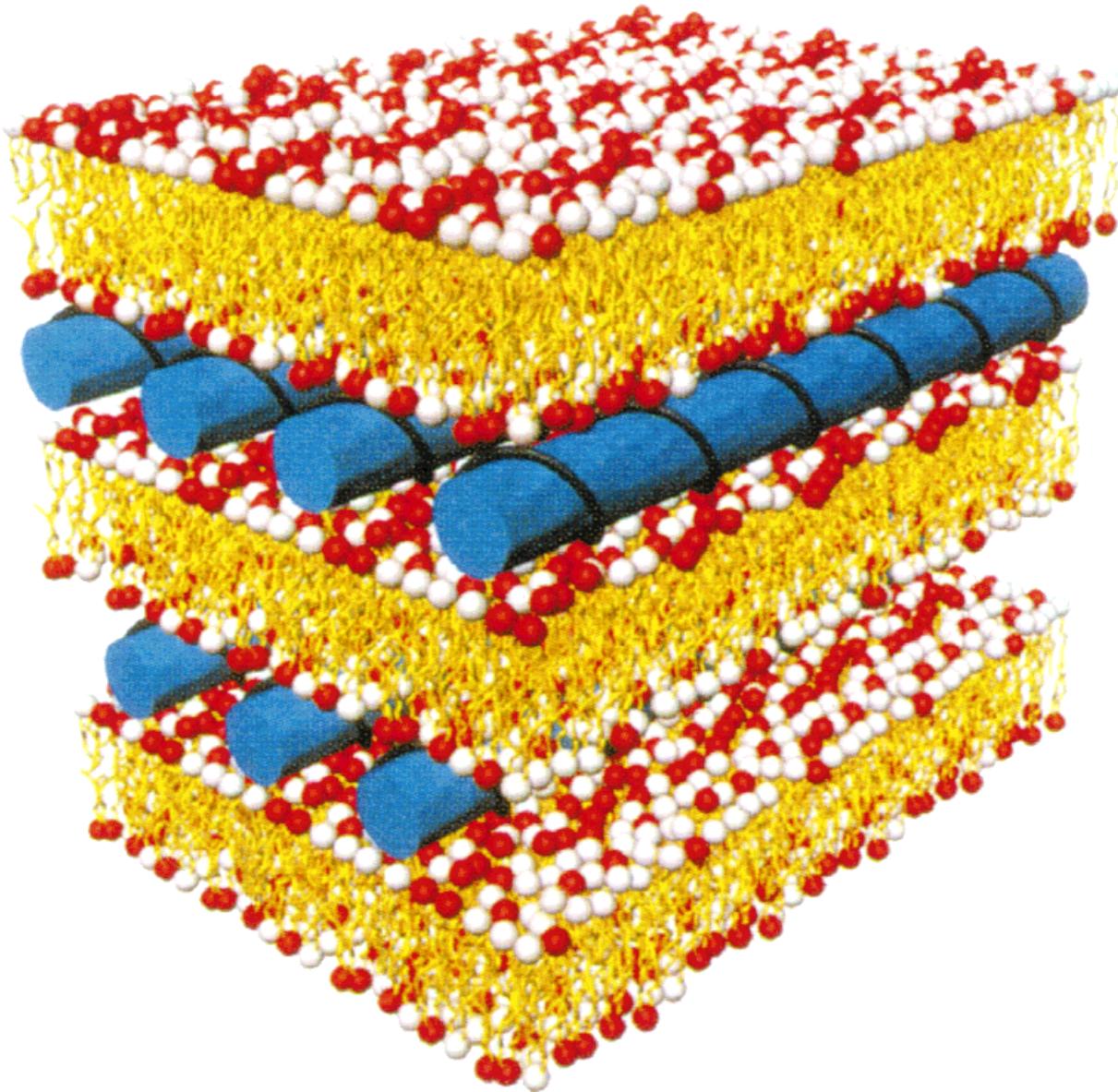


Ein Modell für die lokale Anordnung von Komplexen aus kationischen Liposomen und DNA – solche Komplexe könnten in Zukunft für die Gentherapie von großer Bedeutung sein.



Die DNA-Moleküle sind als Stäbe (blau) dargestellt, die Kopfgruppen der anionischen/zwitterionischen Lipide als weiße Kugeln, die der Cytofektine (kationische Amphiphile) als rote Kugeln (Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung von J. O. Rädler, I. Koltover, T. Salditt und C. R. Safinya).

Kationische Liposomen für die Gentherapie**

Andrew D. Miller*

Kationische Liposomen sind wertvolle Hilfsmittel, um Gene und Nucleinsäuren in Zellen einzuschleusen. Daraus ergibt sich die reizvolle Möglichkeit, daß kationische Liposomen in der Zukunft eine führende Rolle bei der Gentherapie spielen könnten. Sie könnten hier als Vektoren eingesetzt werden (d.h. als Gen-Transporter), die therapeutische Gene und/oder Nucleinsäuren in kranke Zellen und Organe von Patienten transportieren, um deren Krankheit zu behandeln und zu heilen. Wie realistisch ist diese Vorstellung? Sicherlich ist der durch kationische Liposomen vermittelte Trans-

port von Nucleinsäuren für die Gentherapie noch mit vielen Problemen behaftet, doch gab es in jüngster Zeit einige spektakuläre Erfolge. Angesichts dieser Erfolge scheint es keinen Grund mehr zu geben, warum kationische Liposomen nicht für eine generelle Verwendung in der Gentherapie optimiert werden sollten. Die Möglichkeiten einer Partnerschaft zwischen Chemie und Medizin verleihen der Verbesserung und Entwicklung von kationischen Liposomen einen besonderen Reiz. Dieses Arbeitsgebiet ist multidisziplinär; Organiker, Physikoorganiker und Physikochemiker bil-

den dabei die die Vorhut beim Design, der Synthese, der Herstellung und dem Testen von immer besseren kationischen Liposomen. Dieser Aufsatz demonstriert die zunehmende Partnerschaft zwischen Chemie und Medizin, wobei die chemische Herkunft von kationischen Liposomen, ihre physikalischen Eigenschaften in Komplexen mit Nucleinsäuren, ihre biologische Wirksamkeit und ihre derzeitigen Grenzen beschrieben werden.

Stichwörter: Gentherapie • Lipide • Liposomen • Nucleinsäuren • Vesikel

1. Einführung

Die Sequenzierung des menschlichen Genoms schreitet zügig voran; die genetischen Codes von Mikroorganismen wie dem Bakterium *Methanococcus jannaschii* und von Hefe sind vollständig bestimmt, und die genetischen Codes von weiteren Organismen werden ebenfalls bald bekannt sein.^[1] Alle diese Informationen sollten der medizinischen Forschung beispiellose Möglichkeiten bieten, die genetischen Grundlagen von Krankheiten zu verstehen. Dies hätte sehr wahrscheinlich die Gentherapie als integralen Bestandteil bei Strategien zur Heilung von Krankheiten zur Folge.^[2] Gentherapie wird klinisch noch nicht angewendet, doch die Gültigkeit des Prinzips ist unzweifelhaft.^[2] Die Wissenschaftler, die auf dem noch jungen Gebiet der Gentherapie arbeiten (darunter auch ich), sind überzeugt, daß sie das Erscheinungsbild der Medizin im nächsten Jahrhundert verändern kann, mit beträchtlichen Konsequenzen für die Arbeitsweise der pharmazeutischen Industrie.

[*] Dr. A. D. Miller
Imperial College of Science, Technology & Medicine
Department of Chemistry
South Kensington, London, SW7 2AY (Großbritannien)
Fax: (+44) 171-594-5803
E-mail: a.miller@ic.ac.uk

Das Prinzip der Gentherapie ist einfach: Wenn ein Patient an einer Krankheit leidet, die durch einen bekannten genetischen Defekt verursacht wird, ist zu erwarten, daß das Einschleusen einer korrekten Kopie des defekten Gens in die kranke Zelle oder das kranke Organ durch einen dafür entworfenen Vektor den genetischen Defekt direkt korrigieren und die Krankheit heilen kann. Wenn der Patient hingegen an einer Krankheit leidet, die keine klare genetische Ursache hat, deren Pathophysiologie aber bekannt ist, könnte ein solcher Vektor dazu verwendet werden, um ein oder mehrere korrigierende Gene oder andere nucleinsäureartige Wirkstoffe (z.B. Antisense-Oligonucleotide oder mRNA) zu den erkrankten Zellen zu bringen und so die bekannte Pathophysiologie der Krankheit auf eine andere Art zu unterbrechen. Daher könnte die Gentherapie ganz allgemein als „Einsatz von Genen als Medizin bei der Behandlung von Krankheiten“ oder als „Einschleusen von Nucleinsäuren (mit einem Vektor) in einen Patienten für therapeutische Zwecke“ definiert werden.

Gentherapie sollte auf keinen Fall als eine Methode mißverstanden werden, die entworfen wurde, um zukünftige Generationen von genetischen und anderen, komplexeren Krankheiten durch permanente Manipulation des menschlichen Genoms zu befreien. Vielmehr sollten Gene und andere Nucleinsäureagentien als Alternativen zu kleinen Molekülwirkstoffen angesehen werden, die die reale Mög-

lichkeit der Heilung bieten, anstatt nur eine Behandlung der Symptome, wie es momentan bei allen nichtbakteriellen Infektionen der Fall ist. Wenn also Gene oder andere Nucleinsäureagentien als „Wirkstoffe“ anzusehen sind, dann ist die prinzipielle Hürde für den aufkommenden Beruf des Gentherapeuten das schon aus anderen Bereichen bekannte Problem der Wirkstoffvermittlung. Mit anderen Worten: Wie erreichen wir, therapeutische Gene oder Nucleinsäuren so an den Ort der Krankheit zu transportieren und freizusetzen, daß sie nur in die erkrankten Zellen eindringen? Die Antwort wird letztlich in der richtigen Wahl des Vektors liegen, der die Nucleinsäuren verabreichen soll.

2. Transportvektoren für Nucleinsäuren

Gegenwärtig teilt man Vektoren hauptsächlich in zwei Kategorien ein, nämlich virale und nichtvirale. Keine dieser Kategorien kann von sich behaupten, das universelle Mittel der Wahl für den Transport von Nucleinsäuren zu sein, da beide Probleme mit sich bringen, die vor der klinischen Anwendung noch gelöst werden müssen. Gegenwärtig erfüllt noch kein Transportvektor für Nucleinsäuren die Kriterien eines perfekten Vektors, z.B. eine präzise Freisetzung der Nucleinsäure und keine toxischen Nebenwirkungen. Unter den bisher bekannten nichtviralen Vektoren sind jedoch die kationischen Liposomen (die das Thema dieses Aufsatzes sind) bezüglich ihrer Möglichkeiten als klinisch verwendbare Vektorsysteme für den Transport von therapeutischen Nucleinsäuren im Patienten^[3, 4] besonders vielversprechend. Dies ist besonders für die Organiker, Physikoorganiker und Physikochemiker, die im Gebiet zwischen der Chemie und der Medizin eine Rolle spielen wollen, ein reizvolles Angebot, da die Formulierung und der Einsatz kationischer Liposomen im wesentlichen ein „Problem für Chemiker“ sind, was im folgenden näher erläutert werden soll.

2.1. Kationische Liposomen

Kationische Liposomen werden entweder aus einem einzelnen kationischen Amphiphil, einem „Cytofectin“ (*cyto*- für Zelle und *-fectin* für Transfektion, d.h. Gentransport und -expression), gebildet oder, was üblicher ist, aus einer Kom-

bination aus einem Cytofectin und einem neutralen Lipid. Die Art, auf die sie den Nucleinsäuretransport bewirken, ist recht einfach: Positiv geladene Liposomen wechselwirken elektrostatisch mit negativ geladenen Nucleinsäuresequenzen, so daß Komplexe entstehen, die in eine Zelle eindringen können. Dort werden dann die Nucleinsäuresequenzen langsam freigesetzt, entweder um im Zellkern exprimiert zu werden, oder um die Genexpression zu kontrollieren. In diesem Aufsatz wird verdeutlicht werden, daß dieses verführerisch einfache Prinzip leider viele noch ungelöste schwierige Probleme nach sich zieht. Wegen dieser Probleme werden die meisten beschriebenen kationischen Liposomen wahrscheinlich keine klinische Verwendung finden. Das soll aber nicht heißen, daß die kritischen Probleme des durch kationische Liposomen vermittelten Transportes nicht lösbar sind. Die durch kationische Liposomen unterstützte Gentherapie wird in absehbarer Zukunft sicherlich klinische Realität sein, und Chemiker dürften bei der Verwirklichung dieses Ziels eine Schlüsselrolle spielen.

2.2. Andere Vektoren

Eine Diskussion der zu den kationischen Liposomen alternativen nichtviralen Vektorsysteme und natürlich der viralen Vektoren würde den Rahmen dieses Aufsatzes sprengen. Unter den zu den kationischen Liposomen alternativen chemischen Vektorsystemen gehören Calciumphosphatfällung, (Diethylamino)ethyldextran und Polybrene (ein Copolymer aus *N,N,N',N'*-Tetramethyl-1,6-hexandiamin und 1,3-Dibrompropan; kompliziertere chemische Vektoren werden später im Hinblick auf die Entwicklung kationischer Liposomensysteme in diesem Aufsatz erwähnt werden). Physikalische Methoden wie Mikroinjektion, Elektroporation und Bioballistik sind zwar effektiv, aber mit Ausnahme der letzten Methode für klinische Zwecke vermutlich nicht verwendbar. Schließlich sollte nicht vergessen werden, daß bei den viralen Vektoren die Adenoviren, das Adeno-assoziierte Virus und Retroviren schon in erheblichem Umfang für den Gentransport verwendet werden. Für nähere Einzelheiten zu diesen Methoden wird auf allgemeine Übersichten verwiesen, in denen mehr über die Verwendung dieser Vektorsysteme zu erfahren ist.^[5–15]



Andrew David Miller, geboren 1963, studierte Chemie an der University of Bristol und erhielt dort 1984 seinen B.Sc. Für seine Dissertation arbeitete er an der University of Cambridge (Großbritannien) in der Arbeitsgruppe von Professor Alan Battersby, in der er noch ein weiteres Jahr als Postdoktorand blieb, bevor er zur Arbeitsgruppe von Professor Jeremy Knowles an der Harvard University (USA) stieß. Seit 1990 lehrt er in der Abteilung für Chemie des Imperial College in London, wo er vor allem auf dem Gebiet der Chemie von Stressproteinen arbeitet sowie am Entwurf von Vektoren für den Transport von Nucleinsäuren in Zellen zum Zwecke der Gentherapie. Er erhielt mehrere Preise und Stipendien, darunter die Thomas-Malkin- und Robert-Garner-Preise für Chemie (Bristol), ein Stipendium des Emmanuel College (Cambridge), ein Stipendium vom Lindemann Trust und kürzlich ein Stipendium vom Leverhulme Trust.

3. Gegenwärtig verwendete Formulierungen für kationische Liposomen

Die Pionierarbeiten zur Verwendung kationischer Liposomen beim Transport von Nucleinsäuren leisteten Felgner et al., die ein mittlerweile unter dem Namen Lipofectin (GIBCO/BRL)^[16] kommerziell erhältliches kationisches Liposom entwickelten. Lipofectin setzt sich im Verhältnis 1:1 aus dem Cytofectin DOTMA **1** und dem natürlich vorkommenden Lipid DOPE **2** zusammen. Seit dieser Schlüsselerfindung sind mehr als zwanzig neue Liposomensysteme für den Wirkstofftransport beschrieben worden, von denen einige im Handel erhältlich sind (Tabelle 1). In der Regel bestehen diese neuen Systeme aus der Kombination eines neuen, synthetischen Cytofectins mit DOPE **2** oder einem anderen neutralen Lipid. Sowohl die Wahl des Cytofectins als auch die Formulierungsstrategie sind Schlüsselemente für den Erfolg einer Formulierung kationischer Liposomen. Deshalb werden hier sowohl die Struktur und Synthesen einiger Cytofectine als auch die Prozeduren zur Bildung kationischer Liposomen aus diesen Amphiphilen beschrieben.

3.1. Strukturen von Cytofectinen

Cytofectine bestehen aus einer kationischen Kopfgruppe, die über einen Linker mit einer hydrophoben Einheit verbunden ist. Alle Cytofectine sind daher positiv geladene Amphiphile. Dies ist das notwendige Strukturprinzip, das diese ansonsten vielfältige Strukturfamilie vereinigt. In diesem Aufsatz werden die Cytofectine in mehrere Untergruppen eingeteilt: DOTMA-Analoga, komplexe Alkylamine und -amide, Cholesterinderivate sowie synthetische Derivate von Dipalmitoyl-L- α -phosphatidylethanolamin, -glutamat, -imidazol und -phosphonat.

DOTMA-Analoga werden am häufigsten bei der Formulierung kationischer Liposomen verwendet. Die wichtigsten Analoga sind DOTAP **3**,^[17] DMRIE **4**^[18] und DOSPA **5**.

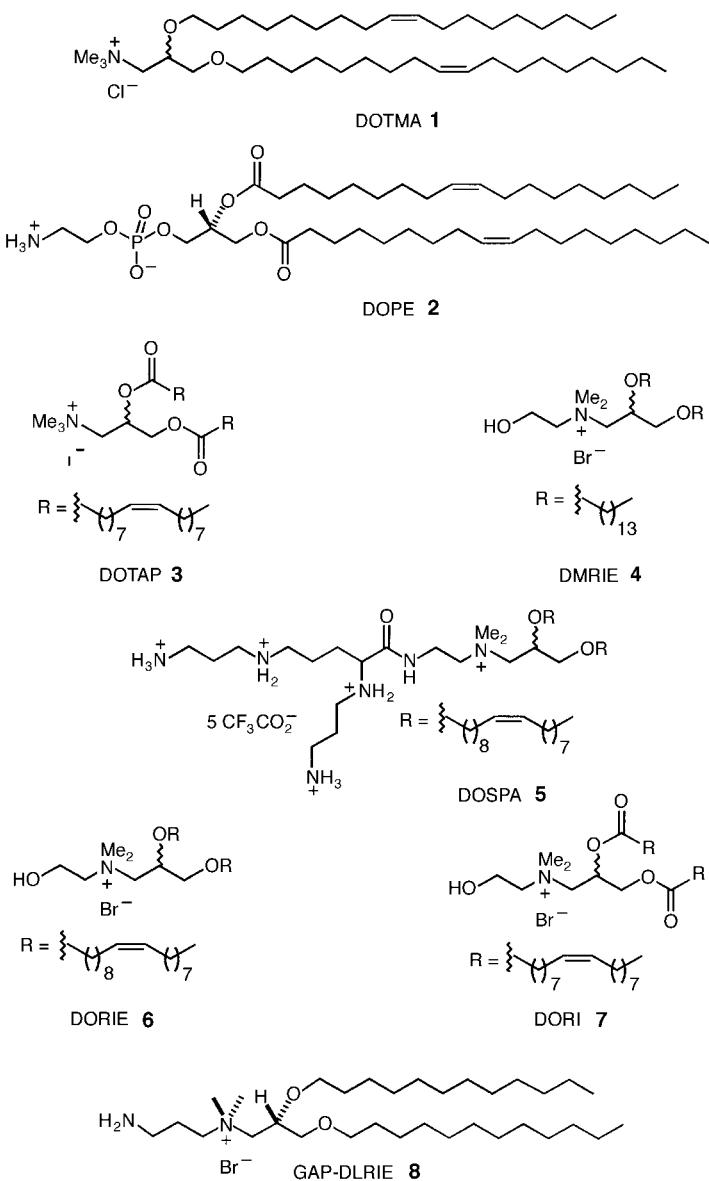


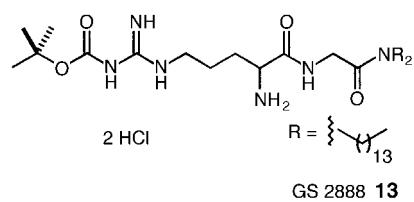
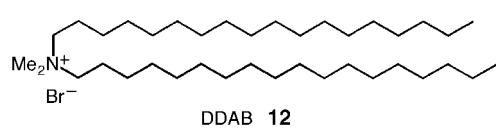
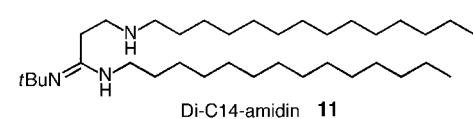
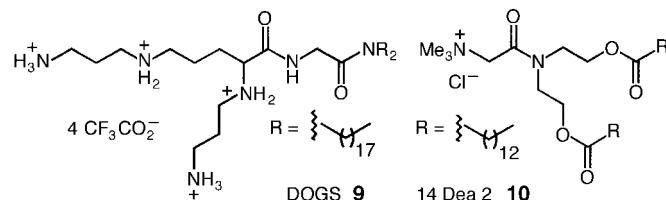
Tabelle 1. Die wichtigsten Formulierungen kationischer Liposomen.^[a]

Cytofectin	Im Handel:		Nicht im Handel:	
	Formulierung (Handelsname/Hersteller)	Cytofectin	Cytofectin	Formulierung
DOTMA 1 ^[16]	DOTMA/DOPE 1:1 ^[b] (Lipofectin/GIBCO BRL)	DMRIE 4 ^[18] DORIE 6 ^[18]	DORIE/DOPE 1:1 DORIE/DOPE 1:1	DMRIE/DOPE 1:1
DOTAP 3 ^[17]	DOTAP	DORI 7 ^[18, 20] 14 Dea 2 10 ^[23, 24]	DORI/DOPE 1:1 14 Dea 2	DORI/DOPE 1:1 14 Dea 2
DOSPA 5	(DOTAP/Boehringer Mannheim)	GS 2888 13 ^[28]	GS 2888/DOPE 1:1	GS 2888/DOPE 1:1
DOGS 9 ^[22]	DOSPA/DOPE 3:1 ^[b] (LipofectAMINE/GIBCO BRL)	DC-Chol 14 ^[29] Cholsäurehexaamin 17 ^[31]	DC-Chol/DOPE 6:4 17 /DOPE 1:1 ^[b]	DC-Chol/DOPE 6:4 17 /DOPE 1:1 ^[b]
Di-C14-amidin 11 ^[25, 26]	DOGS (Transfectam/Promega)	Lipid 67 18 ^[32]	Lipid 67/DOPE 1:2	Lipid 67/DOPE 1:2
DDAB 12 ^[27]	Di-C14-amidin/DOPE 1:1 (Clonfectin/Clontech)	CTAP 19 ^[33]	CTAP/DOPE 1:2	CTAP/DOPE 1:2
Cholesterylspermidin 20 ^[35]	DDAB/DOPE 1:2.5 ^[b] (LipofectAce/GIBCO BRL)	BGTC 21 ^[36]	BGTC/DOPE 3:2	BGTC/DOPE 3:2
	Cholesterylspermidin (Transfectall/Applon Inc.)	DPPES 22 ^[22] Lys-Pam ₂ -GroPEtn 23 ^[37]	DPPES	DPPES
		L-PE 23a ^[38]	Lys-Pam ₂ -GroPEtn/Chol/egg PC 1.5:3.0:5.5 ^[b]	Lys-Pam ₂ -GroPEtn/Chol/egg PC 1.5:3.0:5.5 ^[b]
		2C ₁₂ -L-Glu-ph-C ₂ -N ⁺ Br ⁻ 24 ^[39]	L-PE/CE β A 39 6:4	L-PE/CE β A 39 6:4
		2C ₁₄ -L-Glu-ph-C ₂ -N ⁺ Cl ⁻ 25 ^[39]	2C ₁₂ -L-Glu-ph-C ₂ -N ⁺	2C ₁₂ -L-Glu-ph-C ₂ -N ⁺
		DOTIM 26 ^[40]	2C ₁₄ -L-Glu-C ₂ -N ⁺	2C ₁₄ -L-Glu-C ₂ -N ⁺
			DOTIM/Chol 1:1 oder DOTIM/DOPE 1:1	DOTIM/Chol 1:1 oder DOTIM/DOPE 1:1

[a] Verwendete Abkürzungen: Chol: Cholesterin **38**; egg PC: Ei-Phosphatidylcholin. Verhältnisse sind Molverhältnisse, sofern nicht anders angegeben.

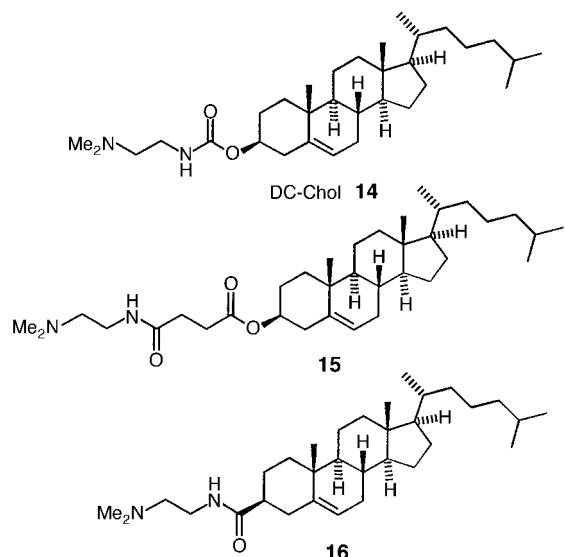
[b] Massenverhältnis.

Weitere DOTMA-Analoga sind z.B. DORIE **6**^[18] und das Esteranalogon DORI **7**.^[18–20] Das jüngste und leistungsfähigste Mitglied dieser Untergruppe ist GAP-DLRIE **8**.^[21] Die wichtigsten Mitglieder aus der Untergruppe der komplexen Alkylamine und -amide sind DOGS **9**,^[22] 14 Dea 2 **10**,^[23, 24]

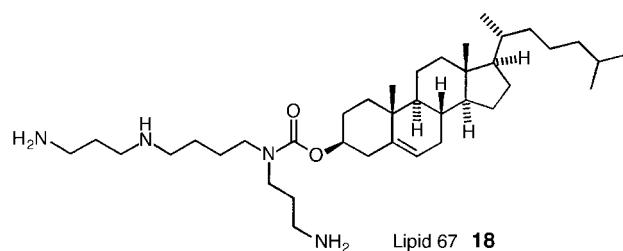
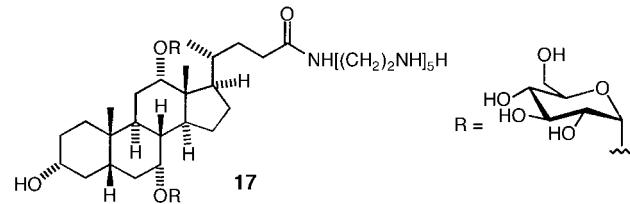


Di-C14-amidin **11**^[25, 26] und DDAB **12**.^[27] Homologe sowohl von 14 Dea 2 als auch von Di-C14-amidin sind bereits beschrieben worden,^[23–26] und 1996 wurde GS 2888 **13** dieser Untergruppe hinzugefügt.^[28] Von den erwähnten Substanzen haben lediglich DOGS **9** und DDAB **12** einen größeren Anwenderkreis gefunden.

Das erste beschriebene Cholesterinderivat ist das immer noch häufig verwendete DC-Chol **14**.^[29] In der Folgezeit

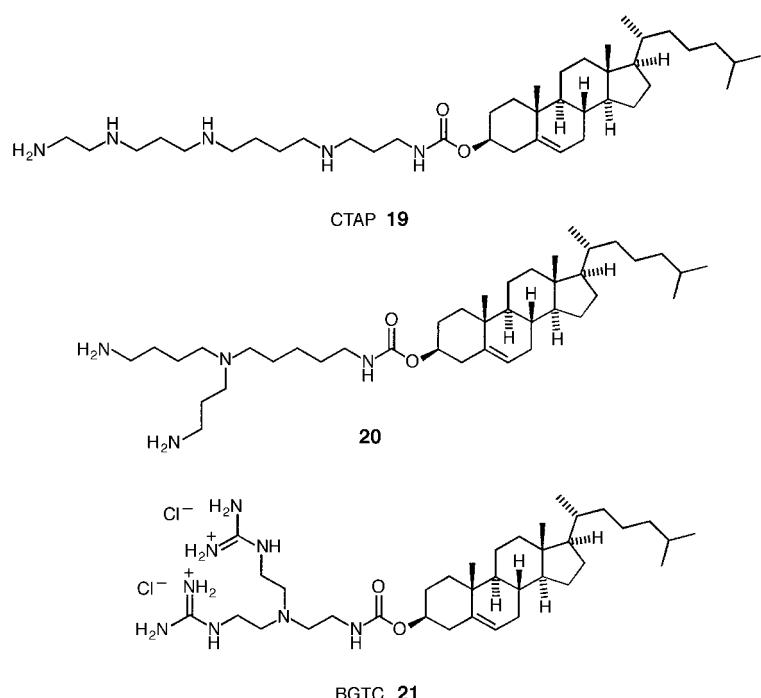


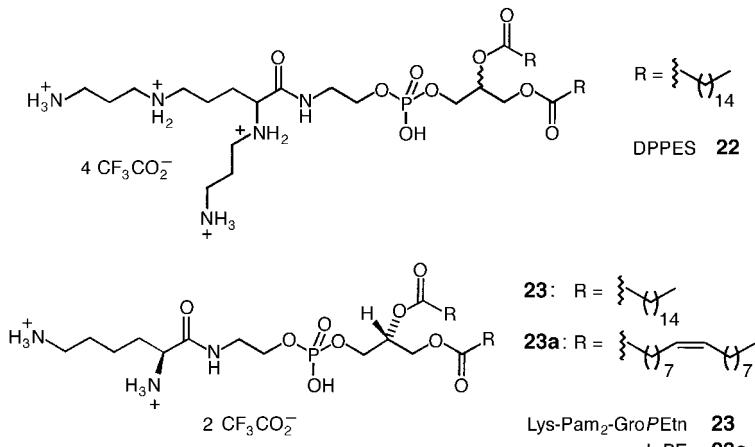
wurden weitere Derivate beschrieben, darunter **15** und **16**^[30] sowie Esteranaloga dieser beiden Verbindungen.^[17] 1996 wurde von einer eher ungewöhnlichen Klasse von Amphi-philen mit einer kationischen Polyamincholesteryl-Oberfläche berichtet, die auf drei natürlich vorkommenden Gallensäuren basiert.^[31] Ein typisches Beispiel ist das bisglykosulierte Cholsäurehexaamin **17**. Zwei der wirksamsten bis heute



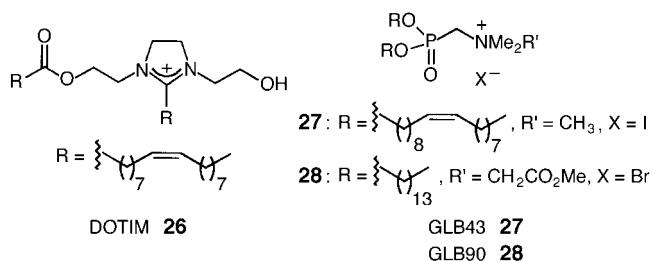
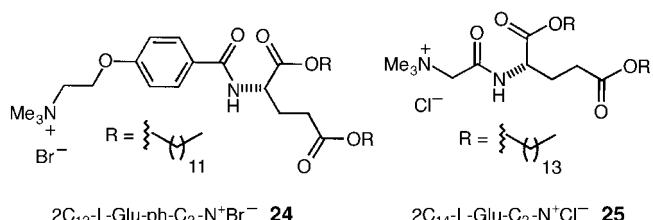
beschriebenen Cytofectine sind Cholesterinderivate. Dabei handelt es sich um das Polyamin Lipid 67 **18**^[32] und um CTAP **19**.^[33] Weitere Polyaminderivate wurden ebenfalls erst in den letzten Jahren beschrieben,^[34–36] darunter Cholesteryl-spermidin **20**^[35] und BGTC **21**.^[36]

In den verbleibenden Untergruppen wurden vor allem zwei Derivate von Dipalmitoyl- l - α -phosphatidylethanolamin beschrieben, und zwar DPPES **22**^[22] und Lys-Pam₂-GroPEtn **23**.^[37] Ein drittes Derivat, L-PE **23a**, ist die „Oleyl-version“ von **23**.^[3, 38] 2C₁₂-L-Glu-ph-C₂-N⁺Br[–] **24** und 2C₁₄-L-Glu-C₂-N⁺Cl[–] **25** gelten als die besten von Glutamat ab-



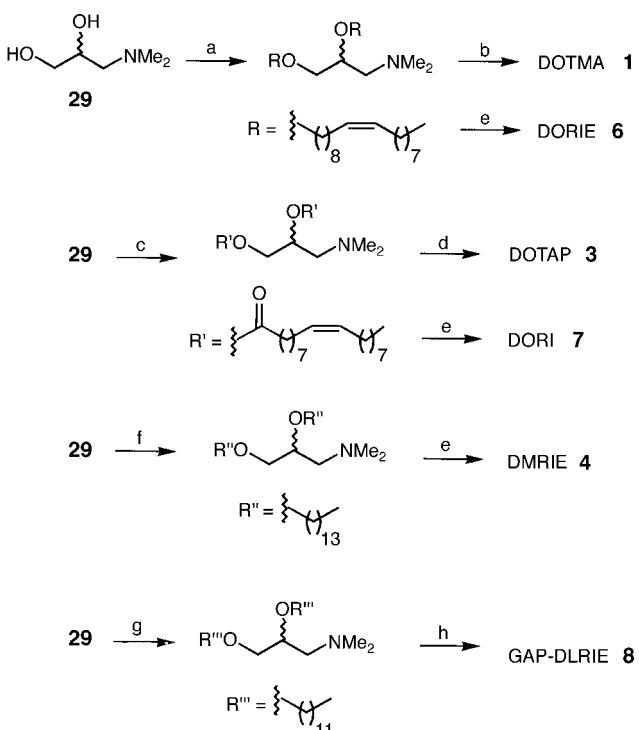


geleiteten Cytofectine.^[24, 39] Die Synthesen von Imidazolderivaten wie DOTIM **26**^[40] und von zwei Phosphonatdiesterderivaten, GLB43 **27** und GLB90 **28**, wurden 1995 veröffentlicht.^[41]



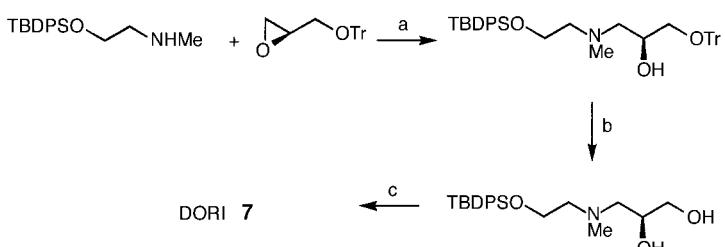
3.2. Synthesen von Cytofectinen

Die organischen Synthesen der wichtigsten Cytofectine sind in der Regel kurz und verlaufen mit hohen Ausbeuten, was gewiß zu ihrer Verwendung beigetragen hat. Die Synthese von DOTMA **1** wird zusammen mit den Synthesen der DOTMA-Analoga DOTAP **3**, DMRIE **4**, DORIE **6** und DORI **7** in Schema 1 gezeigt. DOTMA **1** wird in zwei Schritten aus 3-(Dimethylamino)-1,2-Propandiol **29** hergestellt.^[16] DOTAP **3** und DORI **7** werden beide auf ähnliche Weise über die Veretherung des Propandiols **29** mit Oleylresten und anschließende N-Alkylierung des entstehenden tertiären Amins entweder mit Methyljodid oder mit 2-Bromethanol hergestellt.^[17, 18] Alternativ entstehen bei der Alkylierung von **29** mit Myristyl- oder Oleylmesylat und anschließender N-Alkylierung mit 2-Bromethanol DMRIE **4** bzw. DORIE **6**.^[18] GAP-DLRIE **8** wird ähnlich wie **4** und **6** hergestellt.^[21] Es wurden ebenfalls komplexere Synthesen von



Schema 1. Reagenzien und Bedingungen: a) Xylol, *t*BuOK (3 Äquiv.), Oleyltoluolsulfonat (3 Äquiv.) oder Oleylmesylat (3 Äquiv.), 140 °C, 3 h; b) MeCl, 70 °C, 48 h; c) Et₂O, Pyridin, Oleoylchlorid, 40 h, 78%; d) CHCl₃:DMSO (1:1), MeI, 63%; e) Br(CH₂)₂OH; f) Xylol, *t*BuOK (3 Äquiv.), Myristylmesylat (3 Äquiv.), 70 °C; g) 1. THF (wasserfrei), NaH, Rückfluß, 24 h; 2. THF (wasserfrei), Dodecylmesylat (3 Äquiv.), Rückfluß, 72 h, 65%; h) 1. DMF (wasserfrei), *N*-(3-Brompropyl)phthalimid (2 Äquiv.), 105 °C, 72 h, 61%; 2. EtOH, Hydrazin (30 Äquiv.), Raumtemperatur (RT), 18 h, 75%.

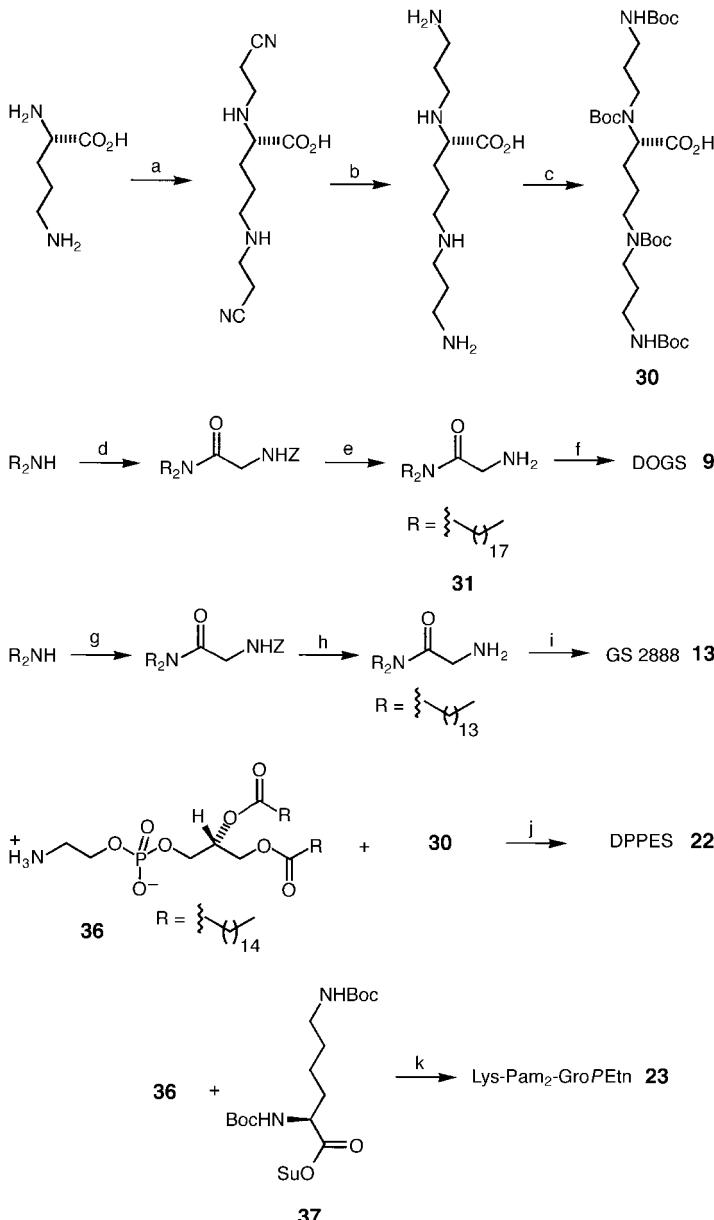
DOTMA-Analoga beschrieben, z. B. eine elegante Synthese von DORI **7** (Schema 2),^[19] die sich als flexibel genug erwiesen, um die Synthesen einer Reihe von Fettsäureanaloga von **7** zu ermöglichen.^[20] Die Synthese des Polyamins DOSPA **5** ist offenbar nicht veröffentlicht worden.



Schema 2. Reagenzien und Bedingungen: a) EtOH, LiClO₄ (2 Äquiv.), 65 °C, 72%; b) Et₂O, 85% HCO₂H, 71–75%; c) 1. CH₂Cl₂, Oleoylchlorid (2.2 Äquiv.), Et₃N, DMAP (kat.), 0 °C, 92%; 2. THF, TBAF (3 Äquiv.), 0 °C, 88–91%; 3. MeI. TBDPS = *tert*-Butyldiphenylsilyl, Tr = Triphenylmethyl, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, TBAF = Tetrabutylammoniumfluorid.

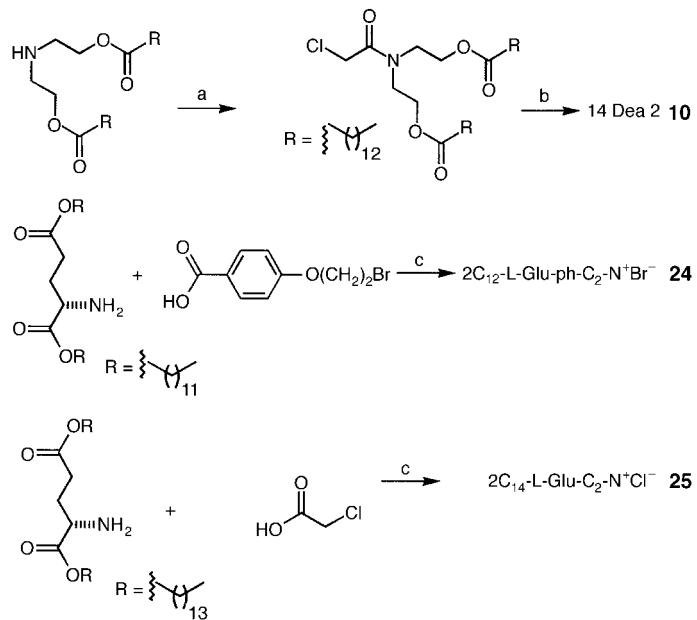
Die komplexen Cytofectine der Alkylamin/amid-Untergruppe wurden entsprechend ihren verschiedenenartigen Strukturen auf mehrere Arten hergestellt. DOGS **9** wird über eine konvergente mehrstufige Synthese erhalten, die in der Kupp-

lung von L-5-Carboxytetrabutoxycarbonylpermin **30** mit Glycyldioktadecylamid **31** (Schema 3) gipfelt.^[22] Das Cytofectin 14 Dea 2 **10** und seine Homologe wurden durch N-Acylierung und Aminsubstitution hergestellt (Schema 4),^[24] Di-C14-amidin **11** und seine Homologe über die Aminolyse von Ethyl-N-*tert*-butylacrylimidat **32** (Schema 5).^[26] Die Synthese von DDAB **12** verläuft über die Dialkylierung von

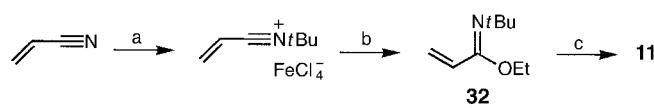


Schema 3. Reagentien und Bedingungen: a) DMF, CH_2CHCN ; b) EtOH, Raney-Ni, H_2 ; c) THF, Boc-ON; d) CH_2Cl_2 , ZGlypNP, Et_3N (1.1 Äquiv., 5 h); e) CH_2Cl_2 /EtOH, 10proz. Pd/C, H_2 , 1 h, 87%; f) 1. CH_2Cl_2 , **30**, DCC (1.1 Äquiv.), 12 h, 90%; 2. TFA, 10 min; g) 1. THF, Z-Glycin, NHSu (1 Äquiv.), DCC (1.1 Äquiv.), RT, 16 h; 2. CH_2Cl_2 , Et_3N (1.4 Äquiv.), RT, 5 h, 18%; h) CH_2Cl_2 /EtOH, 10proz. Pd/C, H_2 , 8 h, 94%; i) 1. CH_2Cl_2 , L-Boc-Arg(Boc)-OH, DIC (1.1 Äquiv.), RT, 16 h, 37.5%; 2. Dioxan, 4 M HCl, RT, 2.5 h; j) 1. CH_2Cl_2 /THF, NHSu (1.1 Äquiv.), DCC (1.1 Äquiv.), 12 h; 2. CHCl_3 /EtOH, Et_3N , 40 °C, 12 h, 55%; 3. CH_2Cl_2 , TFA; k) 1. CHCl_3 /EtOH (1:1), Et_3N (0.1 Mol-%), 50 °C, 12 h; 2. CHCl_3 , TFA, 3 h. Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, Boc-ON = 2-(*tert*-Butoxycarbonyloximino)-2-phenylacetanilid, Z = Benzoyloxycarbonyl, pNP = *para*-Nitrophenyl, DCC = Dicyclohexylcarbodiimid, TFA = Trifluoressigsäure, NHSu = N-Hydroxysuccinimid, DIC = Diisopropylcarbodiimid.

Dimethylamin,^[27] und GS 2888 **13** wurde auf ähnliche Weise wie DOGS **9** hergestellt.^[28]

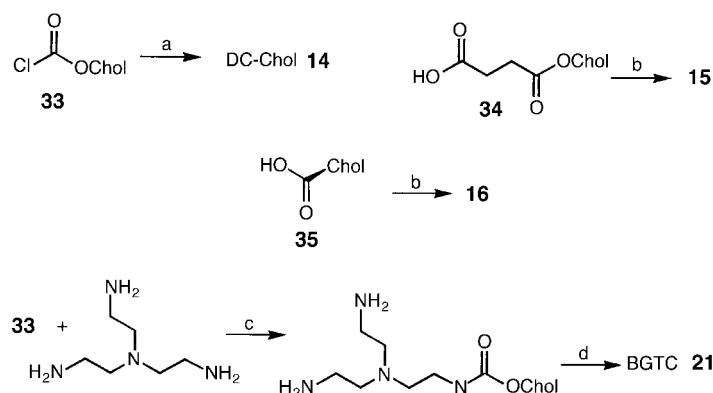


Schema 4. Reagentien und Bedingungen: a) CHCl_3 , DCC (1.1 Äquiv.), $\text{ClCH}_2\text{CO}_2\text{H}$; b) Me_3N ; c) 1. CH_2Cl_2 , DCC (1.1 Äquiv.); 2. Me_3N .



Schema 5. Reagentien und Bedingungen: a) CH_2Cl_2 , FeCl_3 , 0 °C, 15 min, dann $t\text{BuCl}$, 30 min; b) EtOH ; c) $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{NH}_2$ (2 Äquiv.).

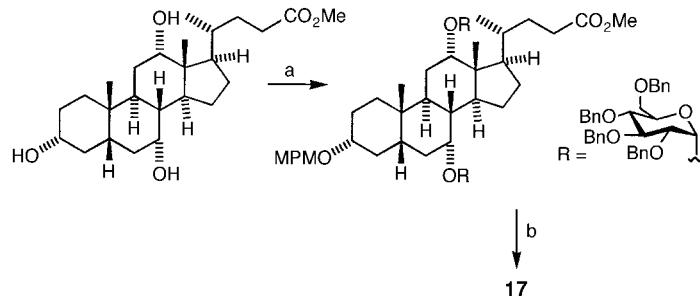
Eine einzige Aminolysereaktion reicht aus, um DC-Chol **14** aus Cholesterylchloroformiat **33**^[29] sowie **15** und **16** aus Cholesterylhemisuccinat **34** bzw. Cholestan-3 β -carbonsäure **35** herzustellen (Schema 6).^[30] Die Aminolyse von **33**



Schema 6. Reagentien und Bedingungen: a) CHCl_3 , $\text{Me}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ (3.6 Äquiv.), 0 °C, 22%; b) CH_2Cl_2 , $\text{Me}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$, CDI; c) CH_2Cl_2 , TREN; d) THF/MeOH, 1H-Pyrazol-1-carboxamidin (2 Äquiv.), $i\text{Pr}_2\text{NH}$ (2 Äquiv., RT, 18 h, 60%). CDI = Carboonyldiimidazol, Chol = 3-Cholesteryl, TREN = Tris(2-aminoethyl)amin.

mit nachfolgender Guanidinylierung des Produkts genügte, um auch BGTC **21** zu synthetisieren.^[36] Überraschenderweise haben Synthetiker oft eine ähnliche einstufige Aminolyse verwendet, um Cholesterylpolyaminderivate herzustellen,

wobei eine Mischung aus Polyamin-Regioisomeren anstelle der reinen Komponenten erhalten wurde.^[34] Zum Beispiel wurde das Cholsäurehexaamin **17** in mehreren Schritten aus Cholsäure hergestellt, aber die Addition des Hexaamins ging ebenfalls mit einer unkontrollierten Aminolyse einher, so daß **17** als Mischung der Polyamin-Regioisomere erhalten wurde (Schema 7).^[31] Im Unterschied dazu wurde das Polyamin



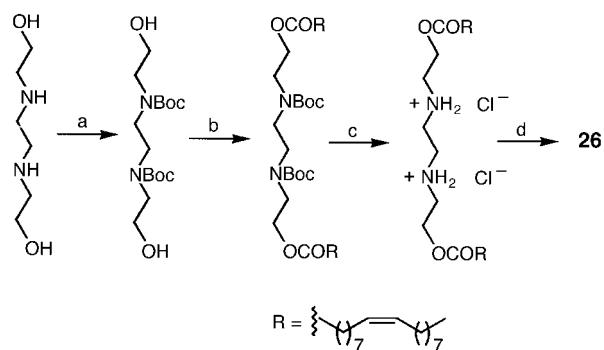
Schema 7. Reagentien und Bedingungen: a) 1. THF, NaH, MPMCl; 2. PhMe, Tf_2O (4 Äquiv.), 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylpyridin, -78°C , dann RS(O)Ph (4 Äquiv.), 30 min, $\rightarrow\text{RT}$; b) 1. $\text{NaOH}/\text{EtOH}/\text{THF}$, 2–48 h, Rückfluß; 2. CH_2Cl_2 , NHSu , DCC, 3 h; 3. $\text{H}_2\text{O}/\text{Et}_3\text{N}$, Hexaamin, 48 h; 4. EtOH , $\text{Pd(OH)}_2/\text{C}$, H_2 . MPM = *p*-Methoxybenzyl, Tf_2O = Trifluormethylsulfonsäureanhydrid.

CTAP **19** mit hoher Ausbeute in einem mehrstufigen Verfahren erhalten, das entwickelt wurde, um die Bildung von Regioisomeren zu vermeiden.^[33] Der eingeschlagene Syntheseweg erwies sich als flexibel genug, um die Synthese einer Reihe von Triamin-, Tetraamin- und Pentaaminvarianten von Cholesterin-Cytofectinen zu ermöglichen. Die Synthesewege zu Lipid **67** **18** und Cholesterylsperrmidin **20** wurden bis jetzt noch nicht veröffentlicht.

Von den übrigen Untergruppen der Cytofectine wurden die beiden wichtigsten Dipalmitoylphosphatidylethanolaminide, DPPES **22** und Lys-Pam₂-GroPEt **23**, in analoger Weise durch N-Acylierung des Ausgangslipids **36** mit **30**, aktiviert durch *N*-Hydroxysuccinimid, oder entsprechend mit Boc-Lys(Boc)-OSu **37** (Schema 3)^[22, 37] synthetisiert. N-Acylierung mit anschließender Aminsubstitution war hinreichend für die Synthesen der beiden wichtigsten Glutamatdiesterivate $2\text{C}_{12}\text{-L-Glu-ph-C}_2\text{-N}^+\text{Br}^-$ **24** und $2\text{C}_{14}\text{-L-Glu-C}_2\text{-N}^+\text{Cl}^-$ **25** aus Glutamatestern (Schema 4).^[24] Schließlich wurden das Imidazolderivat DOTIM **26** und seine Homologe in einem vierstufigen Verfahren hergestellt, dessen letzter Schritt eine neuartige Cyclisierung zum Imidazoliniumring ist (Schema 8).^[40]

3.3. Methoden für die Formulierung kationischer Liposomen

Zur Formulierung von kationischen Liposomen aus Cytofectinen – mit neutralem oder ohne neutrales Colipid – wurden unterschiedliche Methoden eingesetzt. Dazu gehören Ultraschallbehandlung und/oder das gründliche Durchmischen einer wäßrigen Lösung, Umkehrphasenverdampfung und die Verdünnung einer Ethanol-Stammlösung mit Wasser. Sicherlich ist die Formulierungsmethode wichtig, doch muß



Schema 8. Reagentien und Bedingungen: a) CHCl_3 , Boc_2O (2.1 Äquiv.), NaHCO_3 , 5 h, 80%; b) CH_2Cl_2 , Oleoylchlorid (2.1 Äquiv.), Et_3N (2.4 Äquiv.), 45 min, 94%; c) Dioxan , HCl , 2 h, 95%; d) EtOH , H_2 , 110°C , 10 min, 75%.

das Ausmaß noch ermittelt werden, in dem die Effizienz des Nucleinsäuretransfers dadurch beeinflußt wird.

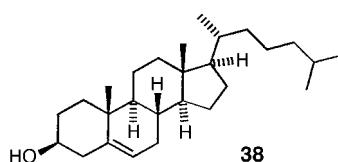
DOTMA **1** und seine wichtigsten Analoga (**4–8**) werden üblicherweise mit dem neutralen Colipid DOPE **2** zu kationischen Liposomen verarbeitet. Dazu werden die Liposomen aus äquimolaren Mengen an Cytofectin und DOPE **2** unter gründlichem Durchmischen bei Raumtemperatur behandelt, um zunächst große multilamellare Vesikel (MLVs) zu produzieren, aus denen dann bei 10°C durch Ultraschallbehandlung kleine unilamellare Vesikel (SUVs) für die Gentransfektion erhalten werden.^[18, 20, 21] Kationische DOSPA-Liposomen sind als LipofectAMINE (GIBCO/BRL) kommerziell erhältlich und enthalten DOSPA **5** sowie DOPE **2** im Verhältnis 3:1. Auch kationische Liposomen mit DOTAP **3** ohne neutrales Colipid sind inzwischen kommerziell erhältlich (Boehringer Mannheim), zuvor wurden sie üblicherweise ebenfalls mit DOPE **2** hergestellt. In diesem Fall wurden DOPE/DOTAP-Liposomen entweder über Ultraschall^[17] oder über Umkehrphasenverdampfung hergestellt.^[17, 42]

Kationische Liposomen aus dem kationischen Amphiphil DOGS **9** können unter dem Namen Transfectam (Promega) erworben werden. Solche Liposomen können einfach durch zehnfache Verdünnung einer wäßrigen Ethanol-Stammlösung von **9** in einen wäßrigen Puffer erhalten werden.^[22] Im Unterschied dazu werden DDAB **12** enthaltende kationische Liposomen gewöhnlich mit DOPE **2** formuliert; das im Handel befindliche Produkt LipofectAce (GIBCO/BRL) ist eine Formulierung aus DDAB **12** mit DOPE **2** im Verhältnis 1:2.5. Di-C14-amidin-Liposomen sind jetzt als Clonfectin (Clontech) erhältlich. Sie werden hauptsächlich durch Verdünnung einer ethanolischen Stammlösung in einen neutralen Puffer formuliert,^[25] analog zur Formulierungsmethode für DOGS-Liposomen.^[22] Es wurde allerdings auch eine zweite Methode verwendet, bei der **11** und DOPE **2** im Molverhältnis 1:1 verwendet wurden; durch gründliches Mischen und Ultraschallbehandlung wurden dann die Liposomen hergestellt.^[25] Diese zweite Methode wurde ebenfalls verwendet, um Liposomen aus GS 2888 **13** und DOPE **2** herzustellen, wenngleich die beste Methode im gründlichen Durchmischen und Einfrieren/Auftauen einer Mischung aus **13** und **2** im Molverhältnis 2:1 besteht.^[28] Schließlich ist die Ultraschallbehandlung einer 10 mm Suspension des Cytofectins 14 Dea 2

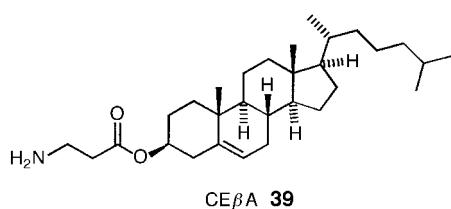
10 oder seiner Homologe in Wasser offenbar ausreichend, um aktive Liposomen zu bilden.^[23]

Cholesterinderivate werden normalerweise mit DOPE **2** zu Liposomen formuliert, allerdings mit einer Reihe anderer Methoden. Zum Beispiel wird DC-Chol **14** in der Regel mit DOPE **2** im Molverhältnis 6:4 kombiniert, die Liposomen werden dann entweder durch Ultraschallbehandlung allein,^[29] durch gründliches Durchmischen und anschließende Ultraschallbehandlung^[43] oder durch Umkehrphasenverdampfung und anschließende Ultraschallbehandlung erhalten.^[44] Liposomen mit den Cytofectinen **15** und **16** wurden ebenfalls mit DOPE **2** im Molverhältnis 1:1 durch Ultraschallbehandlung oder durch gründliches Durchmischen mit nachfolgender Ultraschallbehandlung formuliert.^[29, 43] Das Cholsäurehexaamin **17** und ähnliche Amphiphile werden mit DOPE **2** im Verhältnis 1:1 kombiniert und die Liposomen durch Ultraschall erzeugt.^[31] Die Polyamine Lipid 67 **18** und CTAP **19** wurden bis jetzt ausschließlich durch gründliches Durchmischen mit DOPE **2** im Molverhältnis 1:2 in Liposomen überführt.^[33] Was die übrigen Cholesterinpolyamin-Cytofectine anbelangt, so wurden aus BGTC **21** und DOPE **2** im Molverhältnis 3:2 durch gründliches Durchmischen und anschließende Ultraschallbehandlung Liposomen erhalten,^[36] während Cholesterylsperrmidin **20**, jetzt als Transfectall (Apollon Inc.) im Handel, anscheinend ohne Colipid formuliert wird.^[35]

Die restlichen Untergruppen von Cytofectinen werden oft entweder ohne Colipid oder mit anderen neutralen Colipiden als DOPE **2** formuliert. So werden Liposomen von DPPES **22** ohne Colipid erhalten, ebenso wie von DOGS **9**,^[22] während solche aus Lys-Pam₂-GroPEtn **23** durch Ultraschallbehandlung einer Mischung aus **23** mit Cholesterin **38** und Ei-



Phosphatidylcholin im Verhältnis 1.5:3.0:5.5 entstehen.^[37] L-PE **23a** bildet in Kombination mit einem zweiten kationischen Amphiphil, nämlich dem Cholesterinester von β -Alanin (CE β A, **39**; Molverhältnis 6:4), Liposomen.^[38] Hin-



gegen werden Liposomen aus DOTIM **26** und dessen Homologen durch Ultraschallbehandlung einer Mischung des Cytofectins entweder mit Cholesterin **38** oder mit DOPE **2** im Molverhältnis 1:1 erhalten.^[40] Schließlich bilden sich die beiden wichtigsten Glutamatdiesterderivate, 2C₁₂-L-Glu-ph-

C₂-N⁺Br⁻ **24** und 2C₁₄-L-Glu-C₂-N⁺Cl⁻ **25** von selbst durch einfache Ultraschallbehandlung einer Suspension in neutralem Puffer.^[39]

4. Mechanismen des Nucleinsäuretransports

Der Mechanismus des durch kationische Liposomen vermittelten Nucleinsäuretransports ist kompliziert. Zur Darstellung des heutigen Wissensstandes wird dieser Prozeß daher hier in drei getrennten Stufen diskutiert. Zunächst werden die Strukturen der Komplexe von kationischen Liposomen mit Nucleinsäuren besprochen. Heterogene Komplexe bilden sich schnell nach der Vereinigung von Nucleinsäuren mit Suspensionen kationischer Liposomen. Diese Komplexe dringen in die Zellen ein. Die Abgabe von Nucleinsäuren scheint am effizientesten zu sein, wenn die Komplexe bei einem Verhältnis der positiven Ladungen der Liposomen zu den negativen Ladungen der Nucleinsäuren von >1 gebildet werden. Zur Abgabe von Genen *in vitro* ist das optimale Ladungsverhältnis oft >1 (d.h., solche Komplexe sind kationisch),^[22] während das optimale Verhältnis für die effiziente Genfreisetzung *in vivo* näher bei 1 zu liegen scheint.^[45] Deshalb werden wir unsere Aufmerksamkeit im folgenden Abschnitt den besonderen Eigenschaften der Komplexe aus kationischen Liposomen und Nucleinsäuren mit einem Ladungsverhältnis von 1 oder höher widmen.

Zweitens sollen die Mechanismen des Einschleusens der Liposom-Nucleinsäure-Komplexe in die Zelle besprochen werden. Der vorherrschende Mechanismus scheint Endozytose zu sein, unabhängig vom Typ des eingesetzten kationischen Liposoms. Die eindeutigsten Hinweise für diesen Mechanismus werden zusammen mit weiteren möglichen Einschleusungsmechanismen diskutiert. Schließlich wird das weitere Schicksal der Nucleinsäuren in der Zelle beschrieben, wobei der Schwerpunkt darauf liegt, wie die Nucleinsäuren in den Zellkern gelangen sollen – also dorthin, wo ihre therapeutischen Eigenschaften in den meisten Fällen genutzt werden sollen.

4.1. Strukturen der Komplexe von kationischen Liposomen mit DNA

Die ursprüngliche Schilderung von Felgner und Ringold beschreibt die elektrostatische Bindung von DNA an kationische Liposomen ohne Änderung ihrer Größe und Form.^[46] Experimentelle Befunde weisen darauf hin, daß Komplexe von kationischen Liposomen mit DNA durchaus sehr heterogene und dynamische Strukturen sind, deren Größe und Form in Abhängigkeit vom Molverhältnis von kationischen Liposomen zu DNA variiert. Die drastischsten strukturellen Änderungen finden bei ladungsneutralen Komplexen statt, wenn also das Positiv-zu-negativ-Ladungsverhältnis bei 1 liegt.

Die ersten Schlüsselexperimente wurden von Gershon et al. durchgeführt.^[47] Mit Ethidiumbromid als Fluoreszenzsonde für freiliegende DNA-Basenpaare titrierten sie DNA-Lösungen bestimmter Konzentrationen mit DOTMA- oder

DOPE/DOTMA-Liposomen (1:1) und beobachteten die auftretenden Effekte. Sie stellten fest, daß die DNA generell zugänglich war, bis sich das Verhältnis von positiven zu negativen Ladungen dem Wert 1 näherte. An diesem Punkt trat eine umfangreiche Maskierung von DNA ein, was sich in einem schnellen Abfall der Fluoreszenzintensität bemerkbar machte (Abb. 1 a). Drastische Änderungen bei einem 1:1-

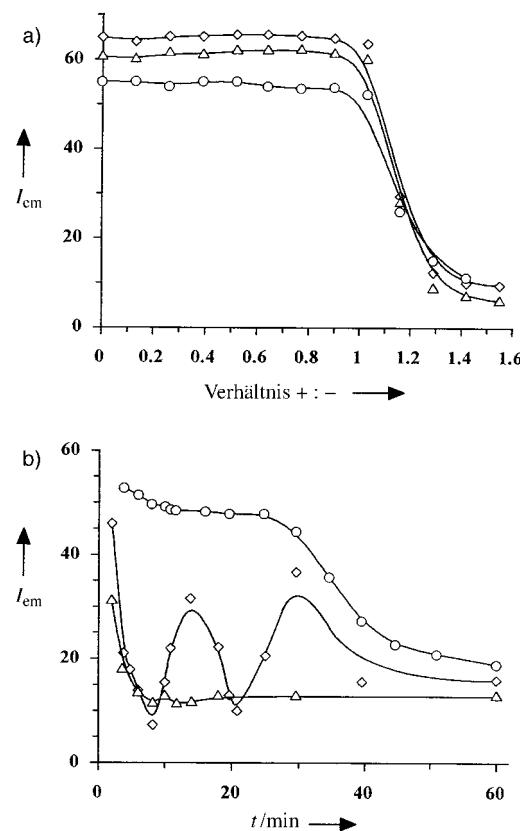


Abb. 1. Einfluß der DNA-Länge und des Verhältnisses von Liposom zu DNA (beschrieben durch das Positiv-zu-negativ-Ladungsverhältnis) auf die Fluoreszenzintensität von Ethidiumbromid. a) Eine Fixkonzentration von DNA (Nucleotidkonzentration) wurde mit DOPE/DOTMA-Liposomen (im Molverhältnis 1:1) in Gegenwart von Ethidiumbromid titriert. Die ansteigende Liposomenkonzentration spiegelt sich in dem steigenden Liposom-zu-DNA-Verhältnis, dem Positiv-zu-negativ-Ladungsverhältnis (+:−), wider. Die Fluoreszenzemissionsintensität von Ethidiumbromid (I_{em}) ist in willkürlichen Einheiten wiedergegeben. Die Längen der DNA-Segmente betragen 100–300 (○), 500–8000 (△) und 23 000 (◇) Basenpaare. b) Es wurden drei verschiedene Konzentrationen von DOPE/DOTMA-Liposomen (Molverhältnis 1:1) in Gegenwart von Ethidiumbromid mit DNA kombiniert und die Änderung der Fluoreszenzintensität mit der Zeit registriert. Die Liposom-zu-DNA-Ladungsverhältnisse (+:−) betragen 1.0 (○), 1.1 (◇) und 1.2 (△). Die DNA-Konzentration wurde durchweg auf 25 μM (Nucleotidkonzentration) normalisiert; Ethidiumbromid (Molverhältnis Fluoreszenzmarker:Nucleotid = 1:50) wurde unmittelbar vor der Messung hinzugegeben. (Die Abbildung wurde mit der Erlaubnis der Autoren^[47] übernommen.)

Ladungsverhältnis wurden auch von Struck et al.^[48] unter Verwendung der Resonanzenergietransfer(RET)-Methode in Lipid-Mischungsexperimenten festgestellt. Bei dieser Methode werden Liposomen, die mit zwei komplementären Fluoreszenzfarbstoffen markierte Lipide enthalten, mit unmarkierten Liposomen gemischt. Beim Vorgang der Vermischung und Fusion der Lipide kommt es zu einer Verteilung der

markierten Lipide innerhalb der zuvor unmarkierten Liposomen, was zur Abnahme der Fluoreszenzlösung zwischen den komplementär markierten Lipiden und zur Zunahme der Fluoreszenzintensität führt.

Die Untersuchungen mit der RET-Methode ergaben, daß die Vermischung/Fusion im allgemeinen durch DNA gefördert wird, was auch bei anderen polyvalenten Anionen der Fall ist,^[49–52] sich das Verhalten aber bei einem Ladungsverhältnis von 1 signifikant ändert (Abb. 2 a). Als Deutung dieser

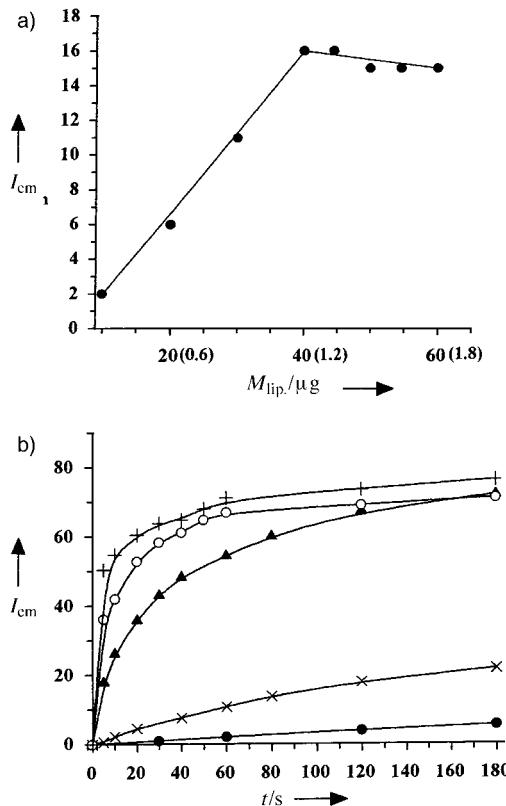


Abb. 2. Durch DNA induzierte Lipidmischung von markierten und unmarkierten Liposomen. a) DOPE/DOTMA-Liposomen (Molverhältnis 1:1) wurden in Gegenwart von DNA (25 μM Nucleotidkonzentration) mit fluoreszenzmarkierten DOPE/DOTMA-Liposomen kombiniert und der Anstieg der Fluoreszenzintensität (I_{em} in willkürlichen Einheiten) aufgrund von Lipidmischung mit steigender Lipidkonzentration (ausgedrückt durch die Masse M_{lip} , der zur DNA gegebenen Liposomen) registriert. Der durch DNA hervorgerufene Anstieg der Fluoreszenz wurde durch die Subtraktion der Fluoreszenz der freien markierten Liposomen von der der Liposomen bestimmt, die in Gegenwart von DNA erhalten wurden. Die geschätzten Positiv-zu-negativ-Ladungsverhältnisse sind in Klammern angegeben. (Die Abbildung wurde mit der Erlaubnis der Autoren^[47] übernommen.) b) Liposomen mit 16 μM und 4 μM DOTAP 3 wurden in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen an DNA (Nucleotidkonzentration) mit fluoreszenzmarkierten DOTAP-Liposomen kombiniert und der durch Lipidmischung verursachte Anstieg der Fluoreszenzintensität registriert. Verschiedene DNA-Konzentrationen spiegeln sich im Negativ-zu-positiv-Ladungsverhältnis (−:+) in den Mischungen nach Zugabe der Oligonucleotide betragen 0 (d.h. keine DNA vorhanden; ●), 0.03 (×), 0.2 (▲), 0.8 (○) und 1.2 (+). (Die Abbildung wurde mit der Erlaubnis der Autoren^[52] übernommen.)

abrupten Verhaltensänderungen schlugen Gershon et al. vor, daß die kationischen Liposomen die negative Ladung der DNA hinreichend stark neutralisieren, um analog zu vor-

angegangenen Untersuchungen^[53, 54] einen kooperativen Kollaps der DNA-Struktur hervorzurufen.^[47] Weiterhin schlugen sie vor, daß die kollabierte DNA, deren freiliegende Oberfläche nun sehr viel kleiner als zuvor ist, wirksam vom Lipid eingekapselt werden kann. Diese Deutung wurde durch die Kleinschmidt-Methode der elektronenmikroskopischen Darstellung von Nucleinsäuren durch Metallbedämpfung bestätigt. Bei diesen Experimenten erschienen die Liposomen bei niedrigen Liposom-zu-DNA-Verhältnissen als lokalisierte, DNA-gebundene, sphärische Cluster und oberhalb des kritischen Ladungsverhältnisses als sehr viel größere (ca. 700 nm) stabförmige Strukturen (Abb. 3). Dies wurde mit der Einkapselung mehrerer kondensierter DNA-Moleküle erklärt.

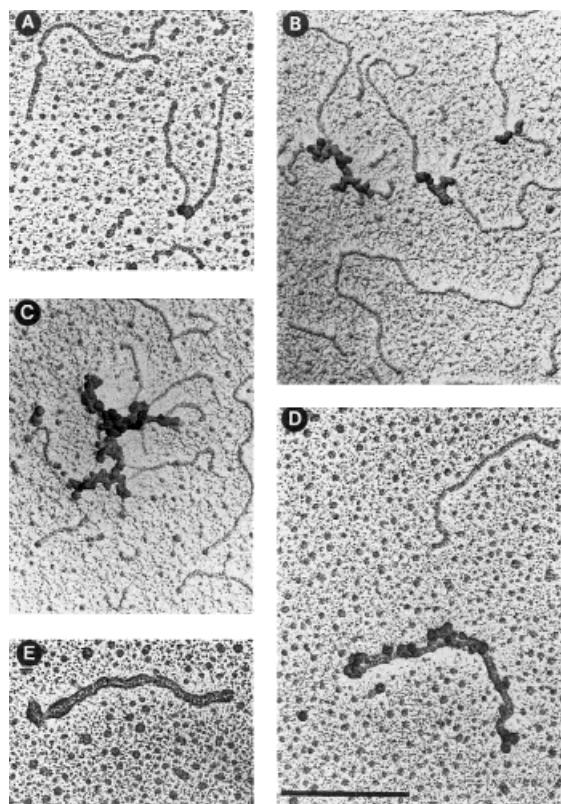


Abb. 3. Kleinschmidt-Elektronenmikroskopieaufnahme eines Liposom-DNA-Komplexes. Die Komplexe wurden mit schrittweise erhöhten Mengen an DOPE/DOTMA-Liposomen und einer konstanten Menge an DNA präpariert ($3.5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Die Liposom-zu-DNA(positiv-zu-negativ)-Verhältnisse betrugen 0.2 (A), 0.4 (B), 0.6 (C), 1.0 (D) und 1.5 (E). Der Maßstabsbalken entspricht 0.5 µm. (Die Abbildung wurde mit der Erlaubnis der Autoren^[47] übernommen.)

Diese Beobachtungen und ihre beiden vorherrschenden Deutungen wurden mittlerweile durch die Resultate anderer Forschungsgruppen bestätigt. Vor allem haben Gustafsson et al. kryotransmissionselektronenmikroskopische Abbildungen von DNA erhalten, die mit DOTAP- und DOPE/DDAB-Liposomen komplexiert worden waren. Die Bilder zeigten das Vorhandensein von „freier“ oder nur schwach gebundener DNA bei einem Positiv-zu-negativ-Ladungsverhältnis < 1 und große ($> 100 \text{ nm}$) Lipid-DNA-Strukturen bei Liposom-zu-DNA-Molverhältnissen oberhalb des neutralen Ladungsverhältnisses.^[55] Sie deuteten diese großen Strukturen als cha-

rakteristisch für multilamellare Lipidstrukturen, in denen die DNA vollständig eingeschlossen sein soll.

Der Einschluß von DNA wird auch dadurch bestätigt, daß kationische Liposomen die DNA vor dem Abbau durch Nukleasen, Zerschneidung bei Aerosolbildung und vor Schaden bei Ultraschallbehandlung schützen können.^[56, 57] Erst kürzlich wurde die genaue Art dieser Einschlüsse aufgedeckt durch Röntgenbeugungsdaten von Rädler et al. bei Untersuchungen von Liposomen aus DOPE 2 und DOTAP 3 im Verhältnis 1:1, die mit λ -Phagen-DNA komplexiert waren.^[58] Die Autoren stellten fest, daß die DNA sandwichartig zwischen kationischen Doppelmembranschichten in hochgeordneten multilammelaren Strukturen eingebettet war. Es stellte sich heraus, daß die DNA selbst in hochgeordneten eindimensionalen Monoschicht-Anordnungen gleichmäßige Gitter bildete (Abb. 4). Die Bildung dieser Anordnungen

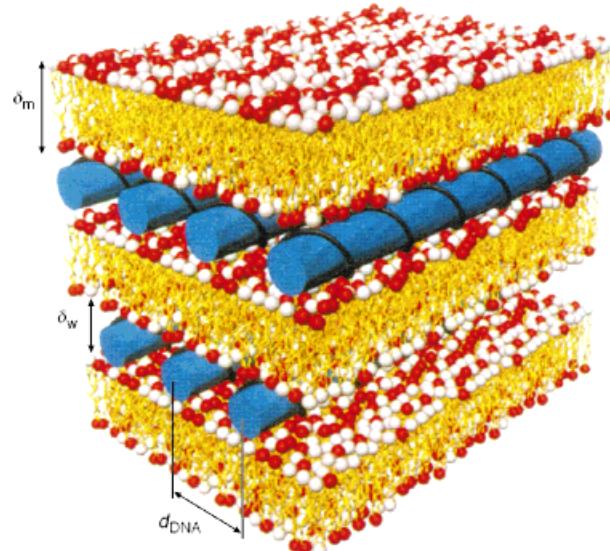


Abb. 4. Schematische Darstellung der vorgeschlagenen lokalen Anordnung von Komplexen kationischer Liposomen mit DNA. Die DNA-Moleküle sind als Stäbe (blau) dargestellt, die Kopfgruppen der anionischen/zwitterionischen Lipide als weiße Kugeln, die der Cytofektine als rote Kugeln. Nahe der DNA treten die Cytofektine in höherer Konzentration auf. δ_m bezieht sich auf die Dicke der Doppelschicht, δ_w auf den Abstand zwischen zwei Doppelschichten und d_{DNA} auf den interaxialen Abstand der DNA. Es wurde eine Zunahme von d_{DNA} von ca. 25 auf 60 Å festgestellt, wenn das Positiv-zu-negativ-Ladungsverhältnis von < 1 auf > 1 erhöht wurde (Die Abbildung wurde mit der Erlaubnis der Autoren^[58] übernommen.)

deutete man als Folge der ursprünglichen Kondensation der DNA auf der Oberfläche der kationischen Liposomen. Dabei wurde die elektrostatische Abstoßung zwischen Lipid-Doppelschichten abgeschirmt, was die Bildung von Multischichten durch die Freisetzung von DNA-assozierten Gegenionen ermöglichte.

Wahrscheinlich ist dies aber noch nicht die ganze Wahrheit. Ursprünglich hatte Behr gezeigt, daß DNA die Oberfläche von kationischen Liposomen überziehen oder einwickeln kann.^[59] Diese Beobachtung wird durch Eastman et al. unterstützt, denen zufolge die Bindung von DNA an die Oberfläche kationischer Liposomen an sich schon die Bildung

großer Komplexe auslösen kann.^[60] Daher ist es wohl am wahrscheinlichsten und verständlichsten, daß die Wechselwirkung zwischen kationischen Liposomen und DNA aus einer Kombination sowohl von totaler Einbettung als auch von Oberflächenassoziation besteht.

Die Variation der Größe der Komplexe von kationischen Liposomen mit DNA bei Änderung des molaren Verhältnisses von kationischen Liposomen zu DNA wurde von einer Reihe von Forschungsgruppen untersucht. Zum Beispiel ergaben quasielastische Lichtstreuungsmessungen an DOTAP- oder DOPE/DDAB-Liposomen in Kombination mit DNA, daß sich bei niedrigen Liposom-zu-DNA-Verhältnissen nur kleine Partikel (ca. 40 nm) bilden.^[52] Die durchschnittliche Größe schien drastisch anzusteigen, wenn sich das Positiv-zu-negativ-Ladungsverhältnis dem Wert 1 näherte (ca. 3000 nm), danach jedoch bei einem weiteren Anstieg des Verhältnisses wieder allmählich abzunehmen (Abb. 5). Dasselbe Phänomen stellten Rädler et al. fest mit einer Kombination aus dynamischen Lichtstreuungsmessungen und Differenz-Interferenzmikroskopie.^[58] Wenngleich sich mit großer Gewißheit große multilammelare Partikel (>100 nm) mit eingebetteter DNA um und über dem neutralen Ladungsverhältnis bilden, stehen diese Partikel wahrscheinlich im dynamischen Gleichgewicht mit vielen anderen kleineren komplexen Spezies und sogar mit freier DNA. Zabner et al. erbrachten hierfür Beweise in Studien mit DOPE/DMRIE-Liposomen, die mit DNA komplexiert wurden.^[61] Ihre Elektronenphotomikrographien (Abb. 6) ließen nicht nur die typischen großen und dichten DNA-Lipid-Strukturen (>100 nm) mit verschlungenen DNA-Ausläufern erkennen, sondern auch kleinere Cluster und freie DNA. Sie entdeckten auch Strukturen,

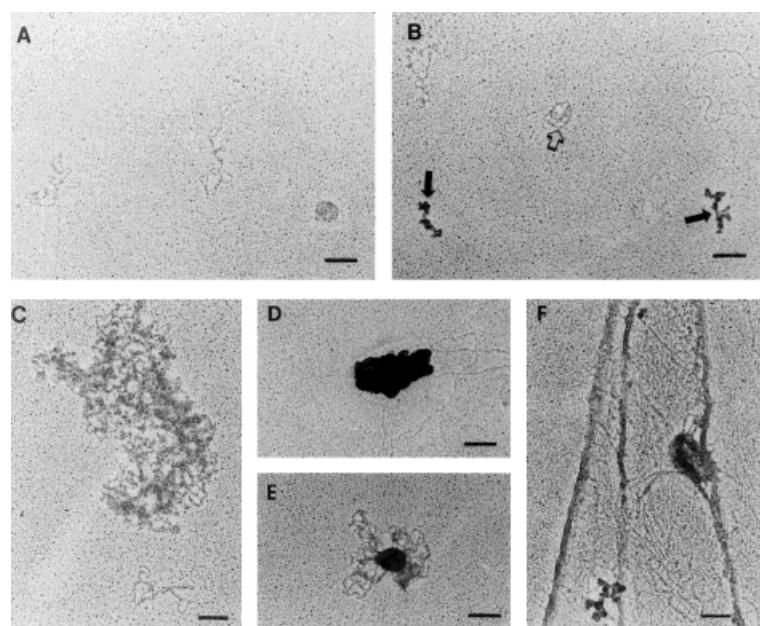


Abb. 6. Transmissionselektronenphotomikrographie von Liposom-DNA-Komplexen. Die Komplexe wurden bei einem Liposom-zu-DNA-Verhältnis von 5:1 unter Verwendung von DOPE/DMRIE- Liposomen (Molverhältnis 1:1) hergestellt. A) DNA ohne Lipid, B) –F) Beispiele von verschiedenen Komplextypen. In (B) zeigt der offene Pfeil unkomplexierte Plasmide, die geschlossenen Pfeile mit Lipid komplexierte Plasmide. Der Strich entspricht einer Länge von 100 nm. (Die Abbildung wurde mit der Erlaubnis der Autoren^[61] übernommen.)

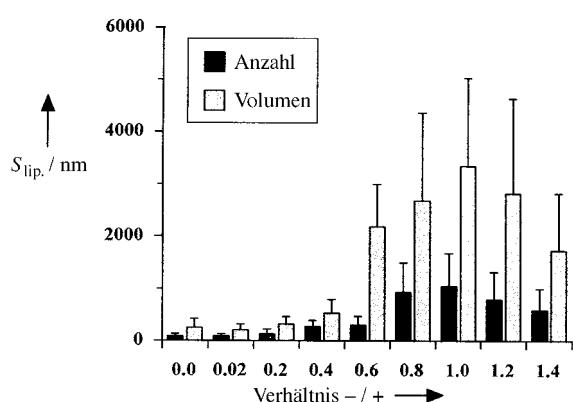


Abb. 5. Bestimmung der Partikelgröße von Liposom-DNA-Komplexen durch quasielastische Lichtstreuungsexperimente. Die Komplexe wurden durch Inkubation von ansteigenden Mengen eines 15mer-S-Oligonukleotids mit kationischen Liposomen aus 10 µM DOTAP 3 hergestellt, anschließend wurde die durchschnittliche Partikelgröße gemessen. Der Anstieg der DNA-Konzentration spiegelte sich in dem steigenden Negativ-zu-positiv-Ladungsverhältnis (–/+). Die Größenverteilung ($S_{\text{lip.}}$) wurde als das Mittel \pm Standardabweichung des Durchmessers auf der Basis der Vesikelgröße und -anzahl bestimmt. (Die Abbildung wurde mit der Erlaubnis der Autoren^[52] übernommen.)

die vermutlich dünn mit Lipid bedeckte DNA-Stränge sind, analog zu den bereits zuvor beschriebenen „Spaghetti-Strukturen“ bei elektronenmikroskopischen Gefrierbruchaufnahmen von DNA, die mit DOPE/DC-Chol-Liposomen komplexiert waren.^[62]

Die Kinetik der Bildung von Komplexen aus Liposomen mit Nucleinsäuren wurde auf zwei Ebenen untersucht. Gershon et al. fanden bei Untersuchungen an freiliegenden DNA-Basenpaaren, die mit Ethidiumbromid fluoreszenzmarkiert waren, daß die DNA-Einkapselung durch DOPE/DOTMA-Liposomen fast unmittelbar eintrat, sobald Liposomen und DNA bei solchen Konzentrationen vermischt wurden, bei denen das Positiv-zu-negativ-Ladungsverhältnis signifikant 1 überschritt (>1.2).^[47] Bei einem Positiv-zu-negativ-Verhältnis von 1.0 bis 1.1 wurde aber ein komplexeres Verhalten festgestellt, und es waren mindestens 60 min bis zum Einstellen eines Gleichgewichts nötig (Abb. 1b). Das beobachtete oszillierende Verhalten ist sicherlich ein Indiz für ein hochdynamisches System, wenngleich das etwas schwer zu begründen ist. Bei einem Verhältnis von 1.2 stellte sich das Gleichgewicht schon nach 10 min ein (Abb. 1b). Eine detailliertere kinetische Untersuchung mit RET-Lipid-Mischungsexperimenten^[48] ergab, daß DNA die Aggregation und nachfolgende Fusion von DOTAP- und DOPE/DDAB-Liposomen mit einer Geschwindigkeit einleiten konnte, die einer Gleichgewichtseinstellung innerhalb weniger Minuten entspricht (<5 min; Abb. 2b). Allerdings wurden für das oben erwähnte Positiv-zu-negativ-Ladungsverhältnis von 1.0 und 1.1 keine Ergebnisse mitgeteilt.^[52]

An dieser Stelle ist erwähnenswert, daß die hier beschriebenen Ergebnisse ineinander greifen und allmählich ein

stimmiges Bild ergeben, wie kationische Liposomen und DNA wechselwirken, obwohl diese Studien von verschiedenen Forschungsgruppen unter Verwendung einer Vielfalt verschiedener DNA-Längen, Lipide, Liposomen-Formulierungsverfahren, Puffer etc. durchgeführt wurden. Offensichtlich ist das von Felgner und Ringold^[46] entworfene Bild nicht haltbar, da Komplexe von kationischen Liposomen mit DNA in ausgeprägt heterogener Form auftreten, wobei fast alle möglichen Formen der Struktur – von nackter DNA bis hin zu in hochgeordneten multilammelaren Anordnungen eingebetteter DNA – mit großer Gewißheit 30–60 min nach der Vermischung von DNA und kationischen Liposomen im Gleichgewicht stehen. Berücksichtigt man, daß die durch kationische Liposomen vermittelte Abgabe von DNA am effizientesten zu funktionieren scheint, wenn das Verhältnis kationischer Liposomen zu DNA auf Positiv-zu-negativ-Ladungsverhältnisse um 1 oder höher eingestellt wurde, so sollte man annehmen, daß große multilamellare Partikel, die in sich eingebettet hochgeordnete DNA enthalten, die wesentlichen Strukturen sind, um die Abgabe von DNA zu vermitteln. Hier sollte man aber bedenken, daß Komplexe von kationischen Liposomen mit DNA hochdynamische Strukturen sind im Gleichgewicht mit kleineren Strukturen, so daß die Annahme nicht notwendigerweise der Wirklichkeit entsprechen muß.

4.2. Das Einschleusen von Komplexen in Zellen

Das Einschleusen von Komplexen in Zellen ist der erste Schritt des Nucleinsäuretransports durch kationische Liposomen. Früher vermutete man, daß das Einschleusen in die Zelle hauptsächlich durch die Verschmelzung der Zellmembran mit den Liposomen erfolgt^[11, 16] unter der Prämisse, daß kationische und anionische Liposomen leicht miteinander verschmelzen.^[51, 63] Es stellte sich aber heraus, daß Komplexe von kationischen Liposomen mit DNA viel schlechter mit negativ geladenen Membranen verschmelzen. Dies deutet darauf hin, daß in diesem Fall das Einschleusen in die Zelle nicht durch Membranfusion geschieht.^[17] Vielmehr lassen andere Beobachtungen jetzt vermuten, daß eine langsame Endozytose von intakten Komplexen, vermittelt durch die Interaktion mit Proteoglykanen,^[67, 68] der wichtigste Prozeß ist.^[64–66] Dies wurde zuerst von Behr et al.^[22, 69] vermutet und danach von Zabner et al. beobachtet, die elektronenmikroskopisch den Zelleintritt (in COS- und HeLa-Zellen) von goldmarkierter DNA, komplexiert mit DOPE/DMRIE-Liposomen (Positiv-zu-negativ-Ladungsverhältnis = 1.2), untersuchten.^[61] Die Komplexe drangen nach anfänglicher Assoziation an die Zelloberfläche durch Endozytose ein und verblieben in einem Vesikel oder Endosom (Abb. 7). Durch confocale Mikroskopie wurde dann das anschließende intrazelluläre Schicksal der in Endosomen eingeschlossenen Komplexe verfolgt. Die Komplexe akkumulierten bis zu 24 h nach dem Eindringen in die Zelle in der Umgebung des Zellkerns. Dies wurde als Folge der Endosomenwanderung in Richtung Zellkern interpretiert, weil die eingeschlossenen Komplexe dabei koaleszieren und makromolekulare Lipid-DNA-Strukturen bilden könnten. Diese makromolekularen

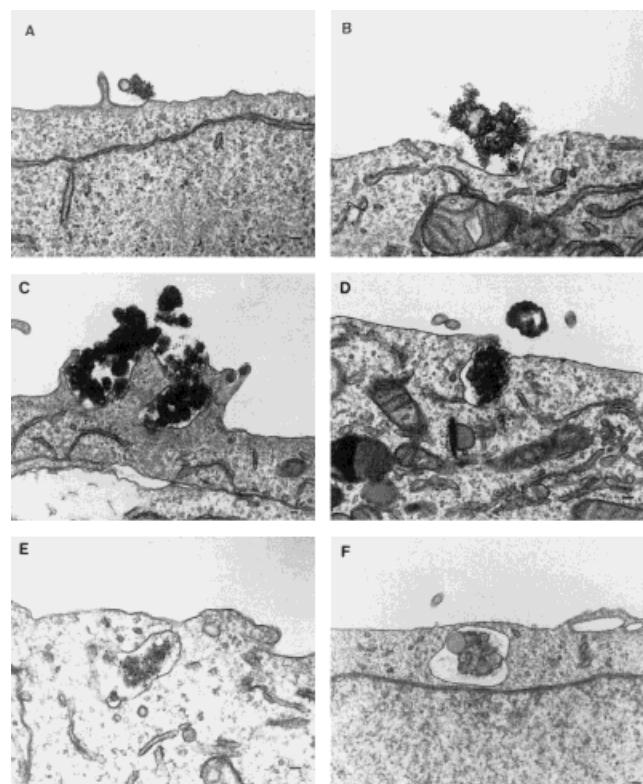


Abb. 7. Transmissionselektronenphotomikrographie von COS-Zellen, die mit goldmarkierter und mit Liposomen komplexierter DNA transfiziert worden sind. Die Zellen wurden Komplexen aus goldmarkierter DNA sowie DOPE **2** und DMRIE **4** ausgesetzt, die mit einem Liposom-zu-DNA-Verhältnis von 5:1 präpariert wurden. Anschließend wurden die Zellen zu den angegebenen Zeiten für die Elektronenmikroskopie entnommen: 5 min (A), 30 min (B), 1 h (C), 6 h (D), 24 h (E). F) Zellen, die mit unmarkierter DNA transfiziert worden waren. Der Strich entspricht 100 nm, die Goldpartikel hatten eine Größe von 10 nm. (Die Abbildung wurde mit der Erlaubnis der Autoren^[61] übernommen.)

Lipid-DNA-Strukturen waren hochorganisiert und bestanden aus einer Anordnung von gleichmäßig gepackten Röhren, in denen die DNA von Doppelschichten oder röhrenförmigen Einzelschichten aus Lipiden umgeben war. Es gab keinen Beleg für das Verschmelzen von Lysosomen mit Endosomen, obwohl davon an anderer Stelle berichtet wurde.^[66]

Zabner et al. konnten auch die Kinetik und Effizienz des Zelleintritts von Liposom-DNA-Komplexen untersuchen, indem sie mit fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS) die Aufnahme von Komplexen aus fluoreszenzmarkierter DNA mit DOPE/DMRIE-Liposomen in COS-Zellen beobachteten.^[61] Nur 5 % der Zellen enthielten nach 30 min aufgenommene Komplexe, nach 6 h schien der Prozeß aber – in Übereinstimmung mit anderen Daten über die Aufnahme in Zellen – zu 70 % abgeschlossen zu sein.^[12]

Auch wenn diese Hinweise auf Endozytose und Endosomenlokalisierung deutlich sind, so kann dennoch das Einschleusen in die Zelle zum Teil durch Membranfusion erfolgen. Zum Beispiel haben Felgner et al. beobachtet, daß Komplexe kationischer Liposomen mit DNA mit fluoreszenzmarkiertem DOPE **2** die Zellmembran zu färben schienen.^[16] Es ist allerdings unwahrscheinlich, daß Fusionsprozesse dominieren. Neuere Erkenntnisse sprechen dafür, daß

Phagozytose möglicherweise ebenfalls beim Einschleusen von Komplexen in die Zelle über Endozytose eine Rolle spielt.^[70]

4.3. Der Transport der Nucleinsäuren in den Zellkern

Das Einschleusen von Liposom-Nucleinsäure-Komplexen in die Zelle scheint ein überraschend wirkungsvoller, wenn auch langsamer Prozeß zu sein,^[61, 64] doch bleibt nicht die gesamte in die Zelle gelangende Nucleinsäure wirksam. Dies verdeutlichen Zabner et al. durch ihre Beobachtung, daß nach einer Liposom-vermittelten Genabgabe in COS- oder HeLa-Zellen eine Genexpression in weniger als 50% der Zellen stattfand, obwohl der Endozytoseanteil bei mindestens 80% lag.^[61] In anderen Zelllinien war das Verhältnis zwischen Expressionsgrad und Endozytose noch sehr viel geringer.^[61] Unglücklicherweise scheint sich der größte Teil der in die Zelle eingeschleusten DNA nicht von den endosomalen Partikeln ins Cytoplasma ablösen zu können. Die durch kationische Liposomen vermittelte Abgabe scheint somit eine recht verschwenderische und ineffiziente Methode für den Transport von DNA zu sein, die der Zelle den Großteil der möglichen therapeutischen Wirkungen der DNA vorenthält – seien es die erwünschte Genexpression, die Inhibition durch antiparallele Oligonukleotide oder andere Effekte.

Zabner et al. haben verdeutlicht, wie ineffizient die Trennung der Nucleinsäuren von den Endosomen ist, indem sie versuchten, DNA, die über DOPE/DMRIE-Liposomen in die Zellen eingeschleust worden war, durch Elektronen- und Confocalmikroskopie zu messen.^[61] Es gelang ihnen nicht, signifikante Mengen zu bestimmen, obwohl offensichtlich genügend DNA freigesetzt wurde für eine cytoplasmatische Gentranskription, angetrieben von einem rekombinanten Vaccinia-virus, der T7-Polymerase exprimiert. Gleichwohl wurde ein Großteil der DNA in perinukleären Endosomen in der Form makromolekularer Lipid-DNA-Strukturen angereichert, wie sie im vorigen Abschnitt beschrieben worden sind. Ähnliches wurde von Gao und Huang berichtet.^[71]

Wenn Nucleinsäuren aus Endosomen entweichen, dann scheint dies nach den neuesten Untersuchungen in einem frühen Stadium nach der Endozytose stattzufinden, d.h., wenn die Liposom-Nucleinsäure-Komplexe sich in einem „jungen“ Endosomkompartment befinden.^[65, 66] Den Mechanismus des frühen Entweichens aus Endosomen hat man noch nicht vollständig verstanden, aber wenn DOPE **2** Bestandteil des kationischen Liposoms ist, dann könnte das Entweichen durch die Tendenz von DOPE **2** unterstützt werden, signifikante polymorphe Lipidphasen-Veränderungen unter physiologischen Bedingungen hervorzurufen.^[72–74] Vor allem fördert DOPE **2** die Bildung einer invertierten hexagonalen Phase (bei Raumtemperatur und neutralem pH-Wert) aus der lamellaren Flüssigkristall-Phasencharakteristik der meisten biologischen Membranen.^[72] Diese hexagonale Phase tritt oft auf, wenn Membranen verschmelzen.^[3] DOPE **2** könnte also das Zerreißen der Endosomen verursachen, indem es die Membranverschmelzung fördert. Wenn DOPE **2** nicht in dem kationischen Liposom vorhanden ist (z.B. bei Liposomen aus DOTAP **3** oder DOGS **9**), könnten lokale Detergentienef-

fekte die Ursache für das Entweichen aus den Endosomen sein.^[18] Xu und Szoka haben ein Modell für das frühe Ausbrechen aus Endosomen vorgeschlagen, in dem Komplexe kationischer Liposomen mit DNA die Endosomenmembran derart destabilisieren, daß ein Entweichen der DNA möglich wird.^[75] Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem kationischen Liposom und der Endosomenmembran induzieren ein Umspringen von anionischen Lipiden aus der dem Cytoplasma zugewandten Lipidschicht der Endosomenmembran, die seitlich in den Komplex diffundieren, wo sie dann ladungsneutrale Ionenpaare mit Cytofektinen bilden. Die ionischen Wechselwirkungen zwischen DNA und Cytofektinen werden dadurch unterbrochen, so daß die DNA frei in das Cytoplasma diffundieren kann (Abb. 8).

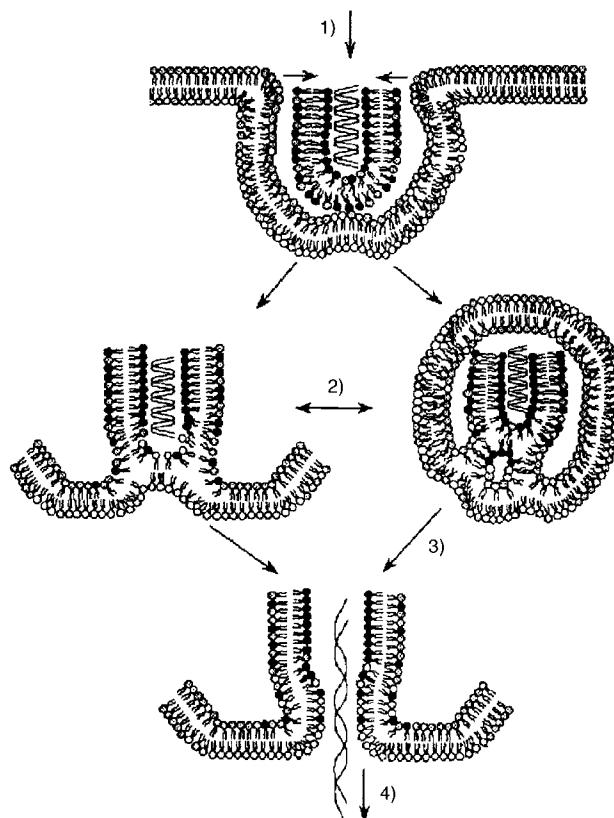


Abb. 8. Vorgeschlagener Mechanismus für das Eindringen von Liposom-DNA-Komplexen in die Zelle und die anschließende Freisetzung von DNA aus Endosomen. Schritt 1: elektrostatische Wechselwirkung von Liposom-DNA-Komplexen mit der Zellmembran und anschließende Endozytose. Schritt 2: Membrandestabilisierung im frühen Endosom führt zum Umlappen der anionischen/zwitterionischen Lipide. Schritt 3: Anionische Lipide diffundieren in den Komplex und bilden ladungsneutrale Ionenpaare mit Cytofektinen. Schritt 4: DNA dissoziiert aus dem Komplex und diffundiert in das Cytoplasma. Die Kopfgruppen der anionischen/zwitterionischen Lipide werden als helle Kreise dargestellt, die der Cytofektine als schwarze Kreise. (Die Abbildung wurde mit der Erlaubnis der Autoren^[75] übernommen.)

Sowie die Nucleinsäuren ins Cytoplasma gelangt sind, könnten sie einem weiteren Problem gegenüberstehen, wenn sie für ihre therapeutische Aufgabe in den Zellkern einzudringen versuchen. Dies ist nicht immer notwendig, da freigesetzte mRNA z.B. auch wirksam ist, ohne in den

Zellkern gelangen. Ist aber das Einschleusen in den Zellkern eine zwingende Voraussetzung, so kann dies ein genauso ernstes Problem für die Gesamteffizienz des durch kationische Liposomen vermittelten Nucleinsäuretransports sein wie das Entweichen aus den Endosomen. Die Schwierigkeiten der Wanderung der Nucleinsäuren zum Zellkern wurden von Capecchi überzeugend demonstriert. Er zeigte anhand einer Mauszelllinie, daß direkt in den Zellkern injizierte DNA zu über 50 % zu Proteinexpression führte, bei in das Cytoplasma injizierter DNA hingegen nur bei weniger als 0.01 % der Zellen.^[76]

Zabner et al. erhielten ähnliche Ergebnisse aus vergleichbaren Experimenten mit einem *Xenopus*-Eizellensystem.^[61] Die Größe der Nucleinsäuren scheint der entscheidende Faktor dafür zu sein, ob sie den Kern erreichen oder nicht. Kleine Oligonucleotide (etwa zwischen 20 und 30 Basenpaare lang) akkumulieren leicht im Kern, gleichgültig, ob sie nun durch kationische Liposomen^[65, 77] oder über cytoplasmatische Injektion dorthin gelangt sind.^[78] Wahrscheinlich wird aber größere DNA vom Kern ausgeschlossen, weil die Porengrößen der Kernmembran eine Durchlässigkeitsgrenze von ≈ 40 kDa haben.^[79] Das bedeutet nicht, daß größere DNA überhaupt nicht in den Zellkern eintreten kann, denn dann wäre die Expression von freigesetzten Genen unmöglich. Größere DNA benötigt aber wegen der Begrenzung durch die Porengrößen der Kernmembran eine Hilfestellung beim Einschleusen in den Zellkern. Offensichtlich sind Viren bei diesem Prozeß sehr effizient. Es wird sich zeigen, ob kationische Liposomen derart angepaßt werden können, daß sie Nucleinsäureoligomere aller Größen ähnlich gut beim Einschleusen in den Zellkern unterstützen.

5. Die allgemeine Verwendbarkeit von Formulierungen kationischer Liposomen

Dank der recht einfachen Handhabung und annehmbaren Effizienz wurden Formulierungen kationischer Liposomen schon bei einer Vielzahl von Primärzellen und Zellkulturen in vitro für den Gentransport eingesetzt. Es mag vielleicht nicht überraschen, daß im Handel erhältliche Formulierungen kationischer Liposomen umfassend genutzt wurden, auch, weil sie nachweislich über ein umfangreiches Einsatzspektrum verfügen. Es wurden aber auch schon andere Formulierungen eingesetzt. Zu neuen Anwendungsbeispielen gehören der Einsatz von Lipofectin (Tabelle 1) zur Transfektion von Rattenoligodendrocyten^[80] und Kaninchenendothelzellen,^[81] LipofectAMINE zur Transfektion von Mäusemyoblasten,^[82] menschlichen Hepatom-,^[83] prostatischen Epithel-^[84] und Eizellen,^[85] DOTAP **3** zur Transfektion von Mäusezellen^[86] und menschlichen Cervixkarzinomzellen (CaSki)^[87] sowie DDAB-Liposomen zur Transfektion von CaSki-Zellen^[87] und menschlichen Brustadenokarzinomzellen.^[88] Für Liposomen auf der Basis von DOPE **2** und DC-Chol **14** gibt es auch vielseitige Anwendungen in vitro, z. B. bei der Transfektion von menschlichen Eizellen,^[85] Epidermkarzinom-,^[89, 90] Epithel-^[91] und Nervenzellen.^[94]

Es scheint nur einige wenige Strukturprinzipien zu geben, die bestimmen, welche Formulierungen von Cytofectin und

Liposom bei der Abgabe von Nucleinsäurevektoren in vitro einen spürbaren Wirkungsgrad erreichen und welche nicht. Oft wurden strukturelle Einschränkungen bei einer bestimmten Gruppe kationischer Amphiphile festgestellt, die bei anderen offenbar ohne Bedeutung sind. Beispielsweise sind quaternisierte Derivate von Cholesterin-Amphiphilen bezüglich ihrer Abgabe in vitro viel weniger effizient als die entsprechenden tertiären Amine.^[43] DOTMA **1** und seine Analoga sind allerdings alle quartäre Amine. Aus diesem Grund sind Struktur-Aktivitäts-Vergleiche innerhalb einer Gruppe von Cytofectinen und Liposomen oft der einzige Weg gewesen, die Nucleinsäureabgabe auf rationalem Weg zu optimieren – zumindest teilweise. Zum Beispiel haben sowohl Felgner et al.^[18] als auch Balasubramaniam et al.^[20] umfangreiche, sorgfältig kontrollierte Studien durchgeführt, um den relativen Nutzen von DOTMA **1** enthaltenden Liposomen zu bestimmen. Auf ähnliche Weise haben Lee et al.,^[32] Cooper et al.^[33] und Walker et al.^[31] die Transfektionseigenschaften einer Gruppe aus Polyamincholesterin-Cytofectinen optimiert. Weitere, stärker begrenzte vergleichende Untersuchungen wurden an den Homologen anderer Cytofectine durchgeführt.^[23, 43]

Bei der Suche nach einem allgemeinen Zusammenhang zwischen der Cytofectinstuktur und der Effizienz der Genabgabe haben Akao et al. vorgeschlagen, daß als Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Transfektion die Phasenübergangstemperatur (T_c) des kationischen Liposomensystems unter 37°C liegen sollte.^[23] Eine neuere Studie an DOTMA **1** enthaltenden Liposomen stützt diesen Vorschlag nicht.^[20] Stattdessen könnte die Cytotoxizität durchaus das wichtigste Kriterium sein. Unter diesem Gesichtspunkt wären DOPE/DC-Chol-Liposomen sehr nützlich, da sie nur eine niedrige Toxizität aufweisen.^[92] Dennoch ist auch dies wahrscheinlich nicht das einzige Kriterium. Es wurde vorgeschlagen, daß die Effizienz der Genabgabe zum Teil über das Zeta-Potential der kationischen Liposomen bestimmt werden kann, das seinerseits teilweise von der Cytofectinstuktur abhängt.^[93] Beim Vergleich der Genabgabeffizienz einer Reihe von kationischen Liposomen, die mit Cholesterin-Cytofectinen wie DC-Chol **14**, **15** oder **16** hergestellt worden waren, schien sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Abgabeffizienz und dem Zeta-Potential zu ergeben, das durch Laser-Doppler-Spektroskopie gemessen wurde.

Die Einfachheit der durch kationische Liposomen vermittelten Genabgabe in vitro hat auch zu einem schnellen Anstieg solcher Anwendungen in vivo geführt.^[3, 94] Die Liposomen, deren In-vitro-Wirksamkeit oben beschrieben wurde, haben auch ihre In-vivo-Wirksamkeit unter Beweis gestellt. Allerdings scheint die In-vitro-Wirksamkeit eines kationischen Liposoms nur ein ungenügendes Maß für seine In-vivo-Wirksamkeit zu sein.^[32, 33] Im folgenden wird eine Reihe neuerer In-vivo-Anwendungen beschrieben. Liposomen auf der Basis von DOPE **2** und DDAB **12** transfizierten Mäusezellen-, -milz- und -nierenzellen mit Cytokingenen nach Injektion von Liposom-DNA-Komplexen ins Bauchfell.^[95]

Cholesterin/DDAB-Liposomen führten nach intravenöser Injektion auf ähnliche Weise zu einem hohen Grad an systemischer Transfektion eines Chloramphenicolacetyltrans-

ferase(CAT)-Markergens in Mäusen.^[96] Lipofectin kann in vivo die Arterienwandzellen von Schweinen mit fremden Histokompatibilitätskomplexen transfizieren.^[97] Bessere Ergebnisse wurden mit kationischen Liposomen aus DOPE **2** und GAP-DLRIE **8** erhalten.^[98] Mäusetumore sind ebenfalls schon in vivo nach einer subkutanen Injektion des Tumors mit Lipofectin/DNA-Komplexen mit einem Tumornekrosefaktor- α -Gen transfiziert worden.^[99] Entsprechend hat man mit einer kontinuierlichen Injektionsmethode cerebrale Mäusetumore in vivo durch Einsatz von DOPE/DMRIE-Liposomen mit Thymidinkinasegen transfiziert.^[100] Eine bemerkenswerte Entdeckung der letzten Zeit war, daß DOGS **9** enthaltende Liposomen die Embryos trächtiger Mäuse mit einem CAT-Markergen nach intravenöser Injektion eines Liposom-DNA-Komplexes transfizieren konnten. Das Transgen wurde sowohl in den Föten als auch in deren Nachkommenschaft exprimiert.^[101] Zur Zeit stehen noch allerdings noch weitere Berichte zur Bestätigung dieser faszinierenden Entdeckung aus.

Einige der erfolgreichsten In-vivo-Anwendungen bezüglich der durch kationische Liposomen vermittelten Abgabe von Genen finden sich in neueren Arbeiten, die sich mit der Transfektion bei Lungenzellen befassen. Nachdem gezeigt worden war, daß DOPE/DOTMA-Liposomen ein CAT-Markergen über Aerosolverabreichung des Komplexes in Mäuselungen einbringen können,^[102] berichteten Alton et al.^[103] sowie Hyde et al.^[104], daß DOPE/DC-Chol- und Lipofectin-Liposomen auf ähnliche Weise verwendet werden können, um das CFTR-Gen in die Lungen von bezüglich cystischer Fibrose transgenen Mäusen einzubauen und somit die durch die cystische Fibrose entstandenen Lungendefekte zu korrigieren (CFTR = cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Dies hat zu klinischen Versuchen zur Anwendung von DOPE/DC-Chol-Liposomen bei der gentherapeutischen Behandlung von an cystischer Fibrose erkrankten Patienten geführt.^[105] Später haben Cooper et al.^[33] und Lee et al.^[32] darüber berichtet, daß kationische DOPE/CTAP- und DOPE/Lipid-67-Liposomen bei der CAT-Markergenübergabe in Mäuselungen mindestens 100mal effizienter sind als DOPE/DC-Chol-Liposomen. Daher wird Lipid 67 **18** derzeit in neuen Versuchen zur Gentherapie von cystischer Fibrose intensiv untersucht. In Zukunft werden wahrscheinlich noch viele andere Formulierungen kationischer Liposomen im Hinblick auf ihre Eigenschaften als Gentransferagentien für therapeutische Gene in Humangenetherapieversuchen getestet werden.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die Verwendung von kationischen Liposomen zum Transfer von Nucleinsäuren in Primär- oder Kulturzellen in vitro ist mittlerweile eine etablierte Methode. Hinzu kommt die schnell zunehmende Verwendung kationischer Liposomen sowohl mit Markergenen als auch mit therapeutischen Genen für den Gentransport in vivo. Die Aussichten für die durch kationische Liposomen vermittelte Gentherapie sind sicherlich sehr gut. Kationische Liposomen wurden bereits in klinischen Versuchen zur Gentherapie beim Menschen ein-

gesetzt.^[92, 105] Wenngleich die Ergebnisse in diesen Studien andeuteten, daß die eingesetzten kationischen Liposomen nicht effizient genug waren, um signifikante klinische Erfolge auszulösen, spricht viel dafür, daß zwei der jüngst beschriebenen Formulierungen kationischer Liposomen, die Lipid 67 **18**^[32] und CTAP **19**^[33] enthalten, effizient genug sind, um klinisch sinnvoll in der Gentherapie von Lungenfehlfunktionen eingesetzt zu werden.

Es werden aber ständig verbesserte Liposomenformulierungen mit ständig verbesserten Cytofectinen vonnöten sein, wenn kationische Liposomen künftig eine weite Verbreitung in der Gentherapie beim Menschen finden sollen. Hier sei besonders darauf hingewiesen, daß Komplexe kationischer Liposomen mit Nucleinsäuren nicht sehr zelltypspezifisch sind, was für die Gentherapie von bestimmten Lungenfehlfunktionen kein Problem ist, wohl aber bei den meisten anderen Krankheiten. Selbst wenn die Komplexe spezifischer wären, so binden doch die Nucleinsäuren im allgemeinen mit zu geringer Effizienz, so daß die Menge benötigter Liposomen zu hoch ist, um für einen klinischen Einsatz sinnvoll zu sein. Darüber hinaus dringen die Komplexe kationischer Liposomen mit Nucleinsäure viel zu langsam in Zellen ein. Wenn sie dann endlich in der Zelle sind, bleiben zu viele der Nucleinsäuren in den Endosomen-Kompartimenten eingeschlossen, so daß sie weder im Cytoplasma ihre Funktion erfüllen können, noch zum Kern gelangen können, um dort therapeutisch zu wirken. Es ist durchaus möglich, daß einige (oder alle) dieser Probleme durch das Design neuer Cytofectine behoben werden können. Um aber diese Probleme lösen zu können, müssen kationische Liposomen möglicherweise nicht nur aus Lipidkomponenten synthetisiert werden, sondern mit einer ganzen Reihe von Liganden ausgestattet werden, zu deren Aufgaben Zellerkennung, die Beschleunigung des Zelleintritts, Endosomolyse, nuclear targeting usw. gehören werden. Das würde gleichsam bedeuten, daß die Chemiker künstliche Viren konstruieren müßten.

Es wurden bereits einige Fortschritte erzielt, die nahelegen, daß kationische Liposomen mit den beschriebenen Eigenschaften entwickelt und verbessert werden können. So wurde ein Transfectam-DNA-Komplex (Tabelle 1) eingesetzt, um Hepatomzellen anzusteuern, indem ein dreiarmiger Ligand aus Galaktoseeinheiten an das Liposom gebunden wurde.^[106] Kürzlich wurde entdeckt, daß mannosyliertes Poly(L-lysin) den rezeptorvermittelten Transfer von Genen in Makrophagen fördert, die einen Mannoserezeptor für die Zelloberfläche exprimieren.^[107, 108] Andere glykosylierte Poly(L-lysine) fördern den rezeptorvermittelten Gentransfer in Lungenepithelzellen^[109] und von Monozyten abgeleiteten Makrophagen.^[110] Daher könnte die kovalente Anbindung verschiedener Monosaccharide oder sogar Oligosaccharide an kationische Liposomen ein fruchtbare Feld für die Entwicklung zelltypspezifischer kationischer Liposomen sein.

Proteine sind ebenfalls potentielle Liganden für das sogenannte cell targeting, wobei hier auch Lectine^[111] und/oder Antikörper zu berücksichtigen sind.^[112] Dieser Ansatz fand bereits erfolgreich bei der gezielten Transfektion von Mäuse-lungenendothelzellen Verwendung, wobei ein an Poly(L-lysin) geknüpfter Antithrombomodulin-Antikörper in Kombination mit DOPE/DC-Chol-Liposomen verwendet wurde.^[113] Sau-

bere und selektive Verfahren zur Kupplung von Proteinen an kationische Liposomen werden mit großer Sicherheit entwickelt werden müssen. Der potentielle Nutzen von Peptidliganden wurde kürzlich von Hart et al. demonstriert, die ein Peptid mit einem N-terminalen Integrin-bindenden Aminosäuresequenzmotiv (Arginin-Glycin-Asparaginsäure [RGD]) und einem C-terminalen Hexadeca(L-lysin) herstellten. Dieses konnte den Gentransport mit einem durch den Integrinrezeptor vermittelten Aufnahmemechanismus fördern.^[114] In Kombination mit einem Liposom-DNA-Komplex zeigte sich, daß eine Variante dieses Peptids den durch kationische Liposomen vermittelten DNA-Transport verstärkte.^[127] Barry et al. haben ebenfalls eine Auswahl zellbindender Peptide beschrieben, die aus Zufallsbibliotheken peptidpräsentierender Phagen erhalten wurden und in Zukunft leicht an kationische Liposomen angeknüpft werden könnten.^[115]

Ein nützlicher Nebeneffekt dieses rezeptorvermittelten Ansatzes zum cell targetting ist, daß das Einschleusen der Liposom-Nucleinsäure-Komplexe generell beschleunigt wird. Allerdings verbleiben immer noch die anderen Probleme der niedrigen Effizienz der Nucleinsäurebindung, der unzureichenden Freisetzung aus den Endosomen und des ineffizienten Transfers der Nucleinsäuren zum Zellkern. Das erste Problem sollte sich leicht durch den Einbau von Polykationen in die kationischen Liposomen lösen lassen. Zum Beispiel wurden bereits polykationische Histonproteine zur Verstärkung der durch Lipofectin (Tabelle 1) vermittelten Genübergabe eingesetzt.^[116] In anderen Fällen erwiesen sich Polykationen wie Lipopoly(L-lysin) (LPLL)^[117] und Poly(L-lysin) als wirksam,^[118] und Polyamin-Dendrimere könnten hier ebenfalls nützlich sein.^[118, 119] Die verbleibenden Probleme sind sehr wahrscheinlich ebenfalls lösbar; potentielle Lösungen zeichnen sich bereits ab. Zum Beispiel berichteten Lyons et al. vor einiger Zeit über ein Pentapeptid-Kernlokalisierungssignal im Adenovirusprotein E1a,^[120] während Gottschalk et al. kürzlich von einem amphipathischen Peptid berichteten, das endosomale Membranen aufbrechen kann.^[121] Beide Peptide könnten sich als nützliches Werkzeug zur Verbesserung des durch kationische Liposomen vermittelten Nucleinsäuretransfers in die Zelle erweisen.

Zusätzlich zu den oben umrissenen Problemen werden sich zweifellos weitere Probleme einstellen, je nach Zielort der in vivo eingesetzten Liposom-Nucleinsäure-Komplexe. So hängen mit der Verabreichung der Komplexe in Aerosolform in der Lunge, wie sie bei der Gentherapie für cystische Fibrose erwähnt wurde, gänzlich andere Probleme zusammen, als sie bei einer systemischen Verabreichung auftreten. Hierbei könnte der Bedarf an längerer systemischer Zirkulationszeit und der Vermeidung von Wechselwirkungen entweder mit Plasmakomponenten^[122] oder dem Komplementsystem^[123] zur Entwicklung der „Stealth-Liposomen“-Methode führen,^[124, 125] bei der Einheiten wie Polyethylenglykol^[126] oder Gangliosid-G_{M1}-Oligosaccharide^[112] kovalent an die kationischen Liposomen gebunden werden.

Es gibt offensichtlich viele Verbesserungsmöglichkeiten des durch kationische Liposomen vermittelten Gentransports, und beträchtliche Forschungsarbeit im Hinblick auf generelle Modifizierungen wird zu leisten sein. Diese Vielzahl an Möglichkeiten läßt aber auch hoffen, daß kationische Liposomen

ihre Versprechen als Schlüsseltechnologie für die Gentherapie beim Menschen einlösen werden, unabhängig vom Krankheitstyp oder -ort. Daher bietet das Design, die Synthese und das Testen von immer effizienteren Cytofectinen und kationischen Liposomen hervorragende Möglichkeiten für Organiker und Physikochemiker, die Interesse an der Arbeit im Grenzgebiet zwischen Medizin und Chemie haben.

Anhang: häufig verwendete Abkürzungen

BGTC	Bis(guanidinium)-TREN-Cholesterin 21
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
CE β A	β -Alanincholesterylsterester 39
CTAP	N^{15} -Cholesteryloxycarbonyl-3,7,12-tri-azapentadecan-1,15-diamin 19
DC-Chol	3β -[N -(N',N' -Dimethylaminoethyl)carbamoyl]cholesterin 14
DDAB	Dimethyldioctadecylammoniumbromid 12
Di-C14-amidin	<i>N</i> - <i>tert</i> -Butyl- <i>N'</i> -tetradecyl-3-tetra-decylaminopropionamidin 11
DMRIE	1,2-Dimyristyloxypropyl-3-dimethyl(hydroxyethyl)ammoniumbromid 4
DOGS	Diocadecylamidoglycylspermin · 4 Trifluoressigsäure 9
DOPE	Dioleoyl- <i>L</i> - α -phosphatidylethanolamin 2
DORI	1,2-Dioleyloxy carbonylpropyl-3-dimethylhydroxyethylammoniumbromid 7
DORIE	1,2-Dioleyloxypropyl-3-dimethylhydroxyethylammoniumbromid 6
DOSPA	2,3-Dioleyloxy- <i>N</i> -[2-(spermincarboxamido)ethyl]- <i>N,N</i> -dimethyl-1-propanammoniumtrifluoracetat 5
DOTAP	1,2-Dioleyloxy-3-(trimethylammonio)propan 3
DOTIM	1-[2-(Oleoyloxy)ethyl]-2-oleyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazoliniumchlorid 26
DOTMA	<i>N</i> -[1-(2,3-Dioleyloxy)propyl]- <i>N,N,N</i> -trimethylammoniumchlorid 1
DPPES	Dipalmitoylphosphatidylethanolamido-spermin · 4 Trifluoressigsäure 22
GAP-DLRIE	(\pm)- <i>N</i> -(3-Aminopropyl)- <i>N,N</i> -dimethyl-2,3-bis(dodecyloxy)-1-propanammoniumbromid 8
L-PE	Lysinylphosphatidylethanolamin 23a
Lys-Pam ₂ -GroPETn	Lysinyl dipalmitoyl- <i>L</i> - α -phosphatidylethanolamin · 2 Trifluoressigsäure 23
RET	Resonanzenergietransfer
14 Dea 2	Tetradecanoyl- <i>N</i> -(trimethylammonio-acetyl)diethanolaminchlorid 10
2C ₁₂ -L-Glu-ph-C ₂ -N ⁺	<i>O,O'</i> -Didodecyl- <i>N</i> -[<i>p</i> -(2-trimethylammonioethoxy)benzoyl]- <i>L</i> -glutamat 24
2C ₁₄ -L-Glu-C ₂ -N ⁺	<i>O,O'</i> -Ditetradecyl- <i>N</i> -(2-trimethylammonioethanoyl)- <i>L</i> -glutamat 25

Eingegangen am 7. April 1997 [A 223]
Übersetzt von Dr. Frank Kastenholz, Köln

- [1] S. Das, L. Yu, C. Gaitatzes, R. Rogers, J. Freeman, J. Bienkowska, R. M. Adams, T. F. Smith, J. Lindelien, *Nature (London)* **1997**, 385, 29–30.
- [2] T. Friedmann, *Nature Med.* **1996**, 2, 144–147.
- [3] X. Gao, L. Huang, *Gene Ther.* **1995**, 2, 710–722.
- [4] P. L. Felgner, *J. Liposome Res.* **1993**, 3, 3–16.
- [5] R. G. Crystal, *Science* **1995**, 270, 404–410.
- [6] F. D. Ledley, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1994**, 5, 626–636.
- [7] E. M. Gordon, W. F. Anderson, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1994**, 5, 611–616.
- [8] B. C. Trapnell, M. Gorziglia, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1994**, 5, 617–625.
- [9] K. F. Korzarsky, J. M. Wilson, *Curr. Opin. Genet. Develop.* **1993**, 3, 499–503.
- [10] R. C. Mulligan, *Science* **1993**, 260, 926–932.
- [11] J. G. Smith, R. L. Walzem, J. B. German, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, 1154, 327–340.
- [12] J. Y. Legendre, F. C. Szoka, Jr., *Pharm. Res.* **1992**, 9, 1235–1242.
- [13] S. Sato, J. Sunamoto, *Prog. Lipid Res.* **1992**, 31, 345–372.
- [14] D. C. Litzinger, L. Huang, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, 1113, 201–227.
- [15] P. Hug, R. G. Sleight, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, 1097, 1–17.
- [16] 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. USA* **1987**, 84, 7413–7417.
- [17] R. Leventis, J. R. Silvius, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, 1023, 124–132.
- [18] 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, 2550–2561.
- [19] M. J. Bennett, R. W. Malone, M. H. Nantz, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 2207–2210.
- [20] R. P. Balasubramaniam, M. J. Bennett, A. M. Aberle, J. G. Malone, M. H. Nantz, R. W. Malone, *Gene Ther.* **1996**, 3, 163–172.
- [21] C. J. Wheeler, P. L. Felgner, Y. J. Tsai, J. Marshall, L. Sukhu, S. G. Doh, J. Hartikka, J. Nietupski, M. Manthorpe, M. Nichols, M. Plewe, X. Liang, J. Norman, A. Smith, S. H. Cheng, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 11454–11459.
- [22] J.-P. Behr, B. Demeneix, J.-P. Loeffler, J. Perez-Mutul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 6982–6986.
- [23] T. Akao, T. Nakayama, K. Takeshia, A. Ito, *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1994**, 34, 915–920.
- [24] T. Kunitake, N. Nakashima, M. Shimomura, Y. Okahata, K. Kano, T. Ogawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 6642–6644.
- [25] J.-M. Ruysschaert, A. El Ouahabi, V. Willeaume, G. Huez, R. Fuks, M. Vandendriessche, P. Di Stefano, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, 203, 1622–1628.
- [26] F. Defrise-Quertain, P. Duquenoy, R. Brasseur, P. Brak, B. Caillaux, R. Fuks, J.-M. Ruysschaert, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, 1060–1062.
- [27] T. Kunitake, Y. Okahata, K. Tamaki, F. Kumamaru, M. Takayanagi, *Chem. Lett.* **1977**, 387–390.
- [28] J. G. Lewis, K.-Y. Lin, A. Kothavale, W. M. Flanagan, M. D. Matteucci, B. DePrince, R. A. Mook, Jr., R. W. Hendren, R. W. Wagner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 3176–3181.
- [29] X. Gao, L. Huang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 179, 280–285.
- [30] R. Bottega, R. M. Epand, *Biochemistry* **1992**, 31, 9025–9030.
- [31] S. Walker, M. J. Sofia, R. Kakarla, N. A. Kogan, L. Wierichs, C. B. Longley, K. Bruker, H. R. Axelrod, S. Midha, S. Babu, D. Kahne, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 1585–1590.
- [32] E. R. Lee, J. Marshall, C. S. Siegel, C. Jiang, N. S. Yew, M. R. Nichols, J. B. Nietupski, R. J. Ziegler, M. B. Lane, K. X. Wang, N. C. Wan, R. K. Scheule, D. J. Harris, A. E. Smith, S. H. Cheng, *Hum. Gene Ther.* **1996**, 7, 1701–1717.
- [33] R. G. Cooper, C. J. Etheridge, L. Stewart, J. Marshall, S. Rudginsky, S. H. Cheng, A. D. Miller, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 137–151.
- [34] J. K. Guy-Caffey, V. Bodepudi, J. S. Bishop, K. Jayaraman, N. Chaudhary, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 31391–31396.
- [35] D. Moradpour, J. I. Schauer, V. R. Zurawski, Jr., J. R. Wands, R. H. Boutin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 221, 82–88.
- [36] J. P. Vigneron, N. Oudrhiri, M. Fauquet, L. Vergely, J. C. Bradley, M. Basseville, P. Lehn, J.-M. Lehn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 9682–9686.
- [37] C. Puyal, P. Milhaud, A. Bienvenüe, J. R. Philippot, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 228, 697–703.
- [38] E. Brunette, R. Stribling, R. Debs, *Nucleic Acids Res.* **1992**, 20, 1151.
- [39] A. Ito, R. Miyazoe, J.-y. Mitoma, T. Akao, T. Osaki, T. Kunitake, *Biochem. Int.* **1990**, 22, 235–241.
- [40] I. Solodin, C. S. Brown, M. S. Bruno, C.-Y. Chow, E.-H. Jang, R. J. Debs, T. D. Heath, *Biochemistry* **1995**, 34, 13537–13544.
- [41] M. P. Audrézet, G. Le Bolch, J. C. Clément, H. Handel, H. Bernard, H. des Abbayes, A. Roignant, J. J. Yaouanc, B. Mercier, C. Férec, *Am. J. Hum. Genet.* **1995**, 57, No4SS, 1356.
- [42] J. Wilschut, N. Düzgünes, R. Fraley, D. Papahadjopoulos, *Biochemistry* **1980**, 19, 6011–6021.
- [43] H. Farhood, R. Bottega, R. M. Epand, L. Huang, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, 1111, 239–246.
- [44] A. McQuillin, K. D. Murray, C. J. Etheridge, L. Stewart, R. G. Cooper, P. M. Brett, A. D. Miller, H. M. D. Gurling, *NeuroReport* **1997**, 8, 1481–1484.
- [45] B. Schwartz, C. Benoist, B. Abdallah, D. Scherman, J.-P. Behr, B. A. Demeneix, *Hum. Gene Ther.* **1995**, 6, 1515–1524.
- [46] P. L. Felgner, G. M. Ringold, *Nature (London)* **1989**, 337, 387–388.
- [47] H. Gershon, R. Ghirlando, S. B. Guttman, A. Minsky, *Biochemistry* **1993**, 32, 7143–7151.
- [48] D. K. Struck, D. Hoekstra, R. E. Pagano, *Biochemistry* **1981**, 20, 4093–4099.
- [49] M. Beigel, M. Keren-Zur, Y. Laster, A. Loyter, *Biochemistry* **1988**, 27, 660–666.
- [50] M. Keren-Zur, M. Beigel, A. Loyter, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, 983, 253–258.
- [51] N. Düzgünes, J. A. Goldstein, D. S. Friend, P. L. Felgner, *Biochemistry* **1989**, 28, 9179–9184.
- [52] I. Jääskeläinen, J. Mönkkönen, A. Urtti, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1195, 115–123.
- [53] G. S. Manning, *Biopolymers* **1980**, 19, 37–59.
- [54] G. S. Manning, *Biopolymers* **1981**, 20, 1261–1270.
- [55] J. Gustafsson, G. Arvidson, G. Karlsson, M. Almgren, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, 1235, 305–312.
- [56] E. K. Wasan, D. L. Reimer, M. B. Bally, *J. Pharm. Sci.* **1996**, 85, 427–433.
- [57] K. Crook, G. McLachlan, B. J. Stevenson, D. J. Porteous, *Gene Ther.* **1996**, 3, 834–839.
- [58] J. O. Rädler, I. Koltover, T. Salditt, C. R. Safinya, *Science* **1997**, 275, 810–814.
- [59] J.-P. Behr, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 5861–5864.
- [60] S. J. Eastman, C. Siegel, J. Tousignant, A. E. Smith, S. H. Cheng, R. K. Scheule, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1325, 41–62.
- [61] J. Zabner, A. J. Fasbender, T. Moninger, K. A. Poellinger, M. J. Welsh, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 18997–19007.
- [62] B. Sternberg, F. L. Sorgi, L. Huang, *FEBS Lett.* **1994**, 356, 361–366.
- [63] L. Stamatatos, R. Leventis, M. J. Zuckermann, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1988**, 27, 3917–3925.
- [64] H. Farhood, N. Serbina, L. Huang, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, 1235, 289–295.
- [65] O. Zelphati, F. C. Szoka, Jr., *Pharm. Res.* **1996**, 13, 1367–1372.
- [66] D. S. Friend, D. Papahadjopoulos, R. J. Debs, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, 1278, 41–50.
- [67] K. A. Mislick, J. D. Baldeschwieler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 12349–12354.
- [68] F. Labat-Moleur, A.-M. Steffan, C. Brisson, H. Perron, O. Feugeas, P. Furstenberger, F. Oberling, E. Brambilla, J.-P. Behr, *Gene Ther.* **1996**, 3, 1010–1017.
- [69] J.-P. Behr, *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 274–278.
- [70] H. Matsui, L. G. Johnson, S. H. Randell, R. C. Boucher, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 1117–1126.
- [71] X. Gao, L. Huang, *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 2867–2872.
- [72] A. J. Verkleij, *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, 779, 43–63.
- [73] H. Ellens, J. Bentz, F. C. Szoka, *Biochemistry* **1986**, 25, 285–294.
- [74] T. M. Allen, K. Hong, D. Papahadjopoulos, *Biochemistry* **1990**, 29, 2976–2985.
- [75] Y. Xu, F. C. Szoka, Jr., *Biochemistry* **1996**, 35, 5616–5623.
- [76] M. R. Capocci, *Cell* **1980**, 22, 479–488.
- [77] C. F. Bennett, M.-Y. Chiang, H. Chan, J. E. E. Shoemaker, C. K. Mirabelli, *Mol. Pharm.* **1992**, 41, 1023–1033.

- [78] D. J. Chin, G. G. Green, G. Zon, F. C. Szoka, Jr., R. M. Straubinger, *New Biol.* **1990**, 2, 1091–1100.
- [79] I. Lang, M. Scholz, R. Peters, *J. Cell. Biol.* **1986**, 102, 1183–1190.
- [80] Z. Guo, N.-S. Yang, S. Jiao, J. Sun, L. Cheng, J. A. Wolff, I. D. Duncan, *J. Neurosci. Res.* **1996**, 43, 32–41.
- [81] N. G. Abraham, Y. Lavrovsky, M. L. Schwartzman, R. A. Stoltz, R. D. Levere, M. E. Gerritsen, S. Shibahara, A. Kappas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 6798–6802.
- [82] R. A. Trivedi, G. Dickson, *J. Neurochem.* **1995**, 64, 2230–2238.
- [83] G.-C. Tu, Q.-N. Cao, Y. Israel, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 28402–28407.
- [84] J. Vieweg, D. Boczkowski, K. M. Roberson, D. W. Edwards, M. Philip, R. Philip, T. Rudoll, C. Smith, C. Robertson, E. Gilboa, *Cancer Res.* **1995**, 55, 2366–2372.
- [85] H. Hofland, L. Huang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 207, 492–496.
- [86] C. Walker, M. Selby, A. Erickson, D. Cataldo, J.-P. Valensi, G. Van Nest, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 7915–7918.
- [87] K. Lappalainen, A. Urtti, E. Söderling, I. Jääskeläinen, K. Syrjänen, S. Syrjänen, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1196, 201–208.
- [88] R. Philip, B. Clary, E. Brunette, L. Kilinski, D. Murugesh, M. Sorich, J. Yau, J. Lebkowski, H. K. Lyerly, M. Philip, *Clin. Cancer Res.* **1996**, 2, 59–68.
- [89] L. Huang, H. Farhood, N. Serbina, A. G. Teepe, J. Barsoum, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 217, 761–768.
- [90] H. Farhood, X. Gao, J. Barsoum, L. Huang, *Anal. Biochem.* **1995**, 225, 89–93.
- [91] N. J. Caplen, E. Kinrade, F. Sorgi, X. Gao, D. Gruenert, D. Geddes, C. Coutelle, L. Huang, E. W. F. W. Alton, R. Williamson, *Gene Ther.* **1995**, 2, 603–613.
- [92] G. J. Nabel, E. G. Nabel, Z. Y. Yang, B. A. Fox, G. E. Plautz, X. Gao, L. Huang, S. Shu, D. Gordon, A. E. Chang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 11307–11311.
- [93] K.-i. Takeuchi, M. Ishihara, C. Kawaura, M. Noji, T. Furuno, M. Nakanishi, *FEBS Lett.* **1996**, 397, 207–209.
- [94] P. L. Felgner, *Hum. Gene Ther.* **1996**, 7, 1791–1793.
- [95] M. A. Rogy, T. Auffenberg, N. J. Espat, R. Philip, D. Remick, G. K. Wollenberg, E. M. Copeland III, L. L. Moldawer, *J. Exp. Med.* **1995**, 181, 2289–2293.
- [96] Y. Liu, D. Liggitt, W. Zhong, G. Tu, K. Gaensler, R. Debs, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 24864–24870.
- [97] E. G. Nabel, G. Plautz, G. J. Nabel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 5157–5161.
- [98] D. J. Stephan, Z.-Y. Yang, H. San, R. D. Simari, C. J. Wheeler, P. L. Felgner, D. Gordon, G. J. Nabel, E. G. Nabel, *Hum. Gene Ther.* **1996**, 7, 1803–1812.
- [99] L. P. Seung, H. J. Mauceri, M. A. Beckett, D. E. Hallahan, S. Hellman, R. R. Weichselbaum, *Cancer Res.* **1995**, 55, 5561–5565.
- [100] J. Zhu, L. Zhang, U. K. Hanisch, P. L. Felgner, R. Reszka, *Gene Ther.* **1996**, 3, 472–476.
- [101] M. Tsukamoto, T. Ochiya, S. Yoshida, T. Sugimura, M. Terada, *Nature Genet.* **1995**, 9, 243–248.
- [102] R. Stribling, E. Brunette, D. Liggitt, K. Gaensler, R. Debs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 11277–11281.
- [103] E. W. F. W. Alton, P. G. Middleton, N. J. Caplen, S. N. Smith, D. M. Steel, F. M. Munkonge, P. K. Jeffery, D. M. Geddes, S. L. Hart, R. Williamson, K. I. Fasold, A. D. Miller, P. Dickinson, B. J. Stevenson, G. McLachlan, J. R. Dorin, D. J. Porteous, *Nature Genet.* **1993**, 5, 135–142.
- [104] S. C. Hyde, D. R. Gill, C. F. Higgins, A. E. O. Trezise, L. J. MacVinish, A. W. Cuthbert, R. Ratcliff, M. J. Evans, W. H. Colledge, *Nature (London)* **1993**, 362, 250–255.
- [105] N. J. Caplen, E. W. F. W. Alton, P. G. Middleton, J. R. Dorin, B. J. Stevenson, X. Gao, S. R. Durham, P. K. Jeffery, M. E. Hodson, C. Coutelle, L. Huang, D. J. Porteous, R. Williamson, D. M. Geddes, *Nature Med.* **1995**, 1, 39–46.
- [106] J.-S. Remy, A. Kichler, V. Mordvinov, F. Schuber, J.-P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 1744–1748.
- [107] T. Ferkol, J. C. Perales, F. Mularo, R. W. Hanson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 101–105.
- [108] W. W. Liang, X. Shi, D. Deshpande, C. J. Malanga, Y. Rojanasakul, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, 1279, 227–234.
- [109] W. J. W. Kollen, P. Midoux, P. Erbacher, A. Yip, A. C. Roche, M. Monsigny, M. C. Glick, T. F. Scanlin, *Hum. Gene Ther.* **1996**, 7, 1577–1586.
- [110] P. Erbacher, M.-T. Bousser, J. Raimond, M. Monsigny, P. Midoux, A. C. Roche, *Hum. Gene Ther.* **1996**, 7, 721–729.
- [111] M. N. Jones, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1994**, 13, 215–250.
- [112] L. Huang, A. L. Klibanov, A. Mori, X. Gao, *J. Liposome Res.* **1993**, 3, 505–515.
- [113] V. S. Trubetskoy, V. P. Torchilin, S. Kennel, L. Huang, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, 1131, 311–313.
- [114] S. L. Hart, R. P. Harbottle, R. Cooper, A. D. Miller, R. Williamson, C. Coutelle, *Gene Ther.* **1995**, 2, 552–554.
- [115] M. A. Barry, W. J. Dower, S. A. Johnston, *Nature Med.* **1996**, 2, 299–305.
- [116] J. D. Fritz, H. Herweijer, G. Zhang, J. A. Wolff, *Hum. Gene Ther.* **1996**, 7, 1395–1404.
- [117] X. Zhou, L. Huang, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1189, 195–203.
- [118] X. Gao, L. Huang, *Biochemistry* **1996**, 35, 1027–1036.
- [119] J. Haensler, F. C. Szoka, Jr., *Bioconjugate Chem.* **1993**, 4, 372–379.
- [120] R. H. Lyons, B. Q. Ferguson, M. Rosenberg, *Mol. Cell. Biol.* **1987**, 7, 2451–2456.
- [121] S. Gottschalk, J. T. Sparrow, J. Hauer, M. P. Mims, F. E. Leland, S. L. C. Woo, L. C. Smith, *Gene Ther.* **1996**, 3, 448–457.
- [122] D. C. Litzinger, J. M. Brown, I. Wala, S. A. Kaufman, G. Y. Van, C. L. Farrell, D. Collins, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, 1281, 139–149.
- [123] C. Plank, K. Mechtler, F. C. Szoka, Jr., E. Wagner, *Hum. Gene Ther.* **1996**, 7, 1437–1446.
- [124] D. D. Lasic, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 1765–1779; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 1685–1698.
- [125] D. D. Lasic, D. Papahadjopoulos, *Science* **1995**, 267, 1275–1276.
- [126] K. Hong, W. Zheng, A. Baker, D. Papahadjopoulos, *FEBS Lett.* **1997**, 400, 233–237.
- [127] C. Coutelle, A. D. Miller, unveröffentlichte Ergebnisse.