mit 40 mL kaltem Et₂O gewaschen. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Gefriertrocknung getrocknet.

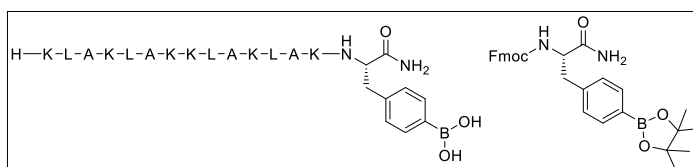
HRMS (ESI): m/z berechnet für C₁₁₃H₁₉₇N₃₅O₂₂+4H⁴⁺: 600.3923 [M+4H]⁴⁺; gefunden: 600.3954.

Toxizitätsmessungen zu diesem Produkt stehen noch aus.

6.2.3.10 KLAKLAKKLAKLAK-Phe(OBPin)

Das Konzept dieser Arbeit war eine Verknüpfung von verschiedenen Diolen an die Boronsäure, um schnell eine breite Anzahl verschiedener Verbindungen überprüfen zu können.^[191] Hierbei sollte das GCP-Motiv zum Einsatz kommen und so eine Aufnahme des Peptids in Zellen ermöglichen.^[192] Die Peptidsequenz sollte dann zu einer erhöhten Toxizität führen.^[190]

Die Festphasenpeptidsynthese von **55** wurde mit einer CEM Mikrowelle in einer 25.0 mL transparenten, Polyethylen Spritze mit einer Fritte durchgeführt. Als Harz wurde Fmoc-



Rink-Amid (250 mg, 0.360 mmol/g) verwendet und in 10 mL DCM/DMF (1:1) für 2 h bei RT gequollen. Die erste Fmoc-Abspaltung wurde durch Hinzufügen von einer 20% Lösung aus Piperidin in DMF (2x5 mL) und Mikrowellenbestrahlung für 1 min und 5 min bei 20 W mit einer maximalen Temperatur von 60 °C erreicht. Das Harz wurde mit DMF (6x5 mL) gewaschen. Anschließend wurde die Aminosäure Fmoc-Phe(BPin)-OH (139 mg, 0.270 mmol, 3.00 eq, Strukturformel s.o.) mit HCTU (112 mg, 0.270 mmol, 3.00 eq) mit DiPEA (92.2 µL, 0.540 mmol, 6.00 eq) in DMF (6 mL) unter Mikrowellenbestrahlung von 20 W, einer Maximaltemperatur von 60 °C für 30 min gekuppelt. Nach erfolgreicher Kupplung wurde die Fmoc-Schutzgruppe wie bereits beschrieben entfernt. Die Aminosäuren Fmoc-Lys(Boc)-OH (127 mg, 0.270 mmol, 3.00 eq), Fmoc-Ala-OH (84.1 mg, 0.270 mmol, 3.00 eq), Fmoc-Leu-OH (95.4 mg, 0.270 mmol, 3.00 eq) in wurde die Sequenz Lys-Ala-Leu-Lys-Ala-Leu-Lys-Lys-Ala-Leu-Lys-Ala-Leu mit HCTU (112 mg, 0.270 mmol, 3.00 eq) und DiPEA (92.2 µL, 0.540 mmol, 6.00 eq) in DMF (6 mL) unter Mikrowellenbestrahlung bei 20 W, einer Maximaltemperatur von 60 °C, für je 30 min gekuppelt. Nach Entfernung der letzten Fmoc-Schutzgruppe wurde die Aminosäure Boc-Lys(Boc)-OH (93.5 mg, 0.270 mmol, 3.00 eq) unter den gleichen Bedingungen wie zuvor gekuppelt. Anschließend wurde das Harz mit DCM gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in ein rundes Schlenkgefäß mit Fritte überführt. Das Harz wurde mit DMF, ACN und DCM (je 3x5 mL, 3 min) gewaschen und unter Vakuum für 1 h getrocknet. Das Peptid wurde mit einer Mischung aus 10 mL TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) für 1 h bei RT von der festen Phase abgespalten. Dies wurde zweimal für 10 min wiederholt. Die vereinigten Abspalllösungen wurden unter Vakuum auf ca. 2 mL eingeeengt und unter Argon gesetzt. Das Produkt wurde in 40 mL kaltem Et₂O gefällt, das ausgefallene Material zentrifugiert und erneut mit 40 mL kaltem Et₂O gewaschen. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Gefriertrocknung getrocknet. Das Hauptprodukt der Synthese konnte mittels prep. HPLC mit einem Gradienten von 10 – 100% MeOH+0.1% TFA isoliert werden.

HRMS (MALDI): m/z berechnet für C₈₁H₁₄₉BN₂₂O₁₇: 1714.165 [M]; gefunden: 1709.172.

Reinheit ermittelt via RP-HPLC: (10 – 100% MeOH+0.1% TFA): 97%

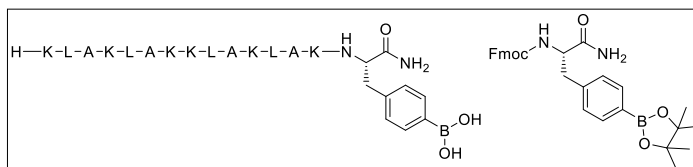
Massenspektren zeigten nach Isolation des Produktes die Oxidation des Boratoms zum aromatischen Alkohol. Es wurde vermutet, dass dies durch die harschen Bedingungen während der Mikrowellen-gestützten Synthese hervorgerufen wurde.

HRMS (MALDI): m/z berechnet für $C_{81}H_{148}N_{22}O_{16}$: 1686.152 [M]; gefunden: 1686.191.

6.2.3.11 KLAKLAKKLAKLAK-Phe(OBPIn)

Die Synthese des gleichen Peptids wie zuvor sollte ohne Mikrowellenstrahlung durchgeführt werden.

Die Festphasensynthese von **55** wurde in einem runden Schlenkgefäß mit einer Fritte durchgeführt. Als Harz wurde Fmoc-Rink-Amid (250 mg, 0.360 mmol/g)



verwendet und in 10 mL DCM/DMF (1:1) für 2 h bei RT gequollen. Die erste Fmoc-Abspaltung wurde durch Hinzufügen von einer 20% Lösung aus Piperidin in DMF (2x5 mL) und Schütteln bei RT für 15 min unter Argon erreicht. Das Harz wurde mit DMF (6x5 mL) gewaschen. Das Harz wurde mit DMF (6x5 mL) gewaschen. Anschließend wurde die Aminosäure Fmoc-Phe(BPin)-OH (231 mg, 0.450 mmol, 5.00 eq, Strukturformel s.o.) mit HCTU (187 mg, 0.450 mmol, 3.00 eq) mit DiPEA (150 µL, 0.900 mmol, 10.0 eq) in DMF (8 mL) unter Schütteln bei RT für 1 h gekuppelt. Nach erfolgreicher Kupplung wurde die Fmoc-Schutzgruppe wie bereits beschrieben entfernt. Die Aminosäuren Fmoc-Lys(Boc)-OH (211 mg, 0.450 mmol, 5.00 eq), Fmoc-Ala-OH (140 mg, 0.450 mmol, 5.00 eq), Fmoc-Leu-OH (159 mg, 0.450 mmol, 5.00 eq) in wurde die Sequenz Lys-Ala-Leu-Lys-Ala-Leu-Lys-Lys-Ala-Leu-Lys-Ala-Leu mit HCTU (187 mg, 0.450 mmol, 5.00 eq) und DiPEA (150 µL, 0.900 mmol, 10.0 eq) in DMF (8 mL) unter Schütteln bei RT, für je 1 h gekuppelt. Nach Entfernung der letzten Fmoc-Schutzgruppe wurde die Aminosäure Boc-Lys(Boc)-OH (156 mg, 0.450 mmol, 5.00 eq) unter den gleichen Bedingungen wie zuvor gekuppelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF, ACN und DCM (je 3x5 mL, 3 min) gewaschen und unter Vakuum für 1 h getrocknet. Das Peptid wurde mit einer Mischung aus 10 mL TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) für 1 h bei RT von der festen Phase abgespalten. Dies wurde zweimal für 10 min wiederholt. Die vereinigten Abspaltlösungen wurden unter Vakuum auf ca. 2 mL eingengt und unter Argon gesetzt. Das Produkt wurde in 40 mL kaltem Et₂O gefällt, das ausgefallene Material zentrifugiert und erneut mit 40 mL kaltem Et₂O gewaschen. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Gefriertrocknung getrocknet. Das Hauptprodukt konnte mittels prep. HPLC mit einem Gradienten von 20 – 80% MeOH+0.1% TFA isoliert werden

HRMS (MALDI): m/z berechnet für C₈₁H₁₄₉BN₂₂O₁₇: 1714.165 [M]; gefunden: 1709.172.

Reinheit ermittelt via RP-HPLC: (20 – 80% MeOH+0.1% TFA): 97%

Massenspektren zeigten nach Isolation des Produktes die Oxidation des Boratoms zum aromatischen Alkohol.

HRMS (MALDI): m/z berechnet für C₈₁H₁₄₈N₂₂O₁₆: 1686.191 [M+H]⁺; found: 1686.121.

Eine Literaturrecherche zeigte, dass dies umgangen werden könnte, wenn die Schutzgruppe (Pinacol-Ester) der Boronsäure durch einen Pinandiol-Ester ersetzt würde.^[193]

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] American Cancer Society, *Cancer Facts & Figures 2021*, Atlanta, **2021**.
- [2] C. P. Wild, E. Weiderpass, B. W. Stewart, *World Cancer Report. Cancer research for cancer prevention*, International Agency for Research on Cancer, Lyon, Frankreich, **2020**.
- [3] D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, *Nature Nanotech* **2007**, *2*, 751.
- [4] G. Pistritto, D. Trisciuglio, C. Ceci, A. Garufi, G. D'Orazi, *Aging* **2016**, *8*, 603.
- [5] A. J. Davidoff, M. Tang, B. Seal, M. J. Edelman, *Am. J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 2191.
- [6] M. Muttenthaler, G. F. King, D. J. Adams, P. F. Alewood, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2021**, *20*, 309.
- [7] a) R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149; b) D. M. M. Jaradat, *Amino acids* **2018**, *50*, 39.
- [8] V. D'Aloisio, P. Dognini, G. A. Hutcheon, C. R. Coxon, *Drug Discov. Today* **2021**, *26*, 1409.
- [9] S. J. Katz, J. Belkora, G. Elwyn, *J. Oncol. Pract.* **2014**, *10*, 206.
- [10] M. Guillot-Nieckowski, S. Eisler, F. Diederich, *New J. Chem.* **2007**, *31*, 1111.
- [11] D. Cross, J. K. Burmester, *Clin. Med. Res.* **2006**, *4*, 218.
- [12] M. Shadidi, M. Sioud, *Drug Resist. Updat.* **2003**, *6*, 363.
- [13] a) J. Zhou, X. Du, B. Xu, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 5770; b) D. Trachootham, J. Alexandre, P. Huang, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2009**, *8*, 579.
- [14] I. Roy, M. K. Stachowiak, E. J. Bergey, *Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.* **2008**, *4*, 89.
- [15] J. D. Watson, F. Crick, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1953**, *18*, 123.
- [16] Richard Wheeler, "A-DNA, B-DNA and Z-DNA", can be found under https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b1/A-DNA%2C_B-DNA_and_Z-DNA.png, **2020**.
- [17] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto, L. Stryer, *Stryer Biochemie*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2018**.
- [18] M. A. Mintzer, E. E. Simanek, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 259.
- [19] R. R. Arvizo, O. R. Miranda, M. A. Thompson, C. M. Pabelick, R. Bhattacharya, J. D. Robertson, V. M. Rotello, Y. S. Prakash, P. Mukherjee, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 2543.
- [20] D. Lechardeur, K. J. Sohn, M. Haardt, P. B. Joshi, M. Monck, R. W. Graham, B. Beatty, J. Squire, H. O'Brodvich, G. L. Lukacs, *Gene Ther.* **1999**, *6*, 482.
- [21] G. L. Lukacs, P. Haggie, O. Seksek, D. Lechardeur, N. Freedman, A. S. Verkman, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 1625.
- [22] A. Gigante, M. Li, S. Junghänel, C. Hirschhäuser, S. Knauer, C. Schmuck, *Med. Chem. Commun.* **2019**, *10*, 1692.
- [23] K. J. Scanlon, *Anticancer Res.* **2004**, *24*, 501.
- [24] E. Cevher, A. Demir, E. Sefik in *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems* (Ed.: A. D. Sezer), InTech, **2012**.
- [25] M. Elsabahy, A. Nazarali, M. Foldvari, *Curr. Drug Deliv.* **2011**, *8*, 235.
- [26] K. H. High, A. Nathwani, T. Spencer, D. Lillicrap, *Haemophilia* **2014**, *20 Suppl 4*, 43.
- [27] L. Klimek, N. Novak, E. Hamelmann, T. Werfel, M. Wagenmann, C. Taube, A. Bauer, H. Merk, U. Rabe, K. Jung et al., *Allergo J. Int.* **2021**, *30*, 51.

- [28] N. P. Klein, N. Lewis, K. Goddard, B. Fireman, O. Zerbo, K. E. Hanson, J. G. Donahue, E. O. Kharbanda, A. Naleway, J. C. Nelson et al., *JAMA* **2021**, *326*, 1390.
- [29] C. H. Jones, C.-K. Chen, A. Ravikrishnan, S. Rane, B. A. Pfeifer, *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 4082.
- [30] G. R. Devi, *Cancer Gene Ther.* **2006**, *13*, 819.
- [31] D. S. Dimitrov, *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 109.
- [32] a) L. S. Young, P. F. Searle, D. Onion, V. Mautner, *J. Pathol.* **2006**, *208*, 299; b) T. A. C. de Guimaraes, M. Georgiou, J. W. B. Bainbridge, M. Michaelides, *Br. J. Ophthalmol.* **2021**, *105*, 151; c) I. Gurevich, P. Agarwal, P. Zhang, J. A. Dolorito, S. Oliver, H. Liu, N. Reitze, N. Sarma, I. S. Bagci, K. Sridhar et al., *Nat. Med.* **2022**; d) B. A. Konkle, C. E. Walsh, M. A. Escobar, N. C. Josephson, G. Young, A. von Drygalski, S. W. J. McPhee, R. J. Samulski, I. Bilic, M. de La Rosa et al., *Blood* **2021**, *137*, 763.
- [33] P. D. Robbins, S. C. Ghivizzani, *Pharmacol. Ther.* **1998**, *80*, 35.
- [34] H. C. Verdera, K. Kuranda, F. Mingozzi, *Mol. Ther.* **2020**, *28*, 723.
- [35] N. Bessis, F. J. GarciaCozar, M.-C. Boissier, *Gene Ther.* **2004**, *11 Suppl 1*, S10-7.
- [36] T. Hollon, *Nat. Med.* **2000**, *6*, 6.
- [37] D. Bouard, D. Alazard-Dany, F.-L. Cosset, *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 153.
- [38] A. Mann, G. Thakur, V. Shukla, A. K. Singh, R. Khanduri, R. Naik, Y. Jiang, N. Kalra, B. S. Dwarakanath, U. Langel et al., *Mol. Pharmaceutics* **2011**, *8*, 1729.
- [39] A. K. Varkouhi, M. Scholte, G. Storm, H. J. Haisma, *J. Control. Release.* **2011**, *151*, 220.
- [40] S. Junghänel, S. Karczewski, S. Bäcker, S. K. Knauer, C. Schmuck, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 2268.
- [41] S. W. Hui, M. Langner, Y. L. Zhao, P. Ross, E. Hurley, K. Chan, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 590.
- [42] L. M. P. Vermeulen, S. C. de Smedt, K. Remaut, K. Braeckmans, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2018**, *129*, 184.
- [43] K. L. Douglas, *Biotechnol. Prog.* **2008**, *24*, 871.
- [44] D. A. Dean, D. D. Strong, W. E. Zimmer, *Gene therapy* **2005**, *12*, 881.
- [45] S. Futaki, *Int. J. Pharm.* **2002**, *245*, 1.
- [46] a) P. Midoux, M. Monsigny, *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 406; b) T. Kimura, Y. Kanda, A. Sano, Nam K., Y. Sasaki, Akiyoshi K., T. Fujisato, A. Kishida, *Adv. Biomed. Eng.* **2013**, *2*, 80.
- [47] P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 7413.
- [48] J. S. Remy, C. Sirlin, P. Vierling, J. P. Behr, *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 647.
- [49] W. H. Braunlin, T. J. Strick, M. T. Record, *Biopolymers* **1982**, *21*, 1301.
- [50] D. Liu, W. Qiao, Z. Li, Y. Chen, X. Cui, K. Li, L. Yu, K. Yan, L. Zhu, Y. Guo et al., *Chem. Biol. Drug Des.* **2008**, *71*, 336.
- [51] J. H. Felgner, R. Kumar, C. N. Sridhar, C. J. Wheeler, Y. J. Tsai, R. Border, P. Ramsey, M. Martin, P. L. Felgner, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 2550.
- [52] S. Riebe, A. Zimmermann, J. Koch, C. Vallet, S. K. Knauer, A. Sowa, C. Wölper, J. Voskuhl, *RSC Adv.* **2020**, *10*, 19643.
- [53] a) R. Fraley, S. Subramani, P. Berg, D. Papahadjopoulos, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 10431; b) R. T. Fraley, C. S. Fornari, S. Kaplan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1979**, *76*, 3348.
- [54] Y. Zhang, C. Sun, C. Wang, K. E. Jankovic, Y. Dong, *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 12181.

- [55] a) M. C. Terp, F. Bauer, Y. Sugimoto, B. Yu, R. W. Brueggemeier, L. J. Lee, R. J. Lee, *Int. J. Pharm.* **2012**, *430*, 328; b) M. Damen, A. J. J. Groenen, S. F. M. van Dongen, R. J. M. Nolte, B. J. Scholte, M. C. Feiters, *Med. Chem. Commun.* **2018**, *9*, 1404.
- [56] S. Mochizuki, N. Kanegae, K. Nishina, Y. Kamikawa, K. Koiwai, H. Masunaga, K. Sakurai, *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1828*, 412.
- [57] L. Ciani, S. Ristori, A. Salvati, L. Calamai, G. Martini, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1664*, 70.
- [58] I. van der Woude, A. Wagenaar, A. A. Meekel, M. B. ter Beest, M. H. Ruiters, J. B. Engberts, D. Hoekstra, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 1160.
- [59] A. J. Geall, M. A. Eaton, T. Baker, C. Catterall, I. S. Blagbrough, *FEBS Lett.* **1999**, *459*, 337.
- [60] Y. K. Ghosh, S. S. Visweswariah, S. Bhattacharya, *FEBS Lett.* **2000**, *473*, 341.
- [61] A. M. Aberle, F. Tablin, J. Zhu, N. J. Walker, D. C. Gruenert, M. H. Nantz, *Biochemistry* **1998**, *37*, 6533.
- [62] a) X. Gao, L. Huang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *179*, 280; b) J. P. Vigneron, N. Oudrhiri, M. Fauquet, L. Vergely, J. C. Bradley, M. Basseville, P. Lehn, J. M. Lehn, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 9682.
- [63] A. Fraix, T. Le Gall, M. Berchel, C. Denis, P. Lehn, T. Montier, P.-A. Jaffrès, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 1650.
- [64] a) A. Kulkarni, W. Deng, S. Hyun, D. H. Thompson, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 933; b) A. Fattahi, M.-A. Golozar, J. Varshosaz, *J. Rep. Pharm. Sci.* **2013**, *2*, 125.
- [65] C. McGregor, C. Perrin, M. Monck, P. Camilleri, A. J. Kirby, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6215.
- [66] M. P. Lokugamage, C. D. Sago, Z. Gan, B. R. Krupczak, J. E. Dahlman, *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* **2019**, *31*, e1902251.
- [67] G. Y. Wu, C. H. Wu, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 4429.
- [68] U. K. Laemmli, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1975**, *72*, 4288.
- [69] M. A. Wolfert, L. W. Seymour, *Gene Ther.* **1998**, *5*, 409.
- [70] H. Luthman, G. Magnusson, *Nucleic Acids Res.* **1983**, *11*, 1295.
- [71] P. Erbacher, A. C. Roche, M. Monsigny, P. Midoux, *Exp. Cell Res.* **1996**, *225*, 186.
- [72] M. Männistö, S. Vanderkerken, V. Toncheva, M. Elomaa, M. Ruponen, E. Schacht, A. Urtti, *J. Control. Release.* **2002**, *83*, 169.
- [73] S. Taranejoo, J. Liu, P. Verma, K. Hourigan, *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, *132*, 42096.
- [74] D. S. Zhuk, P. A. Gembitskii, V. A. Kargin, *Russ. Chem. Rev.* **1965**, *34*, 515.
- [75] a) K. Weyts, E. Goethals, *Polym. Bull.* **1988**, *19*; b) S.-H. Huh, H.-J. Do, H.-Y. Lim, D.-K. Kim, S.-J. Choi, H. Song, N.-H. Kim, J.-K. Park, W.-K. Chang, H.-M. Chung et al., *J. Biol. Stand.* **2007**, *35*, 165; c) M. M. Mady, W. A. Mohammed, N. M. El-Guendy, A. A. Elsayed, *Rom. J. Biophys.* **2011**, *21*, 151.
- [76] A. El-Sayed, S. Futaki, H. Harashima, *AAPS J.* **2009**, *11*, 13.
- [77] R. V. Benjaminsen, M. A. Matthebjerg, J. R. Henriksen, S. M. Moghimi, T. L. Andresen, *Mol. Ther.* **2013**, *21*, 149.
- [78] a) Di Chuan, T. Jin, R. Fan, L. Zhou, G. Guo, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2019**, *268*, 25; b) S. Rodrigues, M. Dionísio, C. R. López, A. Grenha, *J. Funct. Biomater.* **2012**, *3*, 615.
- [79] T. Kiang, J. Wen, H. W. Lim, K. W. Leong, *Biomaterials* **2004**, *25*, 5293.
- [80] M. Cheng, W. Zhu, Q. Li, D. Dai, Y. Hou, *Oncotarget* **2017**, *8*, 59068.
- [81] W. G. Liu, X. Zhang, S. J. Sun, G. J. Sun, K. de Yao, D. C. Liang, G. Guo, J. Y. Zhang, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 782.

- [82] I. F. Uchegbu, L. Sadiq, A. Pardakhty, M. El-Hammadi, A. I. Gray, L. Tetley, W. Wang, B. H. Zinselmeyer, A. G. Schätzlein, *J. Drug Target.* **2004**, *12*, 527.
- [83] V. J. Mohanraj, Y. Chen, *Trop. J. Pharm. Res.* **2007**, *5*.
- [84] S. Jin, K. Ye, *Biotechnol. Prog.* **2007**, *23*, 32.
- [85] S. Saha, M. Klein-Hitpaß, C. Vallet, S. K. Knauer, C. Schmuck, J. Voskuhl, M. Giese, *Biomacromolecules* **2020**, *21*, 2356.
- [86] M. Ravi Kumar, G. Hellermann, R. F. Lockey, S. S. Mohapatra, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2004**, *4*, 1213.
- [87] B. Neuhaus, B. Tosun, O. Rotan, A. Frede, A. M. Westendorf, M. Epple, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 18102.
- [88] A. Colosimo, K. K. Goncz, A. R. Holmes, K. Kunzelmann, G. Novelli, R. W. Malone, M. J. Bennett, D. C. Gruenert, *BioTechniques* **2000**, *29*, 314-8, 320-2, 324 passim.
- [89] a) Q. Leng, A. J. Mixson, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e40; b) N. A. Alhakamy, P. Dhar, C. J. Berkland, *Mol. Pharm.* **2016**, *13*, 1047; c) S. Futaki, W. Ohashi, T. Suzuki, M. Niwa, S. Tanaka, K. Ueda, H. Harashima, Y. Sugiura, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 1005.
- [90] M. G. Sebestyén, J. J. Ludtke, M. C. Bassik, G. Zhang, V. Budker, E. A. Lukhtanov, J. E. Hagstrom, J. A. Wolff, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 80.
- [91] M. C. Morris, E. Gros, G. Aldrian-Herrada, M. Choob, J. Archdeacon, F. Heitz, G. Divita, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, e49.
- [92] a) X. Han, J. H. Bushweller, D. S. Cafiso, L. K. Tamm, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 715; b) J. J. Skehel, K. Cross, D. Steinhauer, D. C. Wiley, *Biochem. Soc. Trans.* **2001**, *29*, 623.
- [93] F. Heitz, M. C. Morris, G. Divita, *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 195.
- [94] A. D. Frankel, C. O. Pabo, *Cell* **1988**, *55*, 1189.
- [95] C. Schmuck, V. Bickert, M. Merschky, L. Geiger, D. Rupprecht, J. Dudaczek, P. Wich, T. Rehm, U. Machon, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 324.
- [96] C. Schmuck, *Synlett* **2011**, *2011*, 1798.
- [97] M. Giese, J. Niemeyer, J. Voskuhl, *ChemPlusChem* **2020**, *85*, 985.
- [98] L. Hernandez-Folgado, C. Schmuck, S. Tomić, I. Piantanida, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2977.
- [99] H. Y. Kuchelmeister, S. Karczewski, A. Gutschmidt, S. Knauer, C. Schmuck, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 14016.
- [100] K. Samanta, P. Jana, S. Bäcker, S. Knauer, C. Schmuck, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 12446.
- [101] M. Li, M. Ehlers, S. Schlesiger, E. Zellermann, S. K. Knauer, C. Schmuck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 598.
- [102] H. Jiang, X.-Y. Hu, S. Mosel, S. K. Knauer, C. Hirschhäuser, C. Schmuck, *ChemBioChem* **2019**, *20*, 1410.
- [103] S. Junghänel, *Struktur-Wirkungs-Beziehung peptidischer Guanidiniocarbonylpyrrol-Liganden zur nicht-viralen Gentransfektion. Ein Balanceakt über einen Hindernisparkour*, Universität Duisburg-Essen, Essen, **2017**.
- [104] M. Li, S. Schlesiger, S. K. Knauer, C. Schmuck, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 2941.
- [105] K. Strebhardt, A. Ullrich, *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 473.
- [106] F. Winau, O. Westphal, R. Winau, *Microbes Infect.* **2004**, *6*, 786.
- [107] J. M. Brown, A. J. Giaccia, *Cancer Res.* **1998**, *58*, 1408.
- [108] J. S. Suk, Q. Xu, N. Kim, J. Hanes, L. M. Ensign, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *99*, 28.

- [109] J. Wu, *J. Pers. Med.* **2021**, *11*.
- [110] a) R. Islam, H. Maeda, J. Fang, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2021**, *1*; b) H. Maeda, H. Nakamura, J. Fang, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 71.
- [111] M. Ichihara, T. Shimizu, A. Imoto, Y. Hashiguchi, Y. Uehara, T. Ishida, H. Kiwada, *Pharmaceutics* **2010**, *3*, 1.
- [112] B. A. Webb, M. Chimenti, M. P. Jacobson, D. L. Barber, *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 671.
- [113] J. Nicolas, S. Mura, D. Brambilla, N. Mackiewicz, P. Couvreur, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 1147.
- [114] a) O. H. Aina, R. Liu, J. L. Sutcliffe, J. Marik, C.-X. Pan, K. S. Lam, *Mol. Pharm.* **2007**, *4*, 631; b) O. H. Aina, T. C. Sroka, M.-L. Chen, K. S. Lam, *Biopolymers* **2002**, *66*, 184; c) J. Thundimadathil, *J. Amino Acids* **2012**, *2012*, 967347.
- [115] S. E. D'Souza, M. H. Ginsberg, E. F. Plow, *Trends Biochem. Sci.* **1991**, *16*, 246.
- [116] E. Ruoslahti, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **1996**, *12*, 697.
- [117] E. F. Plow, T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, J. W. Smith, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21785.
- [118] A. Taherian, X. Li, Y. Liu, T. A. Haas, *BMC cancer* **2011**, *11*, 293.
- [119] Z.-B. Li, K. Chen, X. Chen, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2008**, *35*, 1100.
- [120] F. Danhier, A. Le Breton, V. Préat, *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 2961.
- [121] L. Zhang, S. Zhu, L. Qian, Y. Pei, Y. Qiu, Y. Jiang, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *79*, 232.
- [122] a) R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7461; b) R. Haubner, W. Schmitt, G. Hölzemann, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7881; c) G. Müller, M. Gurrath, H. Kessler, R. Timpl, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1992**, *31*, 326.
- [123] H. Kagaya, M. Oba, Y. Miura, H. Koyama, T. Ishii, T. Shimada, T. Takato, K. Kataoka, T. Miyata, *Gene Ther.* **2012**, *19*, 61.
- [124] P. Ponka, C. N. Lok, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1999**, *31*, 1111.
- [125] G. de Jong, J. P. van Dijk, H. G. van Eijk, *Clin. Chim. Acta.* **1990**, *190*, 1.
- [126] a) D. Högemann-Savellano, E. Bos, C. Blondet, F. Sato, T. Abe, L. Josephson, R. Weissleder, J. Gaudet, D. Sgroi, P. J. Peters et al., *Neoplasia* **2003**, *5*, 495; b) L. Han, R. Huang, S. Liu, S. Huang, C. Jiang, *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 2156.
- [127] J. H. Lee, J. A. Engler, J. F. Collawn, B. A. Moore, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 2004.
- [128] S. Oh, B. J. Kim, N. P. Singh, H. Lai, T. Sasaki, *Cancer Lett.* **2009**, *274*, 33.
- [129] W. Friedrich, *Vitamins*, DE GRUYTER, **1988**.
- [130] G. Ball, *Vitamins*, Wiley, **2004**.
- [131] a) A. C. Mamede, S. D. Tavares, A. M. Abrantes, J. Trindade, J. M. Maia, M. F. Botelho, *Nutr. Cancer* **2011**, *63*, 479; b) P. W. Jurutka, G. K. Whitfield, J. C. Hsieh, P. D. Thompson, C. A. Haussler, M. R. Haussler, *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2001**, *2*, 203.
- [132] J. A. Zastre, R. L. Sweet, B. S. Hanberry, S. Ye, *Cancer Metab.* **2013**, *1*, 16.
- [133] G. Russell-Jones, K. McTavish, J. McEwan, J. Rice, D. Nowotnik, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 1625.
- [134] O. Sijilmassi, *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2019**, *257*, 1573.
- [135] I. R. Vlahov, C. P. Leamon, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1357.
- [136] R. J. Lee, P. S. Low, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 3198.
- [137] J. Luo, M. D. Smith, D. A. Lantrip, S. Wang, P. L. Fuchs, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10004.

- [138] W. A. Henne, D. D. Doorneweerd, A. R. Hilgenbrink, S. A. Kularatne, P. S. Low, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5350.
- [139] B. Wolf, G. L. Feldman, *Am. J. Hum. Genet.* **1982**, *34*, 699.
- [140] J. Zempleni, T. Kuroishi, *Adv. Nutr.* **2012**, *3*, 213.
- [141] W. X. Ren, J. Han, S. Uhm, Y. J. Jang, C. Kang, J.-H. Kim, J. S. Kim, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 10403.
- [142] N. U. Deshpande, M. Jayakannan, *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 3572.
- [143] a) H. Pelicano, D. Carney, P. Huang, *Drug Resist. Updat.* **2004**, *7*, 97; b) B. Kumar, S. Koul, L. Khandrika, R. B. Meacham, H. K. Koul, *Cancer. Res.* **2008**, *68*, 1777.
- [144] M. S. Shim, Y. Xia, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 6926.
- [145] A. K. Shukla, M. Verma, K. N. Singh, *Chem. Inform.* **2004**, *35*.
- [146] T. R. Daniels, E. Bernabeu, J. A. Rodríguez, S. Patel, M. Kozman, D. A. Chiappetta, E. Holler, J. Y. Ljubimova, G. Helguera, M. L. Penichet, *Biochim. Biophys. Acta.* **2012**, *1820*, 291.
- [147] Y. Lu, W. Jiang, X. Wu, S. Huang, Z. Huang, Y. Shi, Q. Dai, J. Chen, F. Ren, S. Gao, *Int. J. Nanomedicine* **2018**, *13*, 6913.
- [148] W. Qu, S.-Y. Qin, Y. Kuang, R.-X. Zhuo, X.-Z. Zhang, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 2147.
- [149] L. Novo, E. Mastrobattista, C. F. van Nostrum, W. E. Hennink, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 802.
- [150] S. Liu, Y. Gao, S. A. D. Zhou, U. Greiser, T. Guo, R. Guo, W. Wang, *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2017**, *3*, 1283.
- [151] J.-X. Chen, X.-D. Xu, S. Yang, J. Yang, R.-X. Zhuo, X.-Z. Zhang, *Macromol. Biosci.* **2013**, *13*, 84.
- [152] S. Martin-Ortigosa, D. J. Peterson, J. S. Valenstein, V. S.-Y. Lin, B. G. Trewyn, L. A. Lyznik, K. Wang, *Plant Physiol.* **2014**, *164*, 537.
- [153] Q. Liu, W.-J. Yi, Y.-M. Zhang, J. Zhang, L. Guo, X.-Q. Yu, *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *82*, 376.
- [154] a) S. Rebouissou, J. Zucman-Rossi, R. Moreau, Z. Qiu, L. Hui, *J. Hepatol.* **2017**, *67*, 896; b) F. Ye, C. Chen, J. Qin, J. Liu, C. Zheng, *FASEB J.* **2015**, *29*, 4268.
- [155] P. Liang, C.-Q. Wang, H. Chen, R.-X. Zhuo, S.-X. Cheng, *Polym. Int.* **2015**, *64*, 647.
- [156] M. H. Darvishi, A. Nomani, M. Amini, M. A. Shokrgozar, R. Dinarvand, *Int. J. Pharm.* **2013**, *456*, 408.
- [157] T. Dirksmeyer, P. Stahl, C. Vallet, S. Knauer, M. Giese, C. Schmuck, C. Hirschhäuser, *Chem. Eur. J.* **2022**, *28*, e202104618.
- [158] T. Dirksmeyer, *Supramolekulare Liganden für Biomoleküle*, Universität Duisburg-Essen, Essen, **2018**.
- [159] M. Li, *Development of novel peptide based gene delivery vector and supramolecular assembly*, Universität Duisburg-Essen, Essen, **2016**.
- [160] K. Sikora, M. Jaśkiewicz, D. Neubauer, D. Migoń, W. Kamysz, *Pharmaceuticals* **2020**, *13*.
- [161] M. Ikura, K. Hikichi, *Org. Magn. Reson.* **1982**, *20*, 266.
- [162] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176.
- [163] M. P. Gotsbacher, S. Cho, H. J. Kwon, P. Karuso, *Proteome Sci.* **2016**, *15*, 16.
- [164] D. M. Mock, G. L. Lankford, J. Cazin, *J. Nutr.* **1993**, *123*, 1844.
- [165] O. Livnah, E. A. Bayer, M. Wilchek, J. L. Sussman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 5076.

- [166] F. Würthner, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, *59*, 14192.
- [167] J. Su, C. Qian, N. Luo, X. Xiang, Y. Xu, X. Chen, *J. Chem. Eng. Data* **2014**, *59*, 3894.
- [168] D. Pezzoli, E. Giupponi, D. Mantovani, G. Candiani, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 44134.
- [169] D. Ponader, F. Wojcik, F. Beceren-Braun, J. Dervede, L. Hartmann, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 1845.
- [170] H. Y. Kuchelmeister, *Molecular Recognition of Biologically Relevant Targets*, Universität Duisburg-Essen, Essen, **2011**.
- [171] A. Zimmermann, Q. Z. Jaber, J. Koch, S. Riebe, C. Vallet, K. Loza, M. Hayduk, K. B. Steinbuch, S. K. Knauer, M. Fridman et al., *ChemBioChem* **2021**, *22*, 1563.
- [172] P. K. Mandal, J. S. McMurray, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6599.
- [173] J. Farrera-Sinfreu, M. Royo, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7813.
- [174] R. Liu, T.-C. Shih, X. Deng, L. Anwar, S. Ahadi, P. Kumaresan, K. S. Lam, *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1248*, 3.
- [175] B. Baur, T. Suormala, E. Baumgartner, *Brain Research* **2002**, *925*, 111.
- [176] Y. Kawaguchi, C. J. Wilson, P. C. Emson, *J. Neurosci.* **1990**, *10*, 3421.
- [177] S. T. Nguyen, H. T.-L. Nguyen, K. D. Truong, *Biomed. Res. Ther.* **2020**, *7*, 3855.
- [178] Q. Lu, J. Wang, A. Faghijnejad, H. Zeng, Y. Liu, *Soft Matter* **2011**, *7*, 9366.
- [179] H. Bastos, B. Lassalle, A. Chicheportiche, L. Riou, J. Testart, I. Allemand, P. Fouchet, *Cytometry A* **2005**, *65*, 40.
- [180] A. E. Carpenter, T. R. Jones, M. R. Lamprecht, C. Clarke, I. H. Kang, O. Friman, D. A. Guertin, J. H. Chang, R. A. Lindquist, J. Moffat et al., *Genome Biol.* **2006**, *7*, R100.
- [181] W. S. Pear, G. P. Nolan, M. L. Scott, D. Baltimore, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 8392.
- [182] T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella, L. Minor, *Assay Guidance Manual. Cell Viability Assays*, Bethesda (MD), **2004**.
- [183] A. Akinc, M. Thomas, A. M. Klibanov, R. Langer, *J. Gene Med.* **2005**, *7*, 657.
- [184] N. Bayer, D. Schober, E. Prchla, R. F. Murphy, D. Blaas, R. Fuchs, *Virol. J.* **1998**, *72*, 9645.
- [185] J. Haley, Y. Geng, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 955.
- [186] M. de Raad, E. A. Teunissen, E. Mastrobattista, *Nanomedicine (Lond)* **2014**, *9*, 2217.
- [187] a) P. A. Bunn, B. Helfrich, A. F. Soriano, W. A. Franklin, M. Varella-Garcia, F. R. Hirsch, A. Baron, C. Zeng, D. C. Chan, *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 3239; b) C. Gong, D. Pan, F. Qiu, P. Sun, Y.-H. Zhang, *PloS one* **2014**, *9*, e110632.
- [188] S. K. Maity, P. Stahl, A. Hensel, S. Knauer, C. Hirschhäuser, C. Schmuck, *Chemistry* **2020**, *26*, 3010.
- [189] M. Mühlberg, K. D. Siebertz, B. Schlegel, P. Schmieder, C. P. R. Hackenberger, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 4603.
- [190] K. M. Stewart, K. L. Horton, S. O. Kelley, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2242.
- [191] B. Akgun, D. G. Hall, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 3909.
- [192] M. Li, S. Mosel, S. K. Knauer, C. Schmuck, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 2312.
- [193] M. Hebel, A. Riegger, M. M. Zegota, G. Kizilsavas, J. Gačanin, M. Pieszka, T. Lückerrath, J. A. S. Coelho, M. Wagner, P. M. P. Gois et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 14026.

7 ANHANG

HPLC, MS und NMR Daten

Analytische Daten von 33

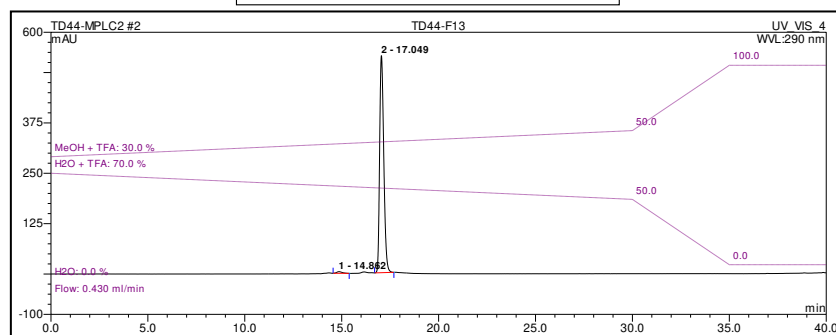
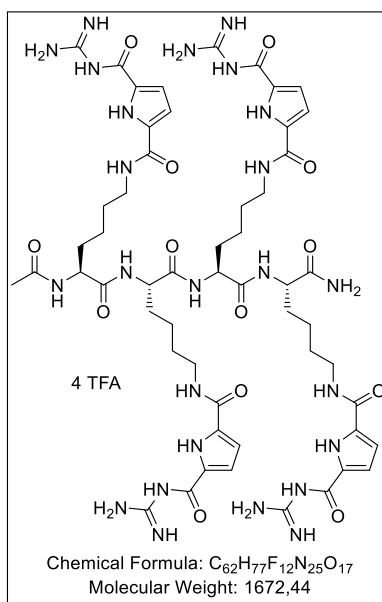


Abbildung 7-1. HPLC Analyse von 33.

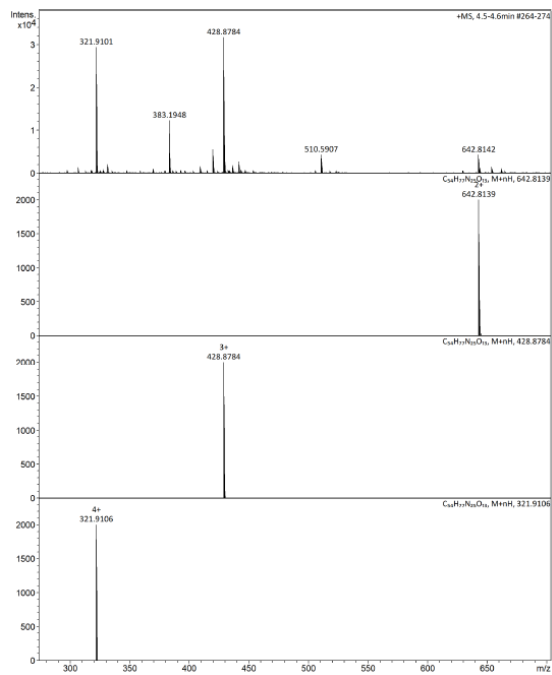


Abbildung 7-2. Massenspektrum von **33**.

Analytische Daten von 35

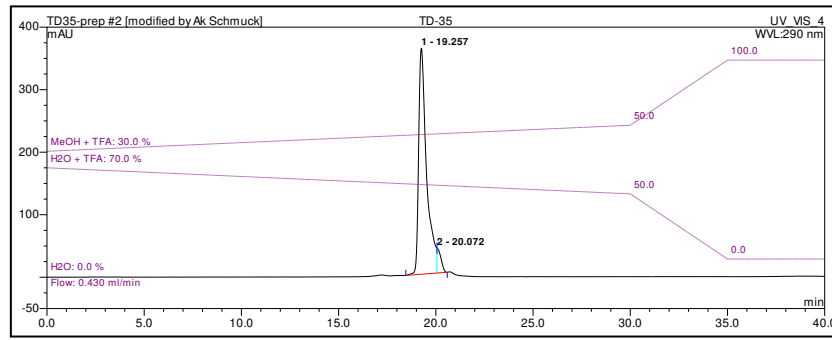
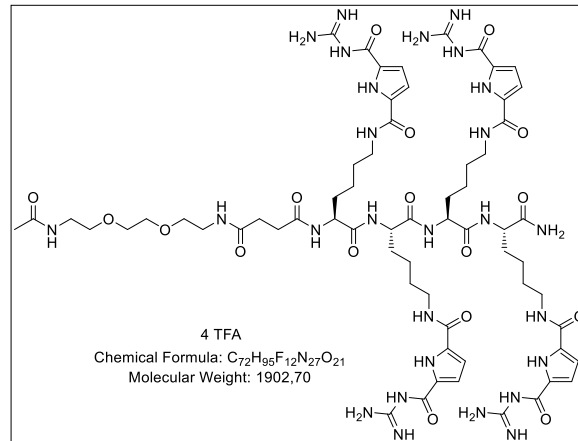


Abbildung 7-3. HPLC Chromatogramm von 35.

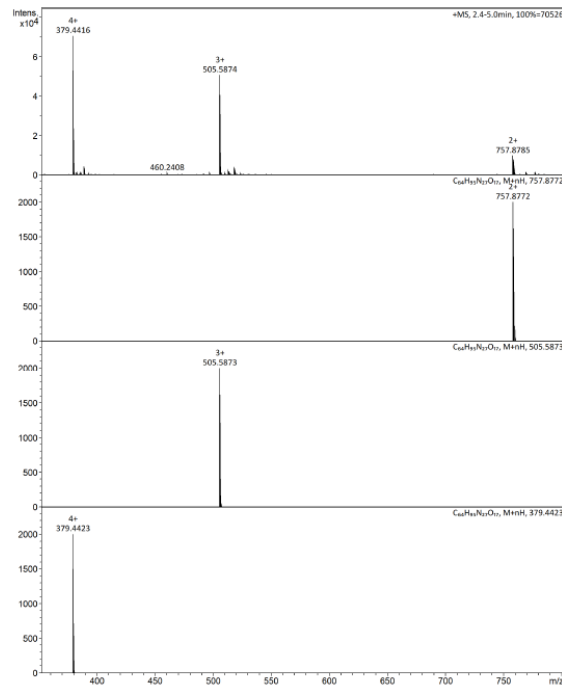


Abbildung 7-4. Massenspektrum von 35.

Analytische Daten von 39

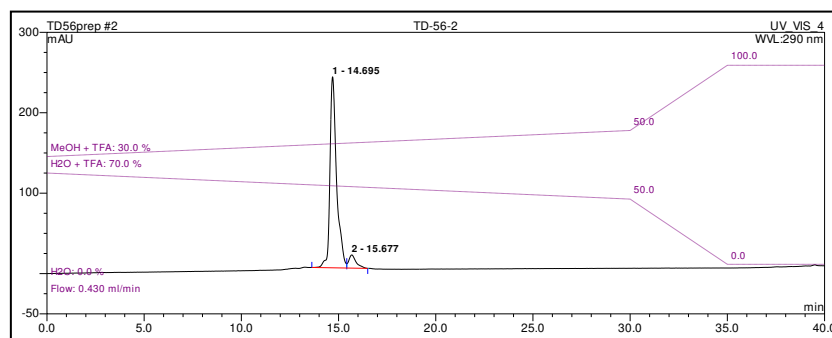
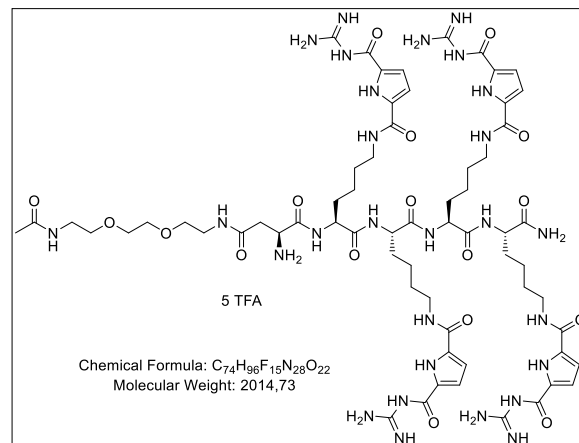


Abbildung 7-5. HPLC-Chromatogramm von 39.

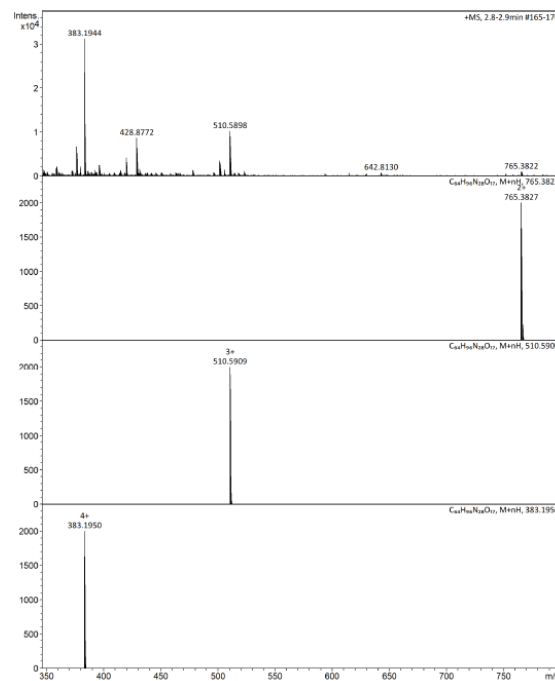


Abbildung 7-6. Massenspektrum von 39.

Analytische Daten von 40

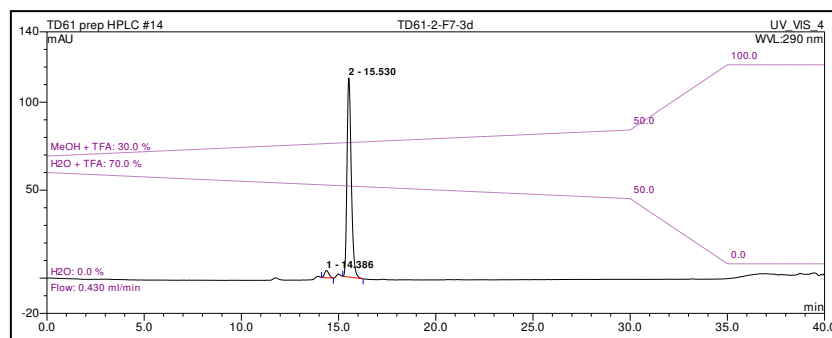
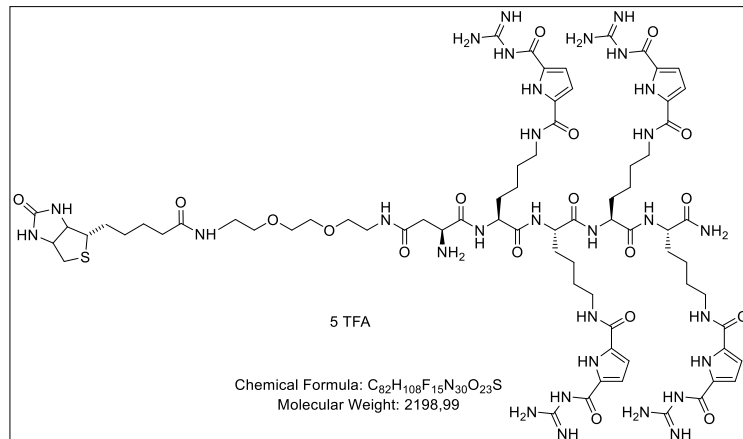


Abbildung 7-7. HPLC-Chromatogramm von 40.

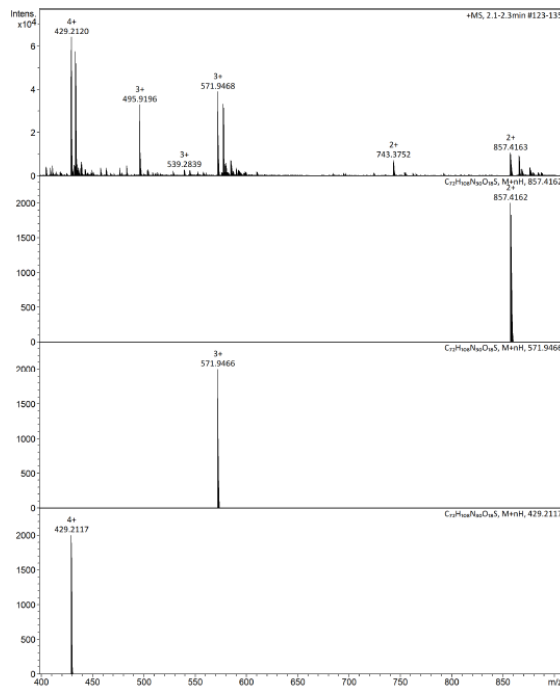


Abbildung 7-8. Massenspektrum von 40.

Analytische Daten von 41

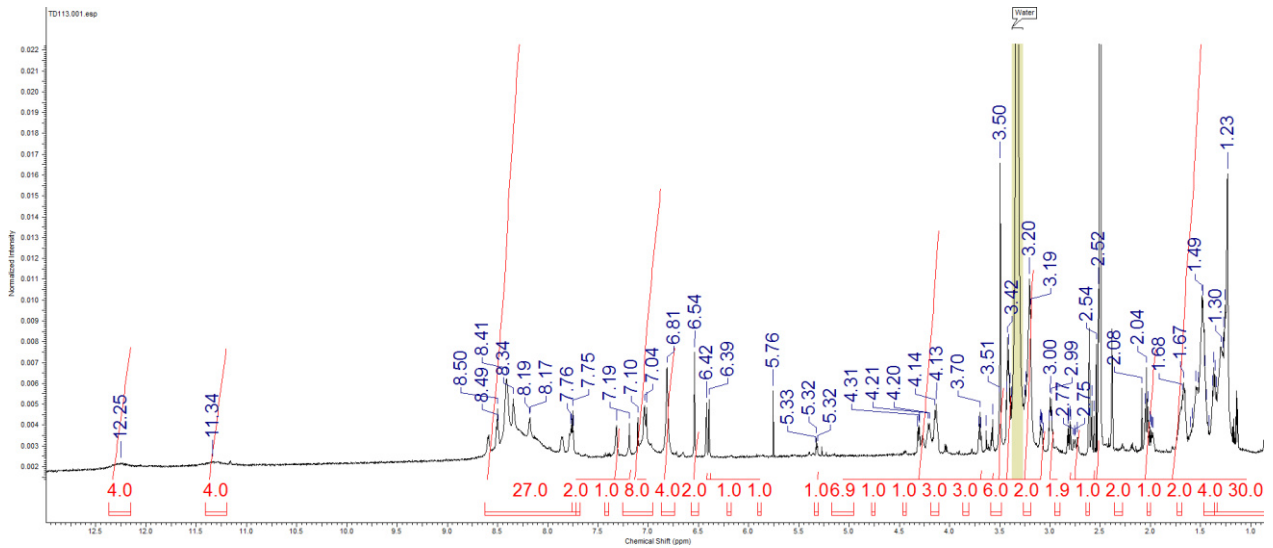
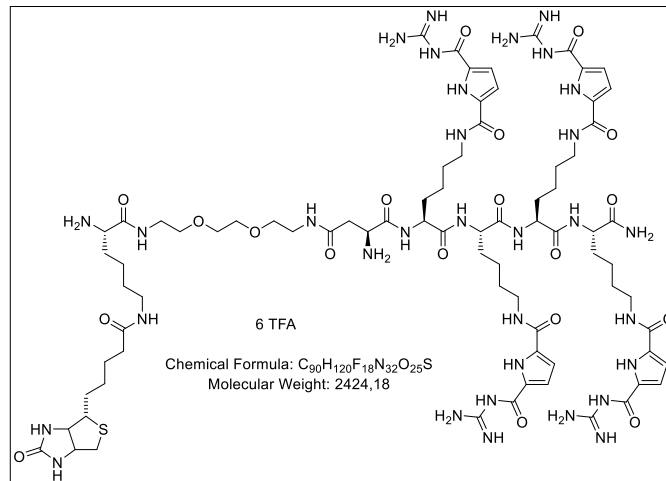


Abbildung 7-9. ¹H-NMR Spektrum von 41 in DMSO-d₆.

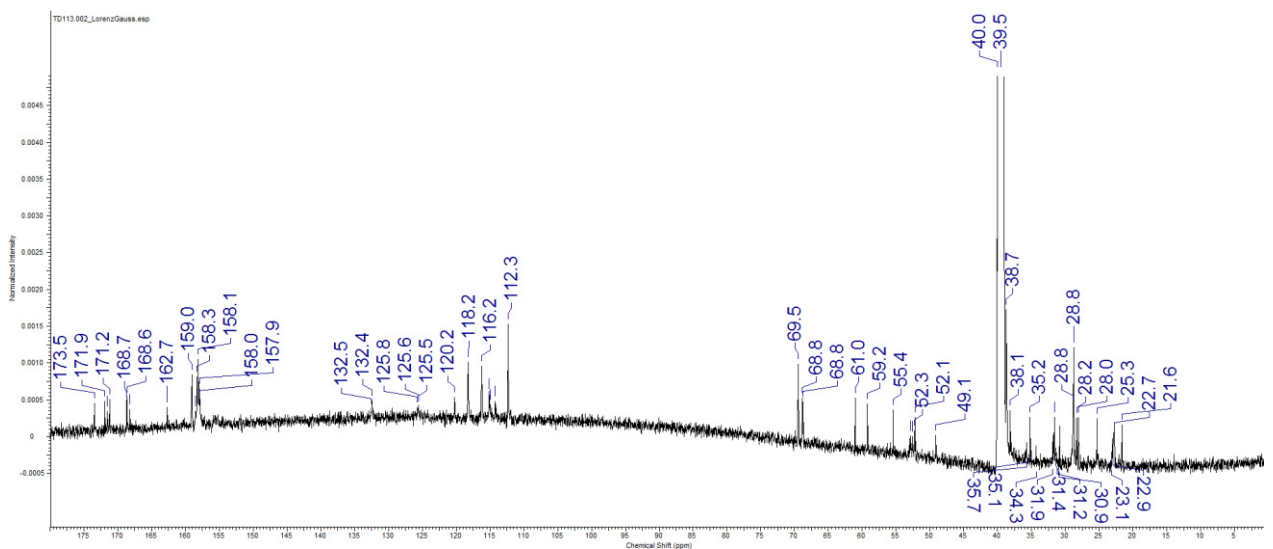


Abbildung 7-10. ¹³C-NMR Spektrum von 41 in DMSO-d₆.

¹³C NMR Spektrum nach der Anwendung einer Lorenz-Gauss Fensterfunktion. Es wurde keine Baselinekorrektur durchgeführt, da dies das Fehlen von Signalen hervorruft.

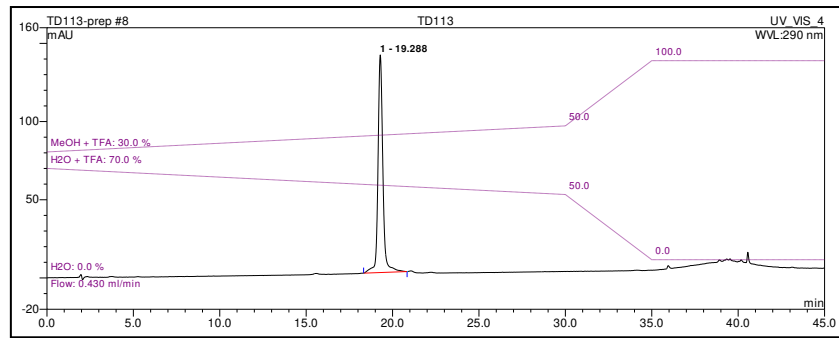


Abbildung 7-11. HPLC-Chromatogramm von 41.

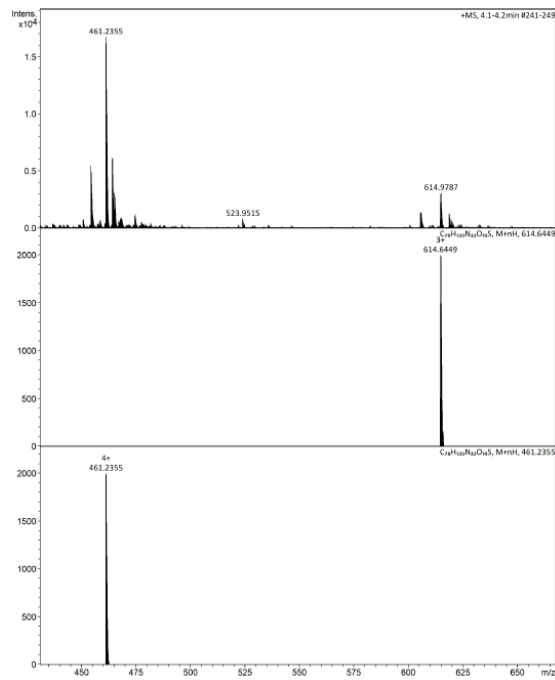
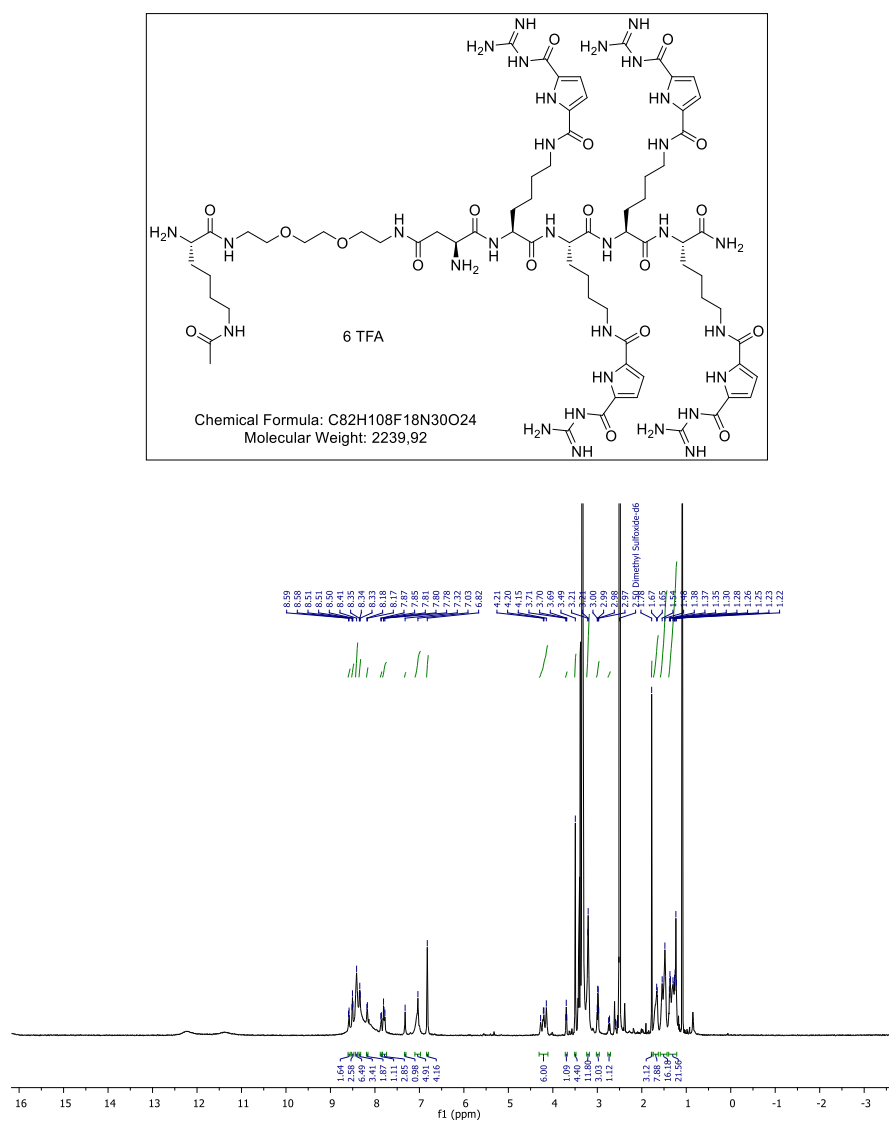


Abbildung 7-12. Massenspektrum von 41.

Analytische Daten von 45

Abbildung 7-13. ¹H-NMR Spektrum von 45 in DMSO-d₆.

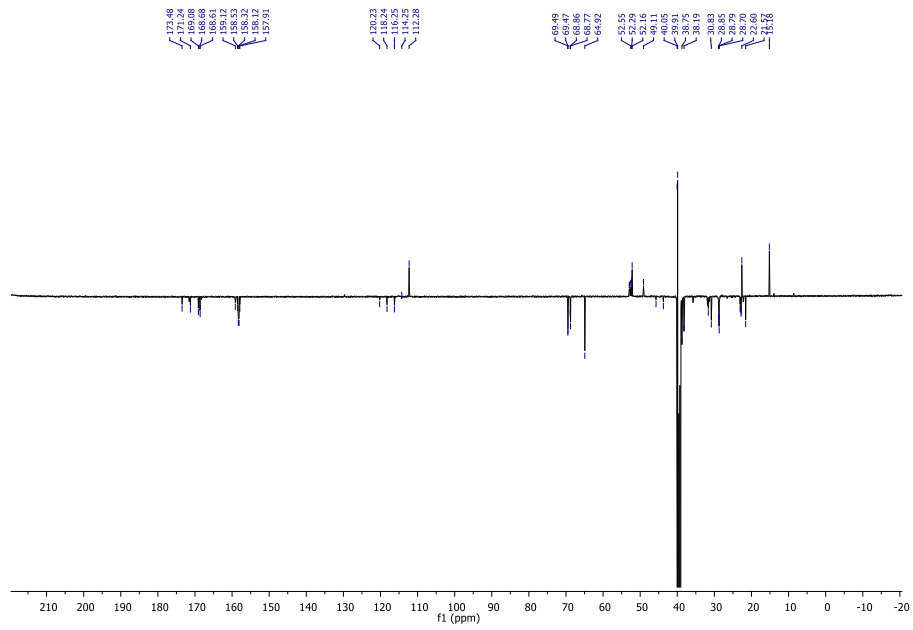


Abbildung 7-14. ^{13}C -NMR Spektrum von **45**.

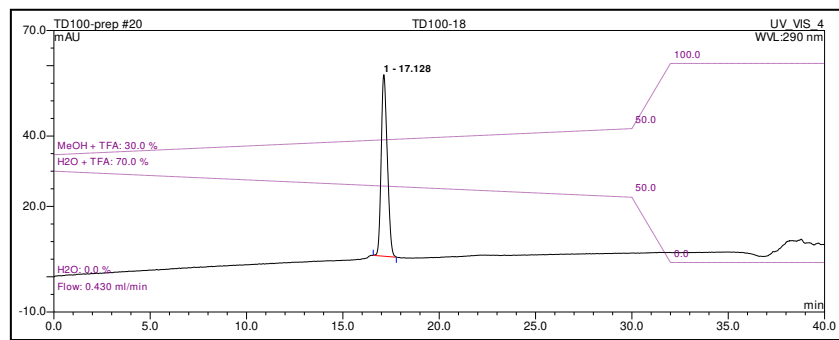


Abbildung 7-15. HPLC-Chromatogramm von **45**.

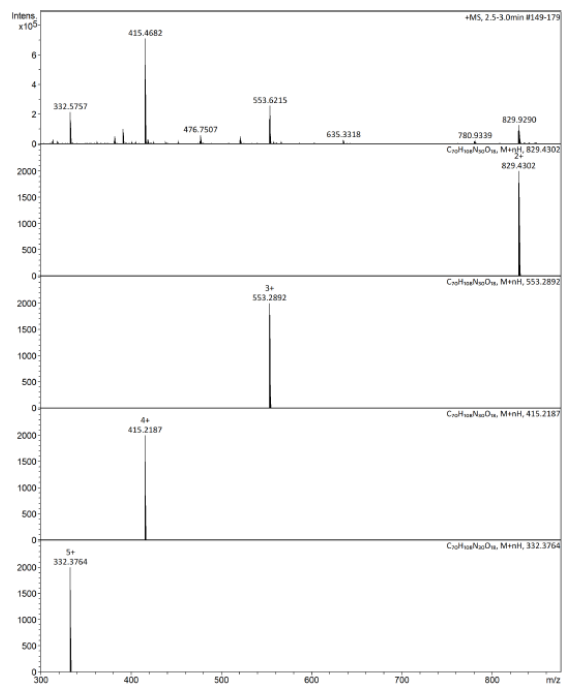
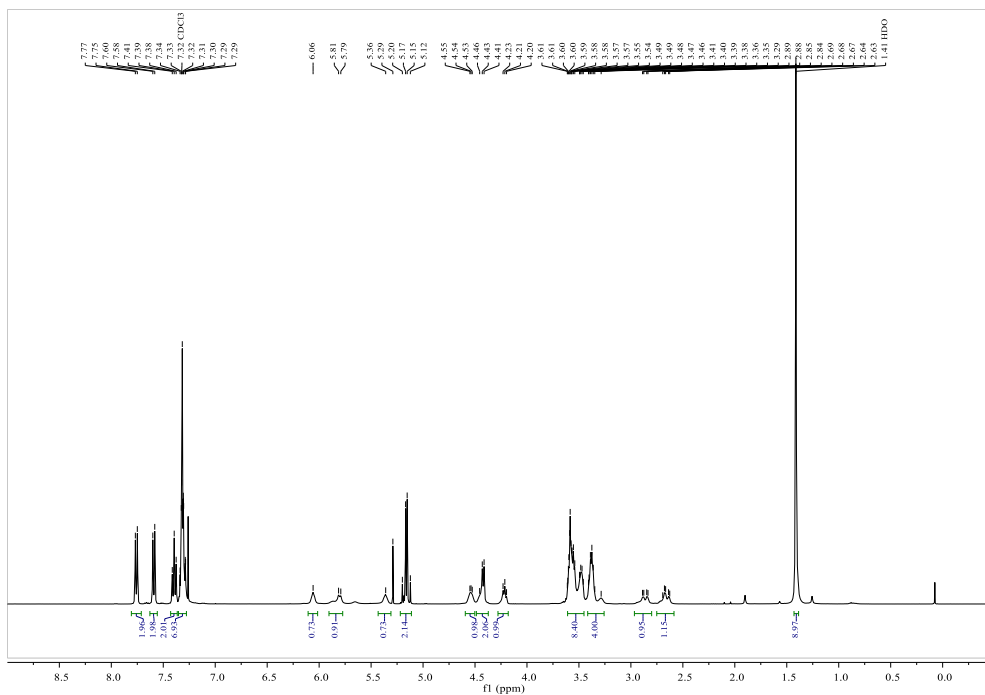
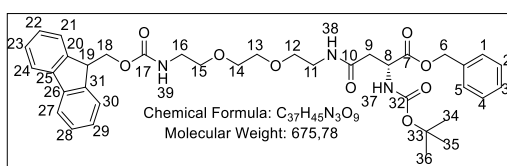
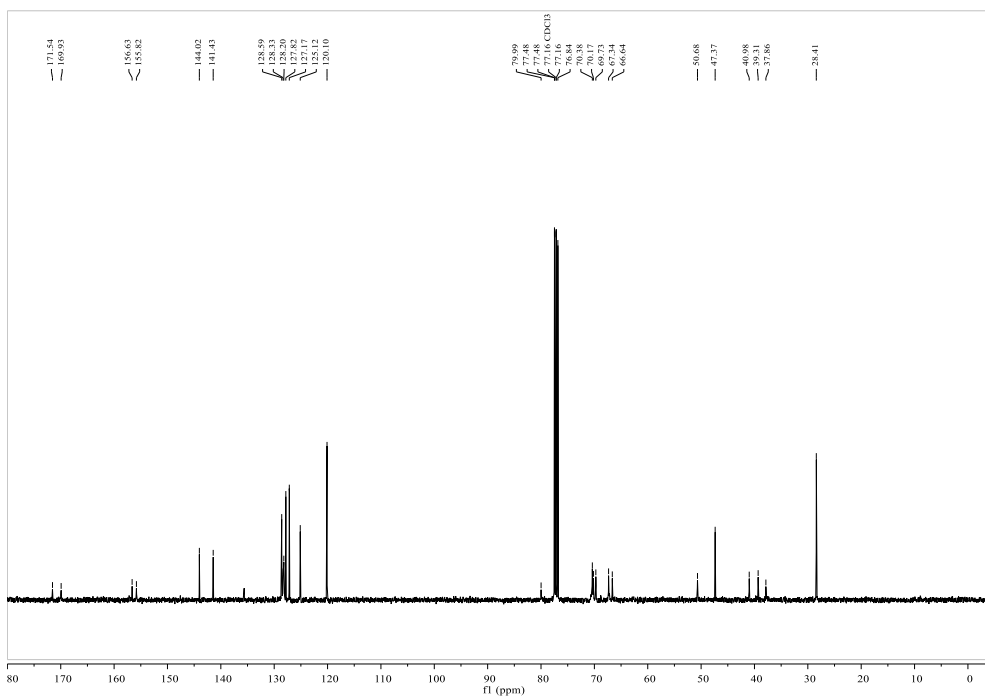


Abbildung 7-16. Massenspektrum von **45**.

Analytische Daten von **38**Abbildung 7-17. 1H -NMR Spektrum von **38** in $CDCl_3$.Abbildung 7-18. ^{13}C -NMR Spektrum von **38** in $CDCl_3$.

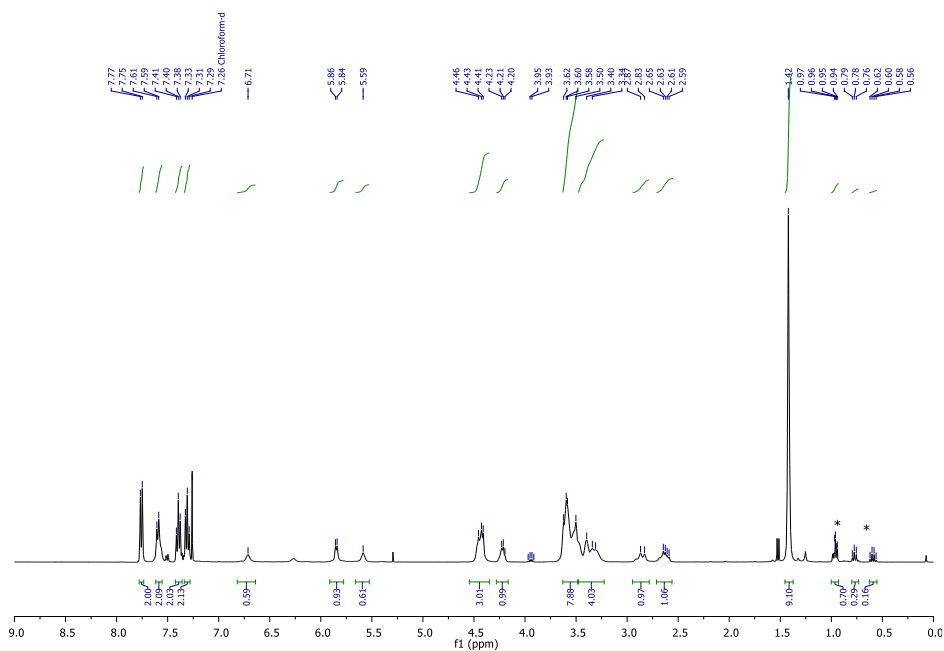
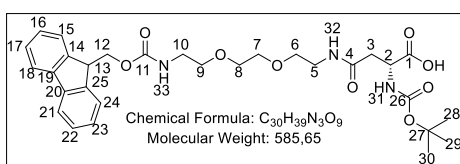
Analytische Daten von **36**

Abbildung 7-19. ¹H-NMR Spektrum von **36** in CDCl₃. Die mit Sternen (*) versehen Signale sind durch eine Verunreinigung mit Et₃SiH bedingt.

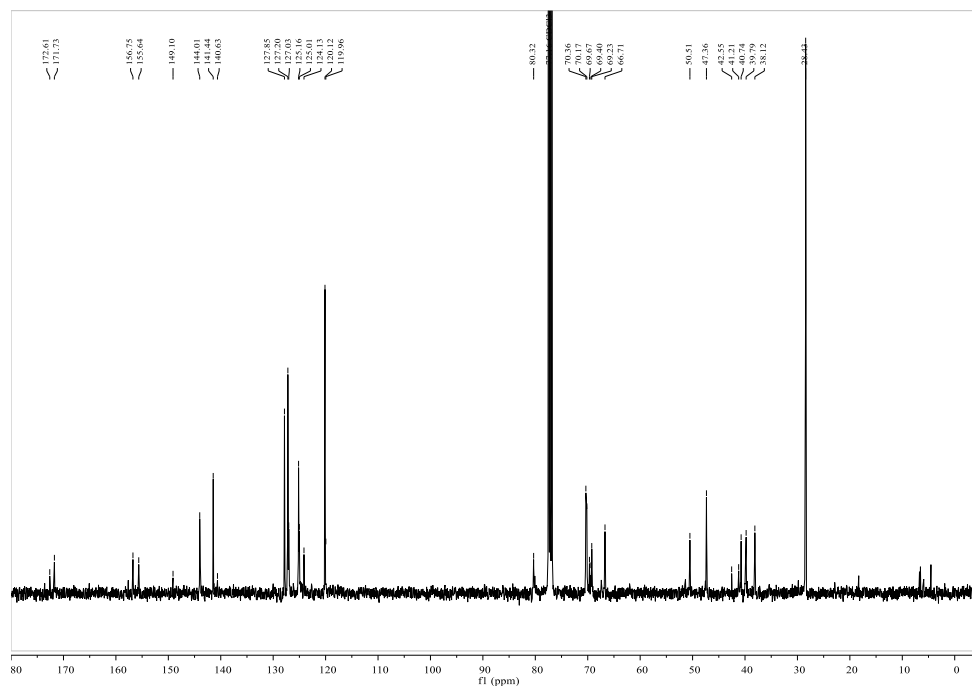
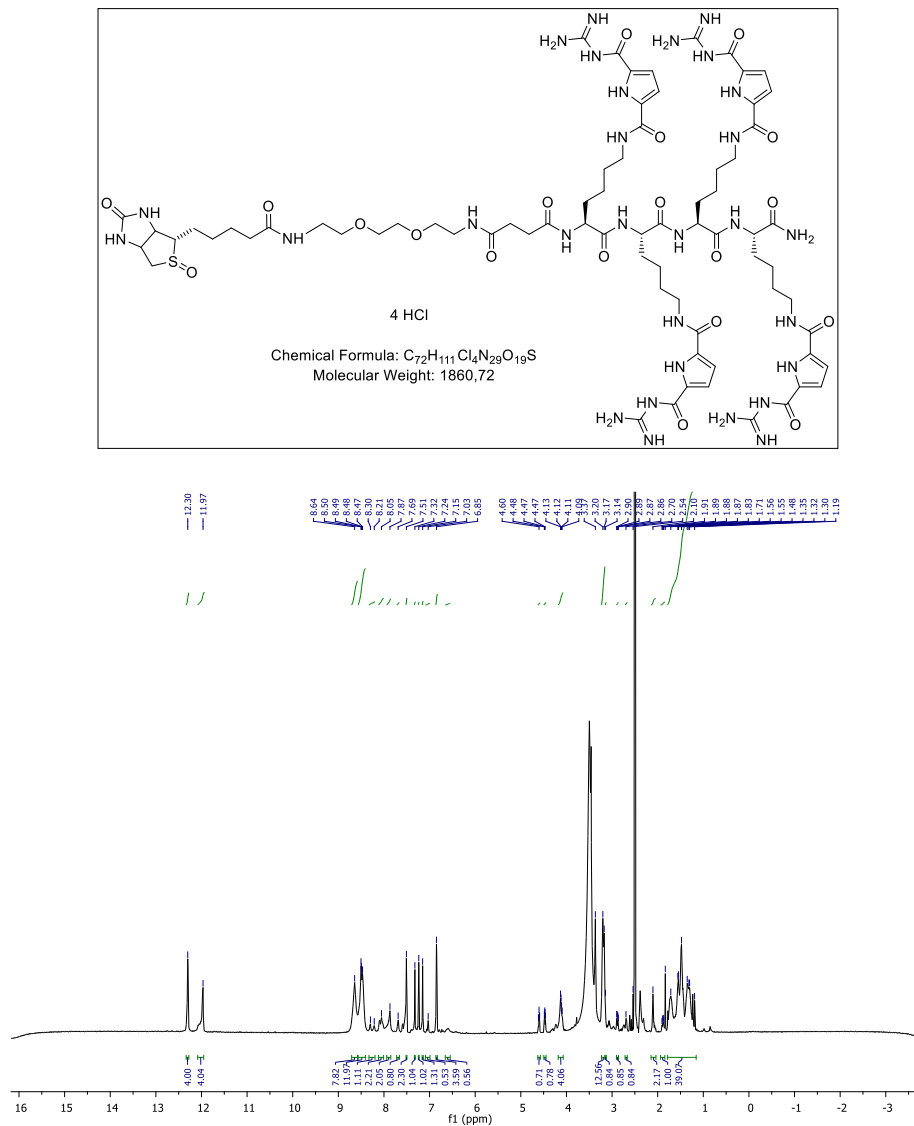


Abbildung 7-20. ¹³C-NMR Spektrum von **36** in CDCl₃.

Analytische Daten von 31

Abbildung 7-21. 1H -NMR Spektrum von 31 in DMSO- d_6 .

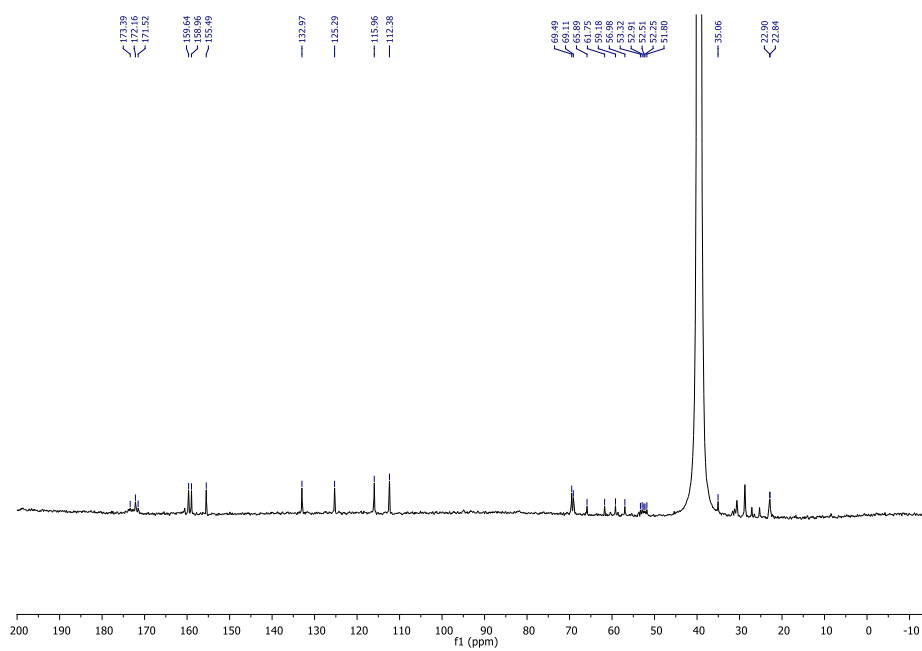
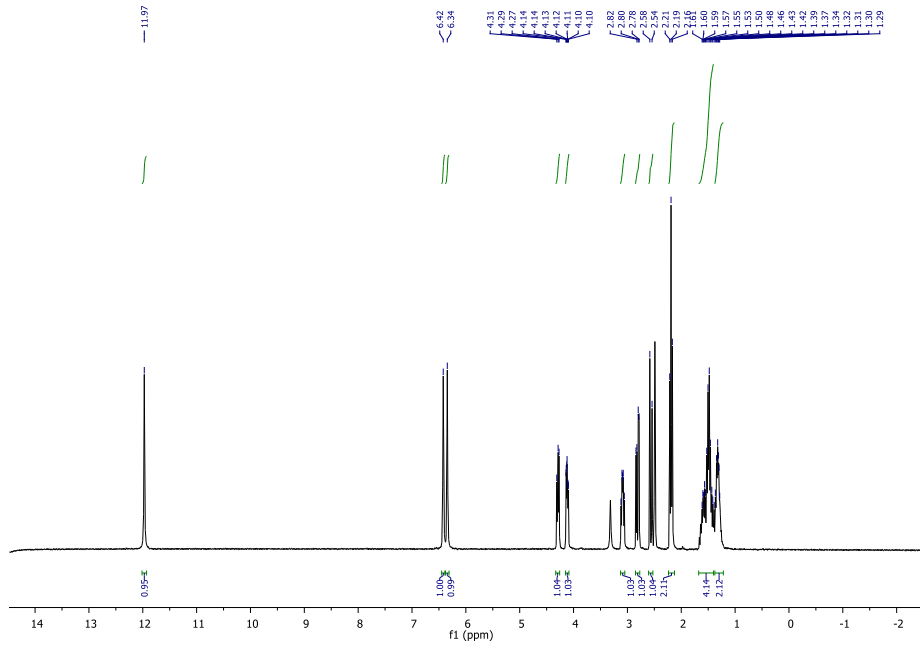
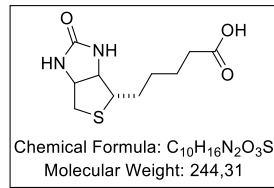
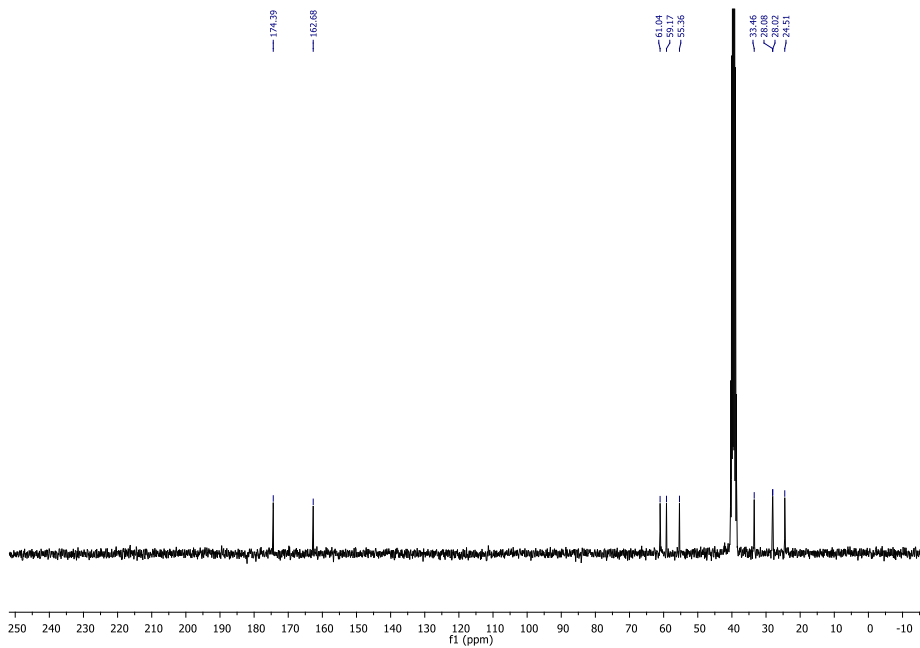
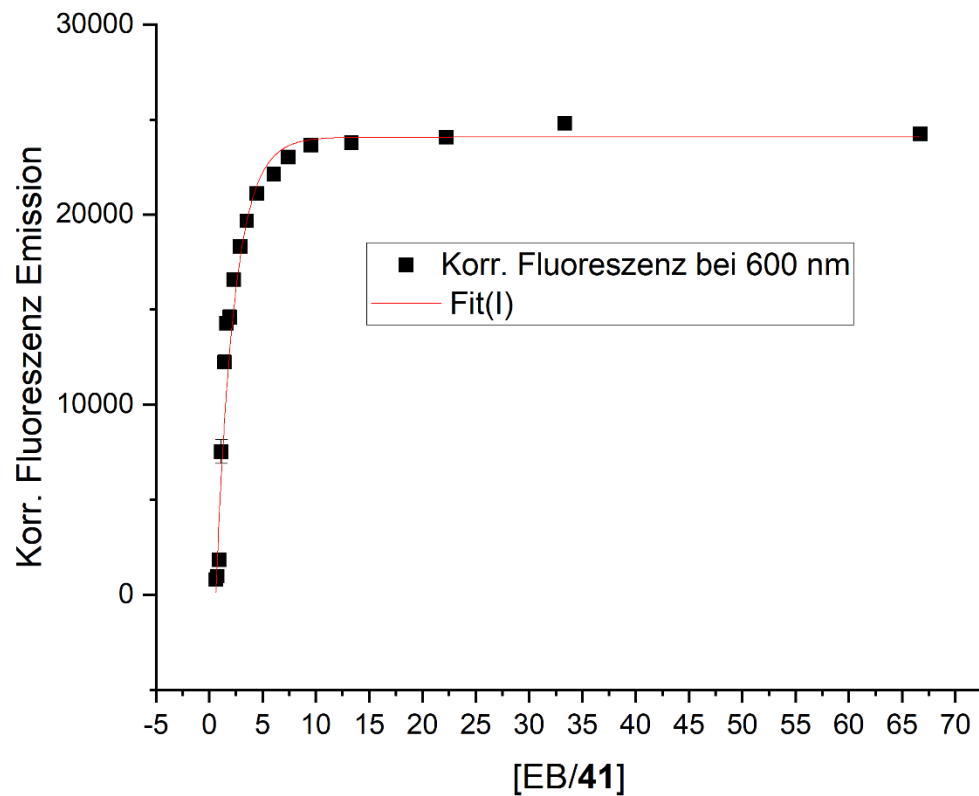
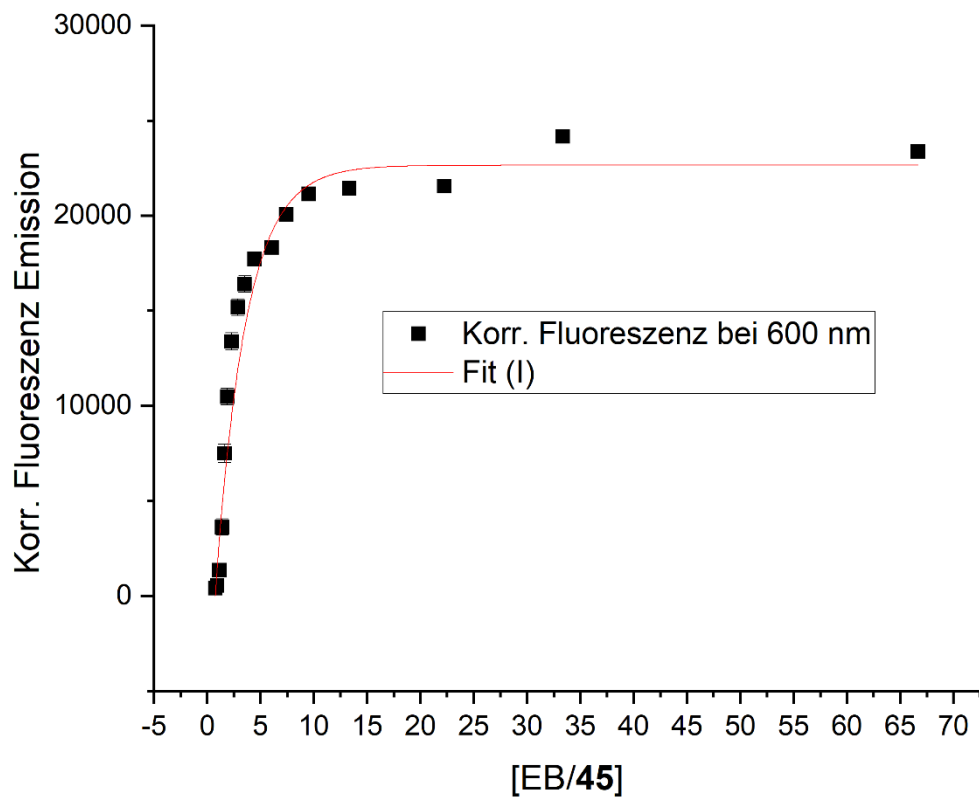


Abbildung 7-22. ^{13}C -NMR Spektrum von **31** in DMSO-d_6 .

Analytische Daten von **32**Abbildung 7-23. ¹H-NMR Spektrum von **32** in DMSO-d₆.Abbildung 7-24. ¹³C-NMR Spektrum von **32** in DMSO-d₆.

Physikochemische DatenEB-Verdrängungsdaten von **41**Abbildung 7-25. Fit der EB-Verdrängungsdaten von **41**.Abbildung 7-26. Fit der EB-Verdrängungsdaten von **45**.

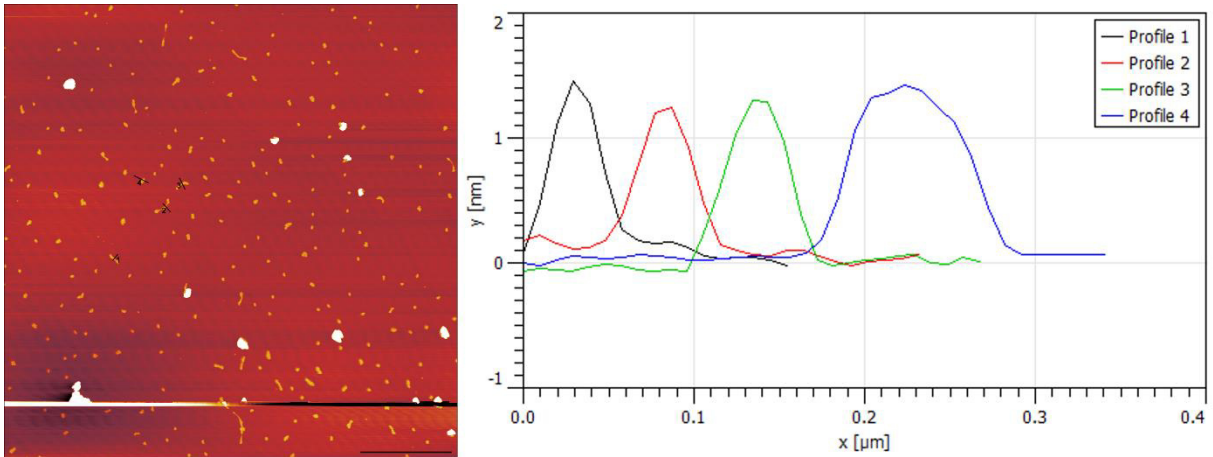


Abbildung 7-27. AFM Daten der Plasmid-DNA und Auswertung der gezeigten Höhenprofile; Maßstab: 2 μm.

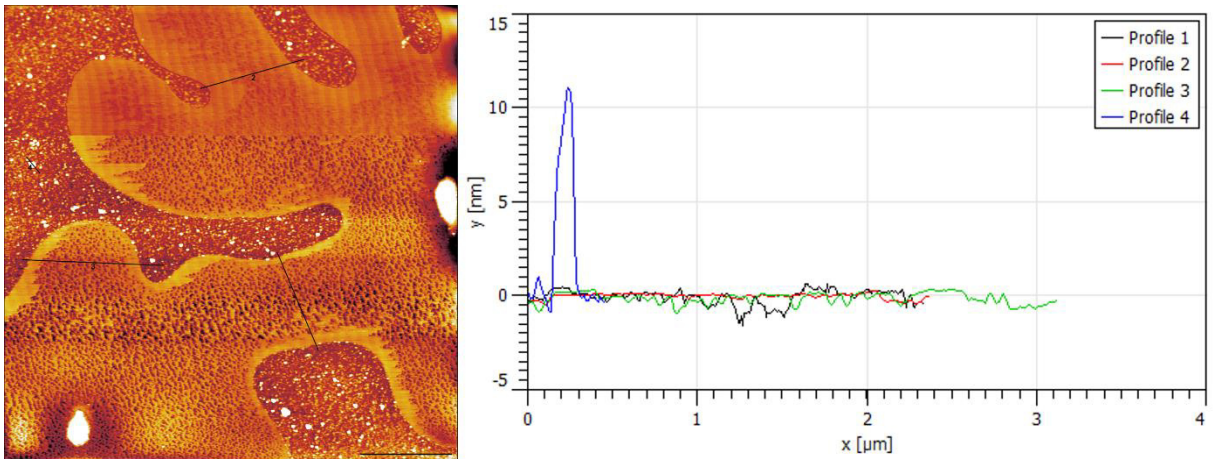


Abbildung 7-28. AFM Daten von **41** in DMSO und Auswertung der gezeigten Höhenprofile; Maßstab: 2 μm.

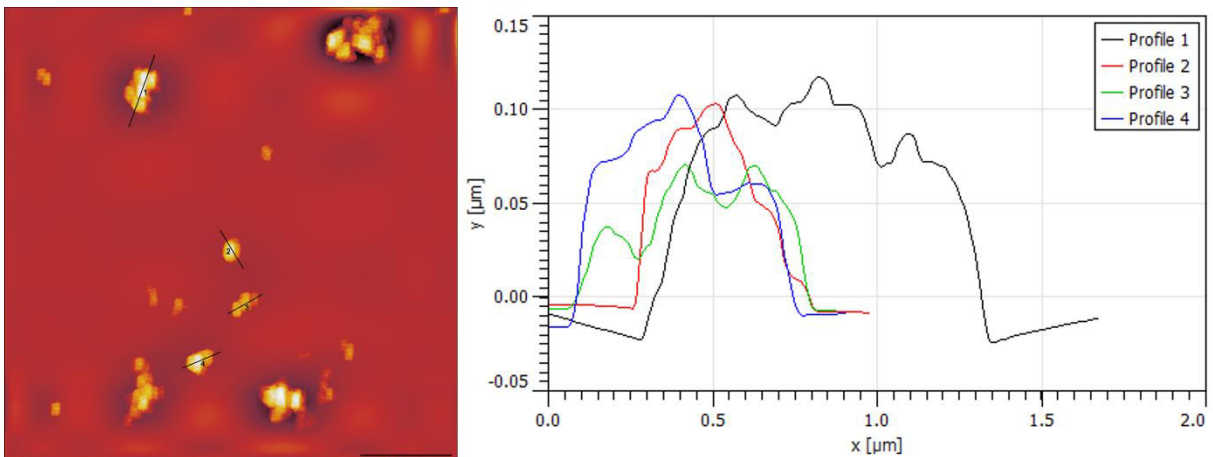


Abbildung 7-29. AFM Daten von **41** in DMSO/H₂O und Auswertung der gezeigten Höhenprofile; Maßstab: 2 μm

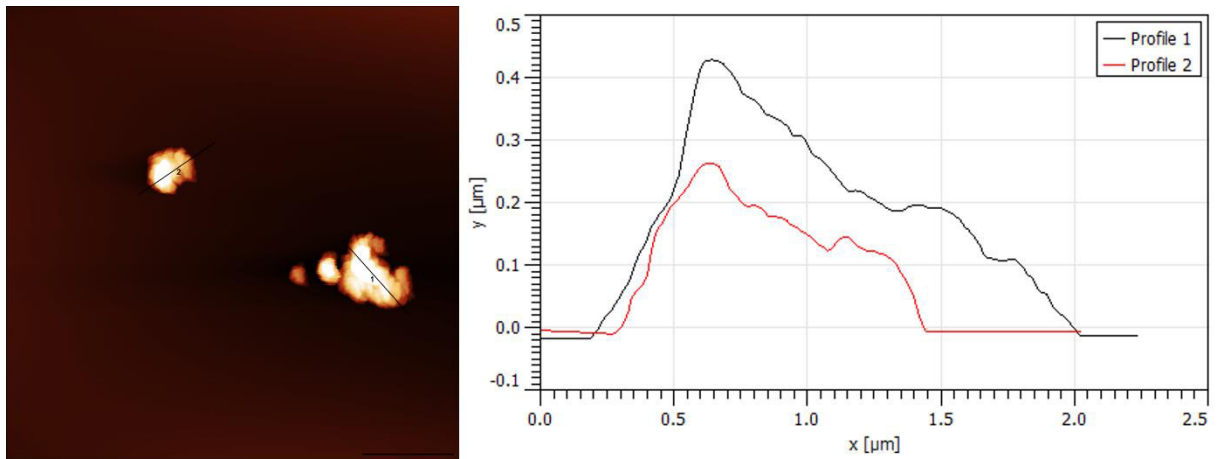


Abbildung 7-30. AFM Daten von **41** aus DMSO mit Plasmid und Auswertung der gezeigten Höhenprofile; Maßstab: 2 μm.

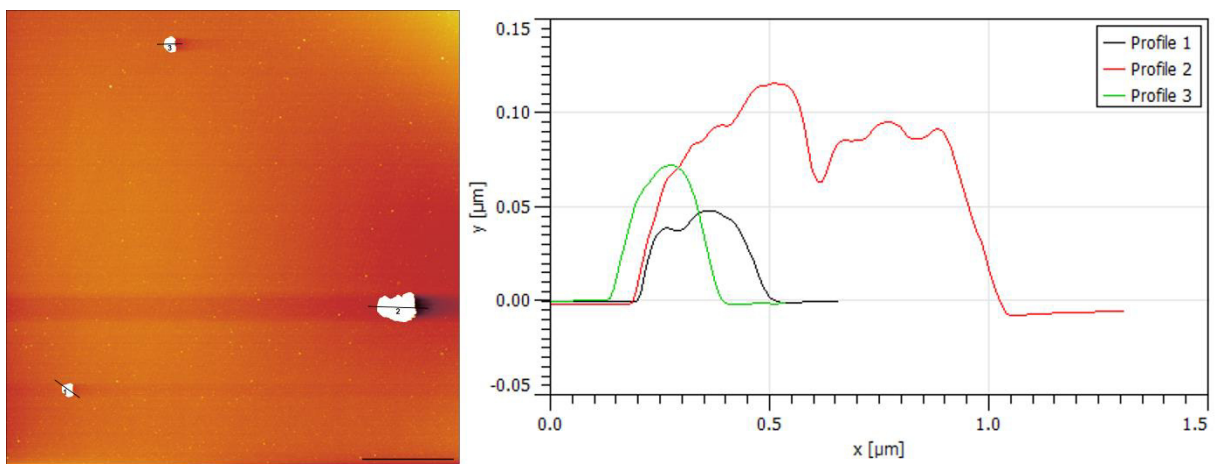


Abbildung 7-31. AFM Daten von **41** aus DMSO/H₂O mit Plasmid und Auswertung der gezeigten Höhenprofile; Maßstab: 2 μm.

Biologische Daten

Transfektionsdaten der Vektoren **41** und **45** im Vergleich zu PEI, Lipofektamine 2000 und CaPO₄-Nanopartikeln.

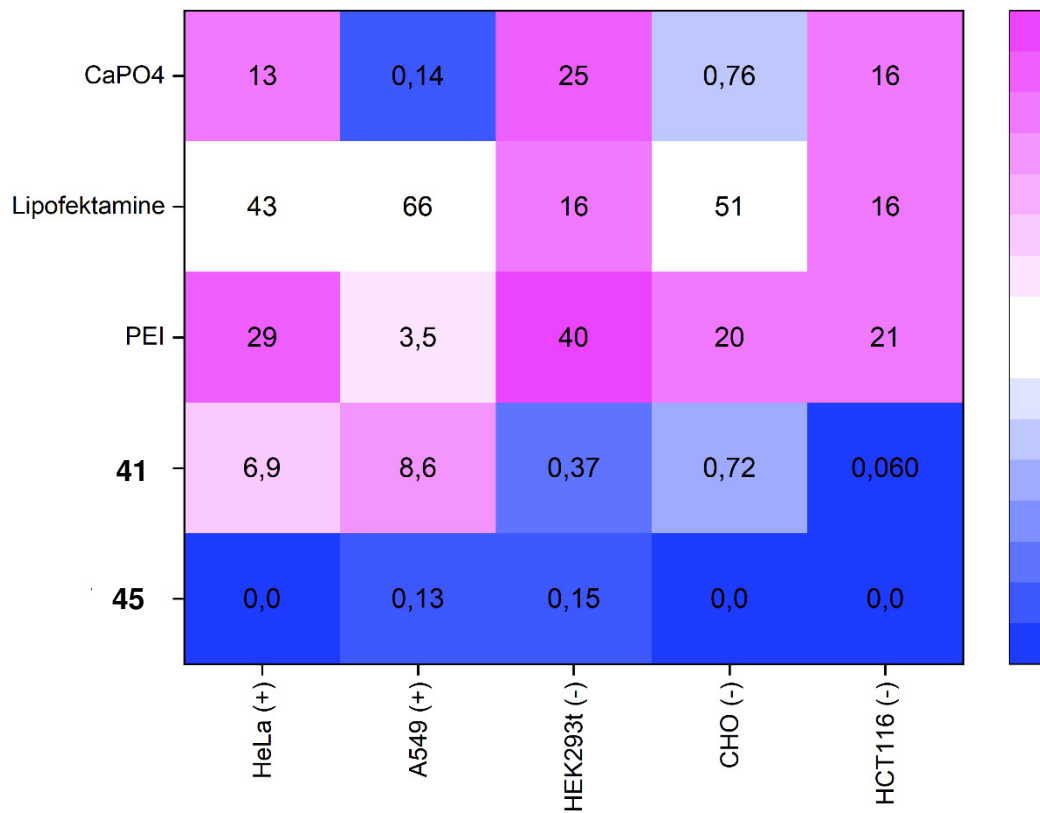


Abbildung 7-32. Zusammenfassung der Transfektionseffizienzen der Vektoren **41** und **45**.

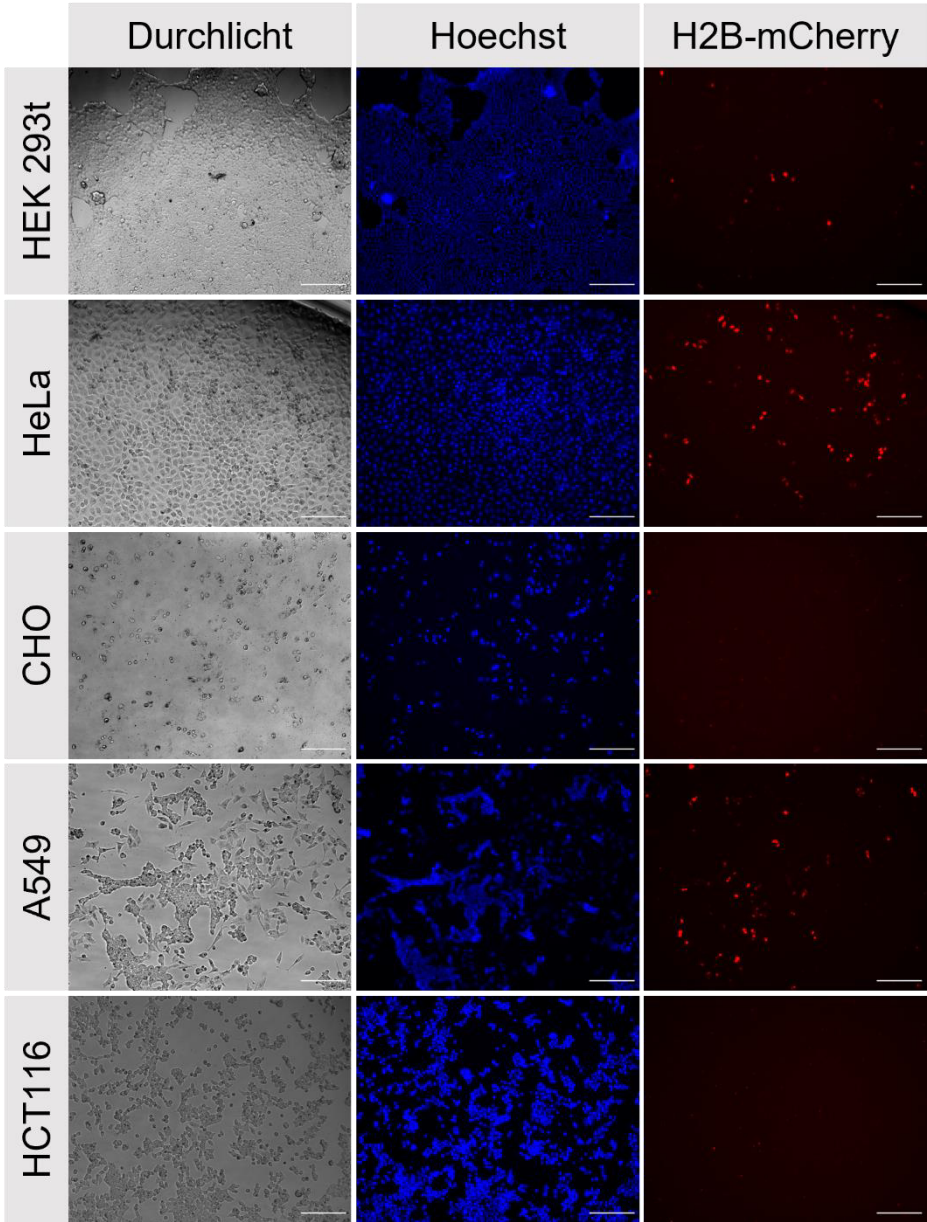


Abbildung 7-33. Repräsentative Mikroskopiebilder von 41 nach Transfektion der Zellen.

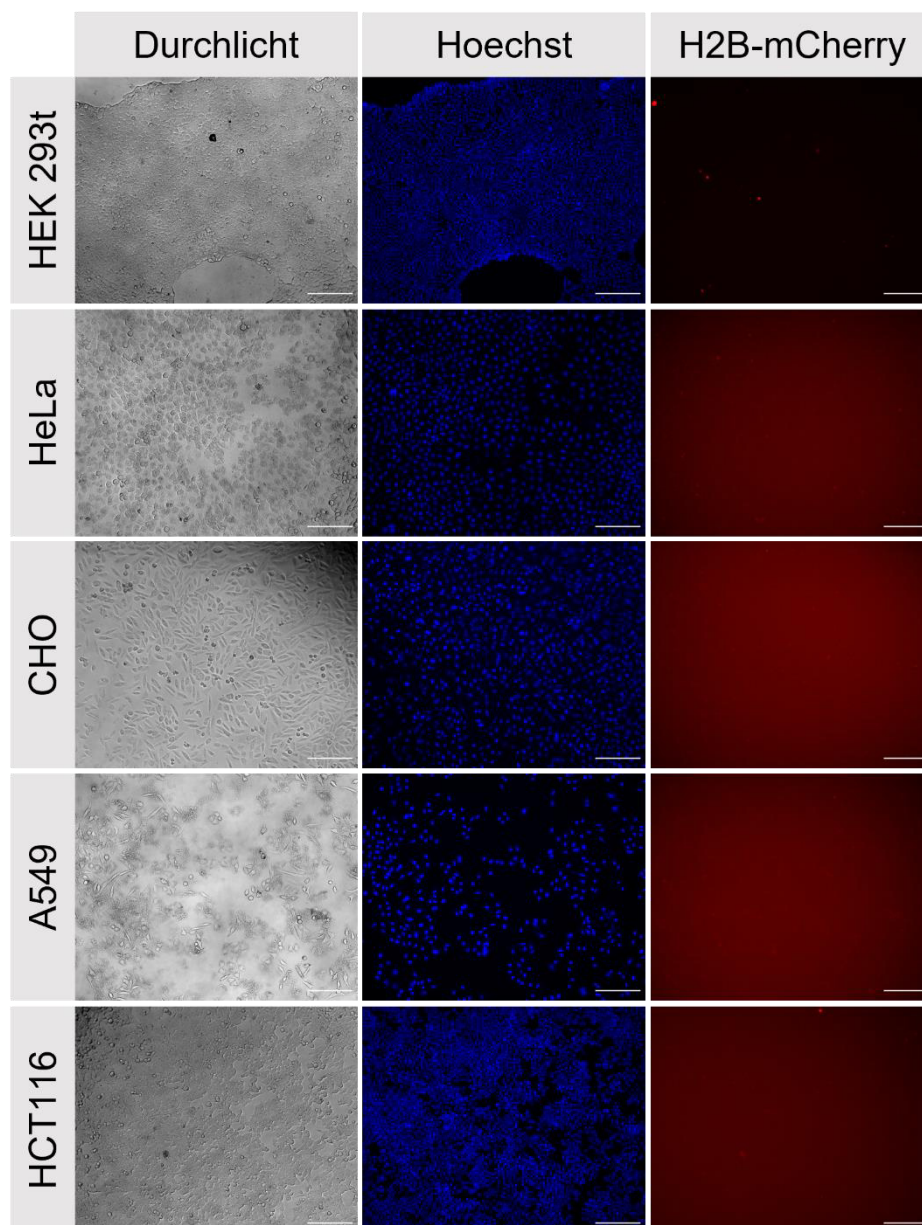


Abbildung 7-34. Repräsentative Mikroskopiebilder von **45** nach Transfektion der Zellen.

Toxizitätsmessungen der Vorgängervektoren an HeLa Zellen in den angegebenen Konzentrationsbereichen.

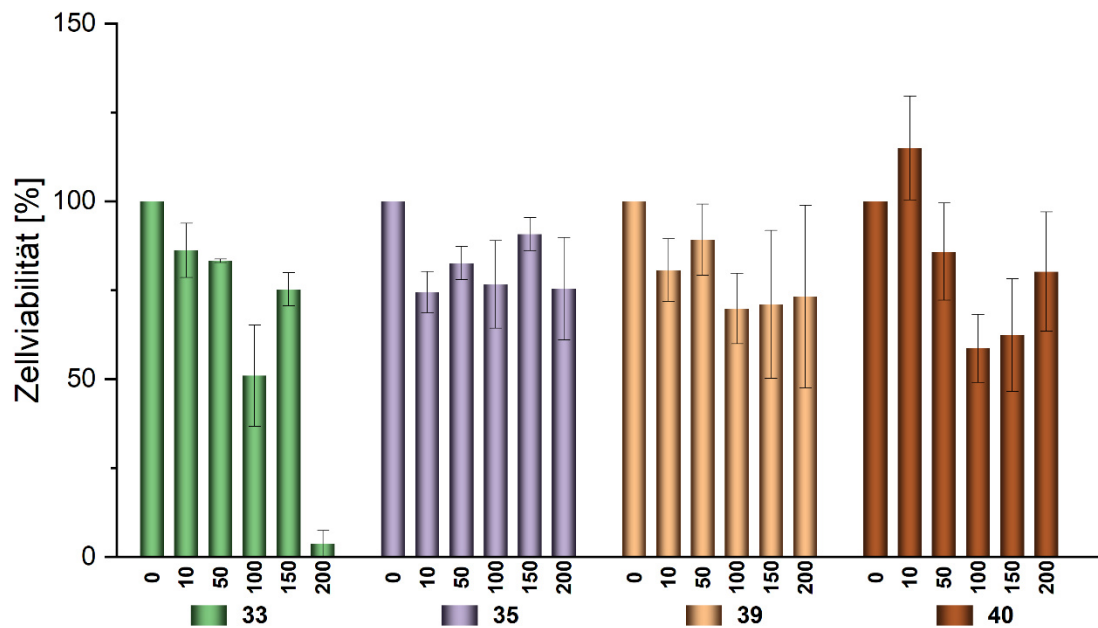


Abbildung 7-35. Zusammenfassung der Toxizitätsmessungen der Vorgängervektoren an HeLa-Zellen in den angegebenen Konzentrationsbereichen.