

## Gentransfektionsagentien

# Gemini-Tenside: neue synthetische Vektoren zur Gentransfektion

Anthony J. Kirby,\* Patrick Camilleri, Jan B. F. N. Engberts, Martin C. Feiters, Roeland J. M. Nolte, Olle Söderman, Mark Bergsma, Paul C. Bell, Matthew L. Fielden, Cristina L. García Rodríguez, Philippe Guédat, Andreas Kremer, Caroline McGregor, Christele Perrin, Gaël Ronsin und Marcel C. P. van Eijk

**Stichwörter:**

DNA · Gentherapie · Tenside · Transfektion · Wirkstoff-Transport

Die oberflächenaktiven Eigenschaften kationischer Gemini-Tenside werden zur Lösung des komplexen Problems der Gentransfektion in Zellen verwendet. Von nahezu 250 getesteten Substanzen, denen etwa 20 verschiedene Struktur-Typen zugrunde liegen, zeigten viele eine gute In-vitro-Transfektionsaktivität. Das Tensid bindet und komprimiert DNS wirkungsvoll. Strukturelle und rechnerische Untersuchungen liefern ein brauchbares Modell des geformten Lipoplexes. Der Lipoplex kann durch die äußeren Membranen verschiedener Zelltypen dringen und so ins Cytoplasma gelangen. Die Freisetzung aus dem Endosom – ein Schlüsselschritt der Transfektion – könnte durch Veränderungen im Aggregationsverhalten des Lipoplexes bei fallendem pH-Wert kontrolliert werden. Dies deutet auf ein Löslösen der DNS aus dem Lipoplex vor dem Eintritt in den Zellkern hin, wo das neue Gen mit hoher Effizienz exprimiert werden kann.

### 1. Einführung

Dieser Kurzaufsatz beschreibt eine breite, interdisziplinäre Untersuchung von Gemini-Tensiden als Vektoren für die In-vitro-Transfektion von Genen. Hierin wird die erfolgreiche Kooperation fünf unabhängiger Gruppen aus

drei europäischen Ländern vorgestellt.<sup>[1]</sup> Das Ziel ist die Entwicklung synthetischer Vektoren für die Gentherapie, welche in ihrer einfachsten Form die Einführung eines fehlenden oder beschädigten Gens in den Zellkern voraussetzt. Die mögliche Unterstützung der Transfektion durch einige kationische Tenside ist ebenso bekannt wie die hervorragenden oberflächenaktiven Eigenschaften der Gemini-Tenside. Unsere Untersuchungen zeigen, dass Gemini-Tenside häufig auch gute Transfektionseigenschaften haben.

#### 1.1. Gemini-Tenside

Gemini-Tenside<sup>[2]</sup> sind eine relativ junge Klasse amphiphiler Moleküle mit zwei Kopfgruppen und zwei aliphatischen Ketten, die durch einen starren<sup>[3]</sup> oder flexiblen<sup>[4]</sup> Spacer verbunden sind (Abbildung 1). Anders als die entsprechenden monovalenten Substanzen (nur eine Kette und eine Kopfgruppe) verfügen sie im Allgemeinen über wesent-

[\*] Prof. A. J. Kirby, Dr. P. Guédat, Dr. C. McGregor, Dr. G. Ronsin  
University Chemical Laboratory  
Cambridge CB2 1EW (UK)  
Fax: (+44) 1223-336-362  
E-mail: ajk1@cam.ac.uk  
Dr. P. Camilleri, Dr. A. Kremer, Dr. C. Perrin  
Glaxo-SmithKline Pharmaceuticals  
Science Complex 1, New Frontiers Science Park North  
Third Avenue, Harlow, Essex CM19 5AW (UK)  
Prof. J. B. F. N. Engberts, M. Bergsma, Dr. P. C. Bell, Dr. M. L. Fielden  
Department of Chemistry, University of Groningen  
Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen (The Netherlands)  
Dr. M. C. Feiters, Prof. Dr. R. J. M. Nolte, Dr. C. L. García Rodríguez  
Department of Organic Chemistry, University of Nijmegen  
Toernooiveld 1, 6525 ED Nijmegen (The Netherlands)  
Prof. O. Söderman, Dr. M. C. P. van Eijk  
Division of Physical Chemistry 1  
Chemical Center, University of Lund  
P.O.B. 124, 22100 Lund (Sweden)

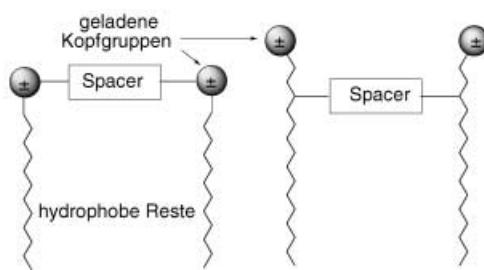


Abbildung 1. Prinzipieller Aufbau von Gemini-Tensiden.

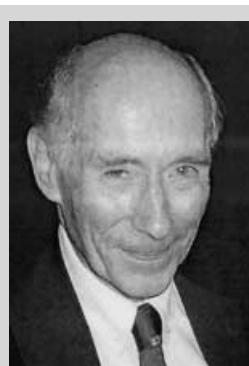
lich höhere Oberflächenaktivität – diese kann bis um das Tausendfache erhöht sein.

Von großem Interesse sind die Gemini-Tenside daher für biologische und insbesondere biomedizinische Anwendungen, bei denen eine Optimierung des Verträglichkeitsprofils einer jeden Fremdstoffsubstanz notwendig ist: Jede In-vivo-Anwendung beginnt mit der Minimierung ihrer Konzentration. Da offensichtlich ein großer ökonomischer Vorteil mit der Verwendung kleinerer Mengen einhergeht, die trotzdem den gleichen Effekt erzielen, ist in den letzten Jahren die Zahl der Patente zur Anwendung von Gemini-Tensiden stark gestiegen.

## 1.2. Gentherapie und Transfektion

Die einfachste Form der Gentherapie ist der Ersatz eines fehlenden oder defekten Gens im Zellkern. Einmal platziert, kann es unter Verwendung der natürlichen Zellabläufe die zur Korrektur eines spezifischen, pathologischen Leidens nötigen Proteine produzieren. Ein Hauptproblem für die routinemäßige Anwendung der Gentherapie bei der Behandlung von Krankheiten ist die wirksame Einführung von DNS in den Zellkern (Transfektion). Dementsprechend intensiv sind die Anstrengungen der Forschung auf diesem Gebiet.<sup>[5-8]</sup>

Gemeinhin<sup>[9]</sup> werden die Zell- und Zellkernwände als die entscheidenden Hindernisse auf dem Weg zu einer wirksamen Transfektion gesehen. Somit besteht ein großes Interesse an der Entwicklung von Methoden, die es der DNS ermöglichen, diese Membranen zu durchqueren. Der wahrscheinlich vielversprechendste Ansatz liegt in der chemischen und biologischen Modifizierung oder Verpackung des genetischen



Tony Kirby studierte Chemie an der University of Cambridge, von der er 1962 auch seinen Ph.D. erhielt. Anschließend verbrachte er ein Jahr als Postdoc bei William P. Jencks an der Brandeis University. Er war/jest Koordinator von drei europäischen Netzwerken: über katalytische Antikörper (1993–1996), Gemini-Tenside (1997–2001) und künstliche Nucleasen (2000–2004). Im Oktober 2002 ging er als Professor der Bioorganischen Chemie an der University of Cambridge in Ruhestand und kann sich nun auf die Forschung und einige neue Kooperationen, z. B. mit Brasilien, konzentrieren.

Materials. Die Einbindung therapeutischer DNS in konstruierte Viren<sup>[10–12]</sup> ist dafür die momentan effizienteste Methode. Diese Viren tragen als Erbeigenschaft eine Art biologischen Schlüssel, welcher ihnen den Weg durch die verschiedenen Membranen in den Zellkern öffnet. Ihre DNS-Trägerkapazität ist jedoch begrenzt, und somit ist ihr therapeutischer Nutzen nicht unumstritten. Wegen unvorhersehbarer Immunreaktionen der Viren und Sicherheitsbedenken<sup>[13,14]</sup> wurde die Suche nach alternativen Vektoren intensiviert.

## 2. Das Zuführungsproblem

Die Gentransfektion kann als besonderes Problem der Wirkstoffzuführung gesehen werden. Sie ist typischerweise von solchen Faktoren abhängig wie der Löslichkeit (die bei ionisierenden Substanzen auch noch pH-abhängig ist), dem Wirkstofftransport durch das System, der Überlebensdauer vor dem Metabolismus und von ihrer Fähigkeit, verschiedene physikalische Barrieren zu durchdringen. Der zu befördernde Wirkstoff ist jedoch in diesem Fall ein Stück DNS, und der ersehnte Erfolg wird ausschließlich durch das erfolgreiche Durchdringen von Zell- und Zellkernmembranen bestimmt. Diese Probleme sind schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

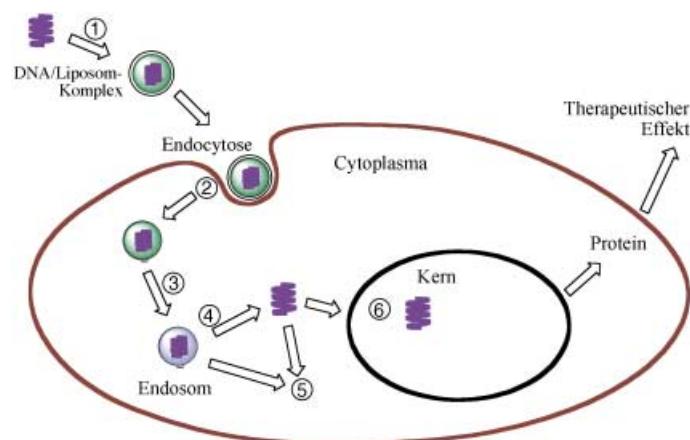


Abbildung 2. Vereinfachte Darstellung der bei der Liposom-gestützten Transfektion auftretenden Schlüsselschritte (1–6; Einzelheiten siehe Text). Hierbei wird ein Protein erhalten.

## 2.1. Stufen zur Transfektion und Proteinexpression

Der erste Schritt (1) ist die Komplexierung und die Kompaktion des Nucleinsäurepolyanions durch das kationische Tensid (Abschnitt 4.2). In Abwesenheit geeigneter Vektoren wird kein signifikantes Maß an Transfektion beobachtet. Im Detail wird diese Stufe später (Abschnitt 4.3) unter Berücksichtigung unserer neusten Ergebnisse erörtert. Demnach können Lipoplexe direkt aus Gemini-Tensiden mit unterschiedlichen Arten von DNS (und RNS) noch unter den kritischen Tensidaggregationskonzentrationen gebildet werden.

Der anfängliche Weg durch die Zellmembran, ermöglicht durch synthetische Tenside, verläuft vermutlich über die Endozytose (Abbildung 2), wie Zabner et al. bereits mithilfe der Elektronenmikroskopie zeigten.<sup>[15]</sup> Teile der Plasmamembran bilden eine Mulde, umschließen den Komplex und schnüren sich dabei nach innen ab. Auf diese Weise kann der DNS-Liposom-Komplex in die Zellmembran inkorporiert werden. Die Membran schließt sich unter Bildung eines Vesikels in ihrem Inneren (Schritt 2). Solche Vesikel können sich zu Endosomen vereinigen (Schritt 3), welche bei stark fallendem inneren pH-Wert zunehmend stärker hydrolytisch wirken, bis sie letztlich mit Lysosomen verschmelzen. Nur eine Fraktion der komplexierten DNS entkommt dem Endosom, der Rest wird entweder im späteren Endosom verdaut oder nach der Vereinigung mit dem Lysosom. (Lysosome enthalten starke Säurehydrolasen – Nucleasen, Peptidasen, Glycohydrolasen usw. – um eine wirksame Wiederverwertung zu ermöglichen.) Die DNS im Liposom-Komplex ist vor dem Abbau durch Nucleasen in gewissem Maße geschützt, wird aber schließlich doch abgebaut; es sei denn, sie wird – in freier Form oder als Komplex mit dem Vektor – vom Endosom freigesetzt. Dieser Schlüsselschritt (4) wird später ausgeführt (Abschnitt 4.4). Der Austritt der DNS aus dem DNS-Liposom-Komplex findet vermutlich während oder vor diesem Stadium statt, da anscheinend nur unkomplexierte DNS den Weg durch die Zellkernmembran nehmen kann (Schritt 6), zumindest wenn man von unseren Ergebnissen ausgeht (siehe Abschnitt 3.2). Der Weg durch die Zellkernmembran konkurriert mit der schnellen Zersetzung unkomplexierter DNS durch cytoplasmatische Nucleasen (Schritt 5).

Die strategischen Ansätze, bei denen sich das Vektor-Design erwartungsgemäß bedeutend auf die Effektivität der Genzuführung auswirkt, sind also die Bildung des Lipoplexes, sein Weg durch die Zellmembranen (Stufen 1 und 2, Abbildung 2), und sein Austritt aus dem Endosom gefolgt von seiner Dissoziation (Stufe 4). Diese Prozesse werden in Abschnitt 4 beschrieben.

## 2.2. Grundlagen des Vektor-Designs

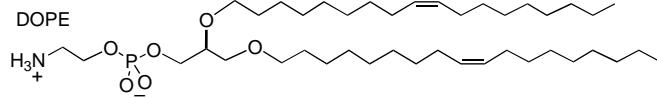
Die notwendige Voraussetzung eines guten Vektors liegt in seiner Fähigkeit, die DNS ausreichend stark und schnell zu komplexieren, direkt in die Zielzelle und eventuell den Zellkern einzudringen, und, wenn nötig, DNS aus dem Lipoplex innerhalb der Zielzelle zur rechten Zeit am rechten Ort freizusetzen. Um seiner Aufgabe gerecht zu werden, sollte er zudem ungiftig, nicht immunogen und biologisch abbaubar, aber trotzdem ausreichend stabil in biologischen Flüssigkeiten sein. Der erste und zugleich Schlüsselschritt des gesamten Prozesses (Schritt 1 in Abbildung 2) ist die Zusammenfügung (Kompaktion) der verlängerten, negativ geladenen DNS von großer Molekülmasse in ein dichtgedrängtes, positiv geladenes (oder eventuell neutrales) Partikel, klein genug um von der Zelle aufgenommen zu werden. Im Allgemeinen erfordert dies chemische Spezies mit vielfältiger positiver Ladung, um die monovalenten Gegenionen der DNS zu ersetzen. (Etwas so einfaches wie Calciumphosphat

wurde bereits verwendet, seine Transfektionsaktivität ist sehr gering.<sup>[16]</sup>)

Viele makromolekulare und supramolekulare Systeme zum Tragen der positiven Ladung wurden entwickelt; hierzu zählen kationische Polyelektrolyte (wie DEAE-Dextran,<sup>[17]</sup> Polylysine,<sup>[18,19]</sup> Polyethylenimin,<sup>[20]</sup> Polynorbonan<sup>[21]</sup> und Polyamindendrimere<sup>[22,23]</sup>). Von besonderem Interesse sind supramolekulare Systeme, die amphiphile Aggregate, meistens Liposome (oder Vesikel) bilden.<sup>[8]</sup> In 18% aller klinischen Studien zur Gentherapie werden momentan synthetische kationische Tenside verwendet, und ihr Anteil steigt von Jahr zu Jahr.<sup>[24]</sup>

Kationische Amphiphile können DNS durch eine Kombination von anziehenden elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den apolaren Kohlenwasserstoffketten zusammenfügen und stabilisieren.<sup>[25]</sup> Die DNS im Aggregat (Lipoplex) ist vor endogenen Nucleasen geschützt, während die hydrophoben Anteile des Aggregats auch den Austritt aus dem Endosom durch Verschmelzung oder Aggregation mit der endosomalen Membran unterstützen können.

Der Austritt aus dem Endosom scheint das größte Hindernis der effektiven Transfektion mithilfe dieser multivalenten, kationischen Vektoren zu sein, da im Allgemeinen nur ein kleiner Teil der komprimierten DNS entweichen kann (der Rest wird im Lysosom zersetzt). Unterschiedliche Methoden zur Förderung des endosomalen Austritts wurden entwickelt, insbesondere die Anwendung zusätzlicher „Helferlipide“ wie Dioleylphosphatidylethanolamin (DOPE),



welches die Morphologie des Lipoplexes im Endosom von vesikulär in invers-hexagonal und somit auch seine Wechselwirkung mit der endosomalen Membran ändern kann. Die Übereinstimmungen dieser Strukturen und einigen der unten beschriebenen Agentien deuten darauf hin, dass die geeignete Verbindung beide Rollen spielen kann, ohne zusätzliche Helferlipide zu benötigen.

## 3. Anwendung von Gemini-Tensiden

Wir haben eine neuartige Klasse von Transfektionsagentien entwickelt, die sowohl den für die Bindung und Zusammenfaltung der DNS benötigten kationischen Charakter als auch die guten oberflächenaktiven Eigenschaften der Gemini-Tenside aufweisen.<sup>[26,27]</sup> Die Grundstruktur (Abbildung 1) besteht aus einem zentralen Spacer mit identischen Paaren langkettiger, hydrophober Enden und kationischer Kopfgruppen, abgeleitet von positiv geladenen  $\alpha$ -Aminosäuren und/oder Amin-verbundenen Kohlenhydraten. Alle drei Substanzen basieren auf natürlichen Metaboliten, um mögliche

Toxizitätsprobleme zu minimalisieren. Das Design ermöglicht eine enorme Bandbreite struktureller Variationen.

Die Grundstruktur bietet mehrere Möglichkeiten zur Nutzung des Chelateffekts,<sup>[28]</sup> durch den mehrfache Bindungswechselwirkungen zu höheren Bindungskonstanten und zu Synergieeffekten der Wechselwirkungen führen, die wesentlich größer als die Summe der einzelnen Bindungswechselwirkungen sind. (Das allgemeine Prinzip ist in vielen verschiedenen Systemen gültig, angefangen bei Metallionenbindungen und intramolekularen Reaktionen bis hin zu antibiotischer Aktivität.<sup>[28,29]</sup>) Unsere prinzipielle Herangehensweise hat sich als erfolgreich erwiesen: Von ungefähr 250 neuen Substanzen mit dem in Abbildung 1 dargestellten Grundgerüst weist die Mehrheit (Abbildung 3) gute bis sehr gute Aktivität in den In-vitro-Transfektionsversuchen auf. Deshalb besteht ein großes Interesse an der Identifizierung der zugrunde liegenden strukturellen, physikochemischen sowie pharmakologischen Faktoren.

### 3.1. Strukturen

Das Gemini-Design (Abbildung 1) führt zu einer fast unbegrenzten Kollektion potenzieller Strukturen, welche extensive Untersuchungen der Strukturaktivität ermöglichen (ca. 20 verschiedene Strukturtypen sind von uns synthetisiert und getestet worden). Hierbei sollen die für die Erlangung optimaler Transfektionsaktivität notwendigen charakteristischen Eigenschaften identifiziert werden. Der zentrale Spacer kann von jedem beliebigen System mit zweifacher Symmetrie abgeleitet werden, oder selbst durch Verknüpfung zweier ausgesuchter Moleküle synthetisiert werden. Um mögliche Toxizitätsprobleme so klein wie möglich zu halten, basieren unsere Strukturen auf natürlich vorkommenden Untereinheiten, sodass sie generell biologisch abbaubar sind (Fettsäuren,  $\alpha$ -Aminosäuren, Lipide und Kohlenhydrate). Systeme auf der Grundlagen von Kohlenhydraten sind besonders interessant für potenzielle Zellangriffe.

Fünf der zwanzig verschiedenen Systeme sind näher untersucht worden (Schema 1): Gemini-Vektor **1** ist von einem Cystein-Dimer,<sup>[30]</sup> **2** von Sperminen, **3** und **5** von einem einfachen symmetrischen Diaminen und **4** von symmetrischen Dicarbonsäuren abgeleitet. In den meisten Fällen bestehen die polaren Kopfgruppen aus Oligopeptiden, die von natürlich vorkommenden  $\alpha$ -Aminosäuren abgeleitet sind, obwohl einige der effektivsten Transfektanten durch Amine verbundene Kohlenhydrat-gestützte Kopfgruppen haben. Die hydrophoben Enden stammen von natürlichen Fettsäuren. Einfache Veränderungen in der Verbindungsart führen zu zwei oder mehreren Struktur-Reihen in Abhängigkeit vom jeweiligen Spacer. Diese können durch Einbeziehung von Verzweigungen vervielfältigt werden, beispielsweise auf der Basis von  $\alpha$ -Aminosäuren wie Lysin mit funktionellen Gruppen in der Seitenkette. Zukünftige

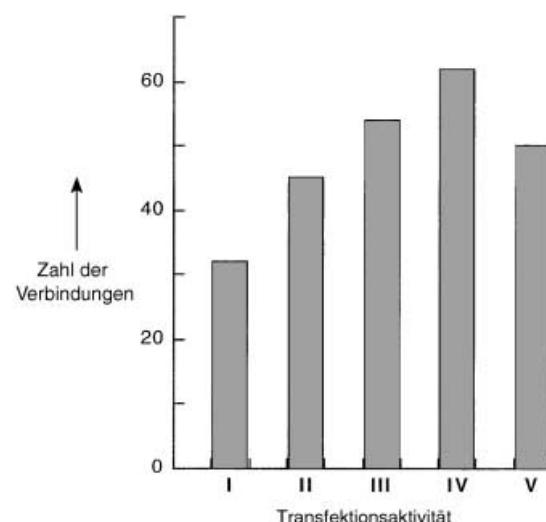
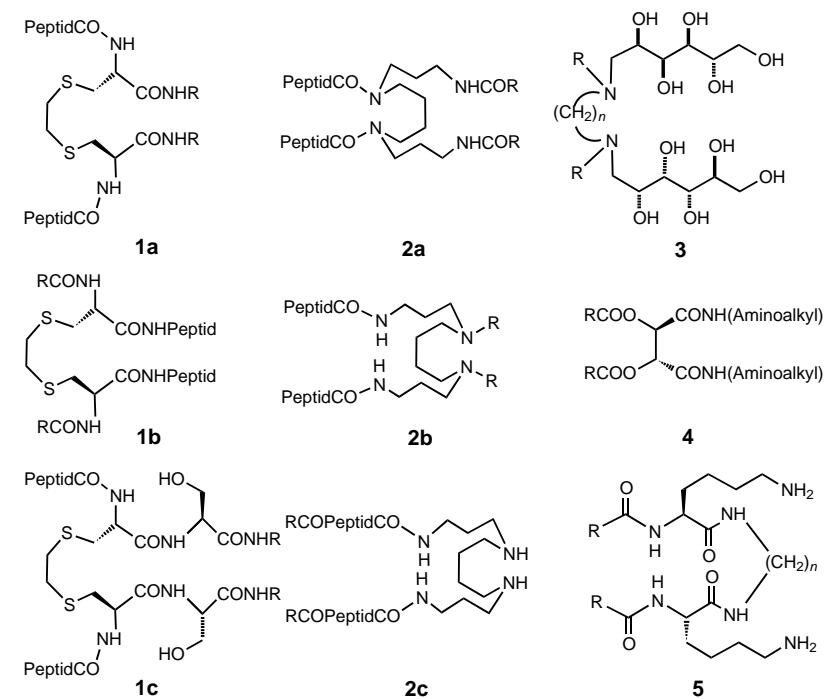


Abbildung 3. In-vitro-Transfektionsaktivitäten aller hier vorgestellten Substanzen. Die Aktivitäten sind in breite Bereiche eingeteilt, von I (niedrig) bis V (sehr gut): Einzelheiten siehe Text.



Schema 1. Struktureller Aufbau der Hauptklassen der Gemini-Tenside mit ausgezeichneten Gentransfektionseffektivitäten. Im Allgemeinen repräsentiert R eine lange Kohlenwasserstoffkette ( $C_{12}$ – $C_{18}$ ), in einigen Fällen auch ein Steroid. Verbindung 3 hat eine reduzierte Glucose-Kopfgruppe: Varianten, bei denen zwei Methylengruppen im Spacer durch zwei Sauerstoffatome ersetzt sind, zeigen eine besonders hohe Gentransfereffizienz.

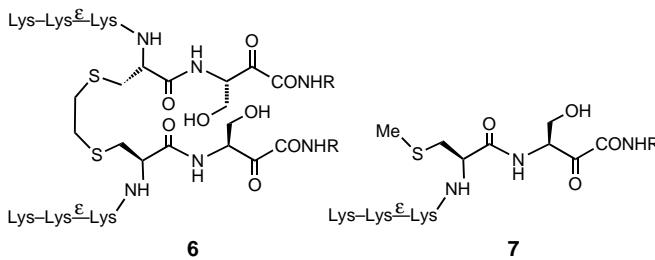
Entwicklungen beinhalten den Gebrauch von Kopfgruppen oder Spacern, die so angelegt sind, dass sie selektiv an die Rezeptoren der Zelloberfläche binden, sowie die Änderung von Strukturcharakteristika zur Steuerung der Freisetzung des Gemini-DNS-Komplexes aus dem aus der Endozytose hervorgehenden Endosom.

### 3.2. Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

Der Weg eines Gens von außen in den Zellkern einer bestimmten Zelle hängt von so vielen Variablen ab, dass einfache Beziehungen zwischen Transfektionseffektivität und Vektorstruktur nicht vorhergesehen werden können. Im Allgemeinen werden bei experimentellen Forschungen einfache Systeme bevorzugt. Es wird *in vitro* mit Zellarten, welche leicht zu transzidieren sind, und mit genetischer Kodierung von nicht natürlichen und damit direkt zu erkennenden Proteinen gearbeitet. Die unter diesen Bedingungen effektivsten Vektoren können dann mit anderen Systemen getestet werden: Die Vielversprechendsten schaffen den Sprung in die *In-vivo*-Testreihe. Die effektivsten *In-vitro*-Vektoren der in Schema 1 zusammengefassten Gemini-Strukturen haben gerade das *In-vivo*-Stadium erreicht.

Um eine wirksame Messung der Transfektionseffektivität durchführen zu können, wurde von uns ein Assay auf einer 96er-Titerplatte mit einem Luciferase-Reportergen entwickelt.<sup>[31]</sup> Dieser Versuchsaufbau ist sowohl einfach als auch empfindlich; nichttransfizierte tierische Zellen geben hierbei kein Signal. Es können fünf breit gefasste Transfektionsgrade unterschieden werden, von Grad I (keine Aktivität) bis zu Grad V (sehr aktiv). (Die beschriebene Aktivität beruht bei jeder Substanz auf mindestens acht parallelen Durchläufen. Unsere biologischen Systeme sind schlechter reproduzierbar als solche, die physikalisch arbeitenden Wissenschaftlern bekannter sind. Die von unseren Gemini-Tensiden gelieferten Aktivitätsvergleiche in plasmider DNS basieren nach Abwägung auf dieser groben Einteilung.) Um die Resultate mit Laboratorien, welche Vektoren anderer Typen verwenden, korrekt vergleichen zu können, führen wir routinemäßig ein Kontrollexperiment mit dem kommerziellen, nichtviralen Transfektionsagens Lipofectamine 2000<sup>®</sup> parallel durch. Dieses Agens ist bei unseren Experimenten in der Mitte des fünften Aktivitätsgrads der Transfektion einzuordnen.

Der herausragendste Effekt ist die erhebliche Aktivitätszunahme, welche auf die gesamte Gemini-Tensid-Struktur zurückzuführen ist. Systeme wie **6** mit Oligolysin-Kopfgruppen mit einer oder mehreren  $\epsilon$ -Verbindungen (im Gegensatz zu den natürlichen Peptid- $\alpha$ -Verbindungen) gehören zu den aktivsten Transfektionsagentien ihres Typs (Schema 2, R = Oleyl). Nahezu keine Aktivität zeigt das Tensidmonomer **7**. Ähnlich ist es bei **6** (R = Methyl); diese Substanz ist durch die fehlende lange aliphatische Kette nicht amphiphil. Anzumerken ist, dass bei allen drei Substanzen die hydrophobe Kette über ein Serinrest gebunden ist. Die wirksame Verlängerung dieses Spacers wurde empirisch bei dem Versuch entdeckt, die



Schema 2. Formeln der Verbindungen **6** und **7**. R wie in Schema 1.

Transfektionsaktivität zu erhöhen. In den meisten, jedoch nicht allen Fällen, weisen jene Gemini-Reihen mit dem Oleylrest die höchste Aktivität auf.<sup>[32]</sup>

Das größte Spektrum für Strukturänderungen gibt es bei den polaren Kopfgruppen (Schema 1). Von besonderem Interesse sind dabei Sequenzen aus Oligopeptiden, die den nuclearen Lokalisationssignalen (NLS) entsprechen und so die Möglichkeit bieten, viel größere Moleküle durch Zellkernmembranen zu transportieren.<sup>[33]</sup> Die typischen NLS-Sequenzen haben unserer Erfahrung nach keine Vorteile gegenüber den besten, kürzeren Peptidsequenzen in unseren Systemen **2**. Daraus ist zu schließen – zumindest für die getesteten Systeme –, dass die Lipoplexe, welche am Anfang des Entwicklungsprozesses beteiligt sind (Abbildung 2), schon dissoziiert sind ehe die DNS (vermutlich selbstständig) die Zellkernmembran durchdringt.

Wir konnten eine weitere, eindeutige Korrelation in der auf Cystein basierenden Reihe **1a** feststellen, wenn die hydrophobe Kette R = Oleyl ist und die Peptid-Kopfgruppe variiert wird. Als allgemeine Regel gilt, dass als basische  $\alpha$ -Aminosäure bevorzugt Lysin gegenüber Histidin und Arginin auftritt. Ebenso hat die Verwendung von Einheiten, die länger sind als Tetrapeptide, keine Vorteile. Drei Lysineinheiten können auf fünf verschiedene Arten an eine Aminosäure gekoppelt werden. Wir konnten eine starke Abhängigkeit von dem Wesen der Verbindung und folglich der Verteilung der positiven Ladung entlang der Trilysinkette feststellen (Abbildung 4).

Es sollte hervorgehoben werden, dass solche gut definierten Korrelationen eher die Ausnahme als die Regel sind, selbst im Vergleich mit ähnlichen Strukturen. Ausgewählte Strukturen aus allen Hauptklassen der Gemini-Tenside (Schema 1) unterstützen die Transfektion effektiv, doch eine große Bandbreite von Aktivitäten findet sich in allen Hauptklassen (Abbildung 3). Kleine Veränderungen in der Struktur können offensichtlich großen Einfluss auf die biologische Aktivität nehmen. Substanz **8**, auf der Grundlage von

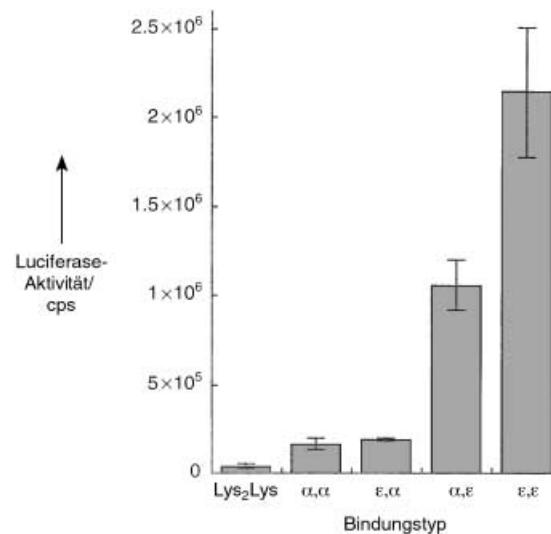
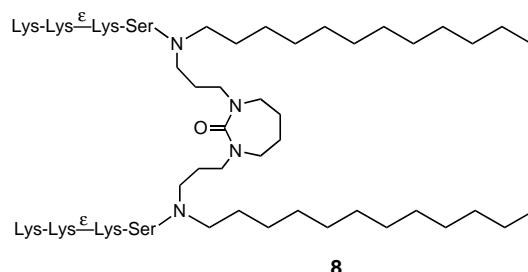


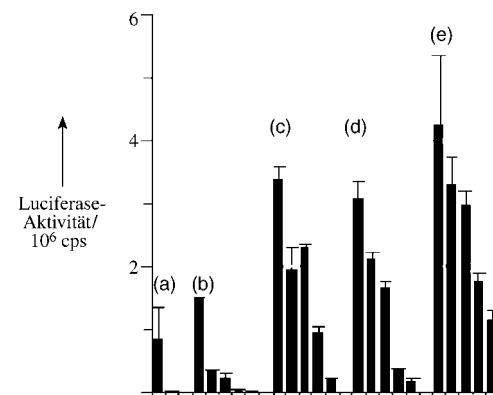
Abbildung 4. Effekt der Variation der Trilysinverknüpfung; Daten von Substanzen (z. B. **6**) mit Oleyl-Seitenketten (C<sub>18</sub>). cps = Signale pro Sekunde.



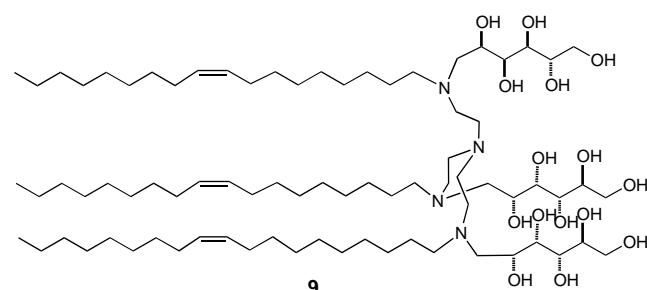
Cyclopermin mit der Kopfgruppe Lys-Lys- $\epsilon$ -Lys-Ser, also mit einer  $\epsilon$ -Verknüpfung der beiden inneren Lysineinheiten, ist eine der aktivsten Gemini-Transfektanten, wohingegen die entsprechende Struktur mit zwei  $\epsilon$ -verknüpften Lysinen (die optimale Kombination in den Systemen **1a**, wie in Abbildung 4 angedeutet) zu den schwächsten zählt. Ähnlich verhält es sich bei Substanz **5** ( $\text{RCO} = \text{Oleyl}$ ,  $n = 6$ ) mit Hexamethylenediamin als Spacer. **5** hat eine hohe Transfektionsaktivität, wohingegen die gleiche Grundstruktur mit einer gesättigten 18-gliedrigen Kette inaktiv ist. Die allgemein (aber nicht veränderbaren) besseren Eigenschaften der Oleylreste verleihen dem sonst inaktiven System mit  $n = 4$  eine gute Aktivität (Klasse IV). Anzumerken ist, dass die Oleylketten in natürlichen, handelsüblichen Aminen und Alkoholen eine Mischung aus Isomeren mit einem *cis/trans*-Verhältnis von etwa 80:20 sind. Wir synthetisierten die Verbindungen **1a** ( $\text{R} = \text{Oleyl}$ , Peptid =  $\epsilon$ -verknüpftes Trilysyl), das auf den effektivsten Transfektionsagentien beruht, mit ausschließlich *cis*- oder *trans*-ständigen Doppelbindungen. Wir konnten keinen bemerkenswerten Unterschied in der Aktivität gegenüber verschiedenen Isomerengemischen nachweisen.

Die nicht überraschende, aber auch nicht hilfreiche Erklärung lautet wie folgt: Die komplexen Untersuchungsreihen einer Transfektion beziehen vielfältige Wechselwirkungen ein, welche von den einzigartigen Kombinationseffekten von Kopfgruppe, Spacer und hydrophobem Ende eines bestimmten Vektors abhängen. Klar definierte Verhältnisse zwischen Struktur und Aktivität sind im Allgemeinen nicht zu erwarten, außer eventuell in jenen Reihen, die nur minimale Veränderungen in einem einzigen Strukturparameter aufweisen. Von den verschiedenen Klassen der Gemini-Tenside, die in Schema 1 zusammengefasst sind, zeigten jene der Strukturen **3** mit den Kohlenhydrat-Kopfgruppen die beste Aktivität, d.h., eine Vielzahl dieser Substanzen wies eine sehr hohe Aktivität und der Rest zumindest noch eine geringe Aktivität auf (Abbildung 5). Hohe Aktivität konnte jedoch auch in einigen anderen an den Tests beteiligten Reihen nachgewiesen werden.

Da Gemini-Tenside allgemein wesentlich effizientere Transfektionsagenzien sind als die entsprechenden monomeren Strukturen, ist die Schlüsselfrage nach einer möglichen Verbesserung ihrer Effektivität durch die Erhöhung der strukturellen Multiplizität zu stellen. Wir haben keine allumfassende Antwort auf diese Frage, aber Tests an zwei Substanzen, die auf der verlässlichsten Kohlenhydratstruktur **3** basieren, fielen entschieden negativ aus. Beide Substanzen, **9** und das korrespondierende System mit gesättigten  $\text{C}_{16}$ -Ketten, zeigten keine signifikanten Transfektionsaktivität.



**Abbildung 5.** Transfektionseffektivitäten (für Luciferase-Expression in CHO-Zellen) einer Reihe kationischer Gemini-Tensid-Vektoren im Vergleich mit Lipofectamine 2000 (a). Die getesteten Tenside waren Glycosylderivat **3** mit  $n = 6$  (b) sowie mit einem  $(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2$ -Spacer anstelle von  $(\text{CH}_2)_6$  (c). Die Resultate der entsprechenden Mannosylderivate werden durch (d) und (e) dargestellt. Gemini-Tensid-Konzentrationen: jeweils 4, 8, 10, 20 und  $30 \mu\text{M}$ ; cps = Signale pro Sekunde.

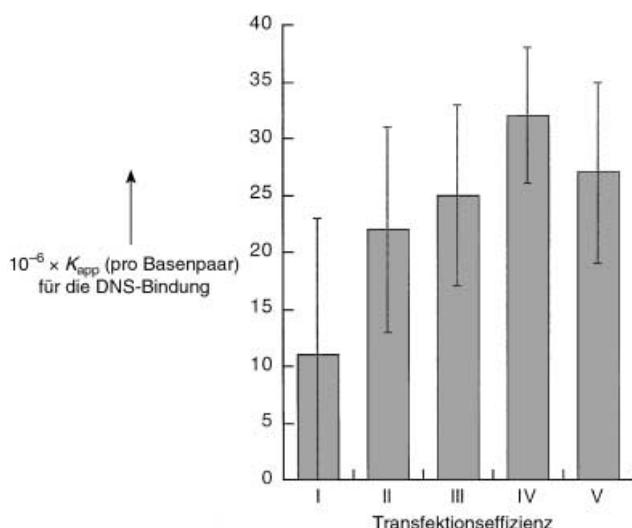


#### 4. Struktur des Lipoplexes

Von den an der Transfektion beteiligten komplexen Reihen von nicht kovalenten Wechselwirkungen kann nur die erste, nämlich die Bildung des Lipoplexes direkt untersucht werden. Wir können die Stärke der DNS-Bindung messen, und die Strukturen der von dem Tensid geformten Aggregate in Gegenwart sowie Abwesenheit der DNS untersuchen. Anschließend wird versucht, diese Information mit dem Transfektionsprozess zu verbinden und die Ergebnisse anschließend für das Design besserer Vektoren zu verwenden.

##### 4.1. DNS-Bindung und Transfektionsaktivität

Wir wissen, dass die Effektivität von Transfektionen üblicherweise keine einfache Abhängigkeit von der Bindungsstärke zwischen DNS und Amphiphil zeigt. Der anfängliche Bindungsvorgang muss stark genug sein, um den Lipoplex schnell zu bilden und die folgenden Schritte durch die verschiedenen Lösungen und Membranen zu überleben. Zudem muss er vermutlich bei oder nach dem Austritt aus



**Abbildung 6.** Beziehung zwischen Transfektionseffektivität und Stärke der DNS-Bindung für 46 Gemini-Tenside mit der allgemeinen Strukturformel 1.

dem Endosom effektiv dissoziieren. Somit darf die Bindung nicht zu stark sein. Eine Messreihe mit 46 Verbindungen mit der allgemeinen Struktur **1** (Schema 1) ergab Resultate, die diese Annahmen bestätigen (Abbildung 6). Die Bindungskonstanten mit dem Faktor  $10^7$  pro Basenpaar sind offensichtlich für weniger wirksame Vektoren niedriger als für wirksame Vektoren. Diese Korrelation von Effizienzverstärkung mit den Werten der Bindungskonstanten gilt nicht für die effizientesten Transfektanten, was mit der Vorstellung eines optimalen Bindungsgrads übereinstimmt.<sup>[34]</sup>

#### 4.2. Aggregationszustände

Zur Vervollständigung der Synthesebemühungen und der Transfektionsuntersuchungen wurde das Aggregationsverhalten ausgesuchter Tenside mit physikalischen und rechnerischen Methoden untersucht. Obwohl Gemini-Tenside unterhalb typischer Aggregationskonzentrationen Transfektionsaktiv sind, muss ihr Aggregationsverhalten zumindest indirekt für die Lipoplexbildung relevant sein. Das mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersuchte Aggregationsverhalten zeigte generell keine offensichtliche Korrelation mit der Transfektionseffektivität. Eine interessante Ausnahme bildet eine Reihe von Verbindungen mit der allgemeinen Struktur **1c** (Schema 1). Die gesättigten Enden ( $R = \text{Dodecyl}$ ) dieser Substanzen sind durch einen Serinrest mit dem auf Cystein basierenden Spacer verbunden; die kurzen Kopfgruppen bestehen aus ein bis drei basischen  $\alpha$ -Aminosäuren. Fünf Verbindungen mit dieser Struktur konnten DNS gut binden, aber die beiden Substanzen mit einzelnen  $\alpha$ -Aminosäuren als Kopfgruppe waren schlechte Transfektanten. Anders als die drei hoch aktiven Verbindungen mit den Di- oder Tripeptid-Kopfgruppen bilden diese beiden bei

der Absorption aus Wasser auf das Kohlenstoff/Formvarbeschichtete Netz charakteristische Fibrillenaggregate.<sup>[35]</sup> Typisch verhalten sich hingegen die auf Weinsäure basierenden Gemini-Transfektanten **4** mit durchschnittlicher Transfektionseffektivität. Sie bildeten entweder verschiedene kurze Bänder, welche zum Verdrillen neigen, oder überhaupt keine Aggregate.<sup>[27]</sup>

Eine Circulardichroismus(CD)-Titration mit  $\lambda$ -Phagen-DNS zeigte für die gleiche Reihe von Verbindungen (**4**), dass die Gemini-Tensid/DNS-Stöchiometrie im Lipoplex durch die Ladungskomplementarität bestimmt ist.<sup>[31]</sup> Eine detaillierte CD-Untersuchung lässt schließen, dass die unmittelbare Hydrathülle um die Phosphatgruppen der Grundstruktur bei der Komplexierung nicht bemerkenswert verändert wird.<sup>[27]</sup> Leitfähigkeitsuntersuchungen zeigten, dass einige dieser Substanzen sehr kleine kritische Aggregationskonzentrationen haben ( $0.24 \text{ mol m}^{-3}$  oder noch kleiner).<sup>[36]</sup> Die Zusammenfügung von DNS mithilfe kationischer Gemini-Tenside (oder beliebigen anderen kationischen Tensiden) beruht vermutlich auf einer anfänglichen Interaktion eines kleinen Clusters von Tensidmolekülen mit DNS (besonders bei Substanzen mit einfach geladenen Kopfgruppen). Durch weitere Wechselwirkungen, nun verstärkt durch den vereinigten (Chelat)effekt elektrostatischer und hydrophober Anziehung, wird die Zusammenfügung vorangetrieben. Dieser Prozess ist abhängig von einigen ähnlichen Faktoren wie die Selbstassoziation und sollte darum bei einer kleinen kritischen Aggregationskonzentration bevorzugt werden.

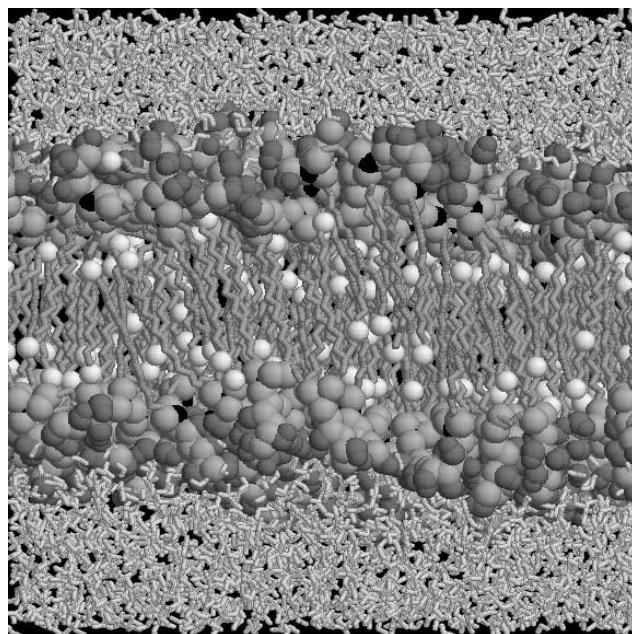
Die Wechselwirkung einer Reihe kationischer Gemini-Tenside mit bakteriophager T4-DNS wurde durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht.<sup>[36]</sup> Nach der Zugabe des Tensids ändert die DNS ihre Konfiguration: aus der ungeordneten Knäuelkonfiguration bilden sich Kugelchen. Beide Formen koexistieren intermediär. Das Verhalten des DNS-Gemini-Tensid-Systems zu einem bestimmten Zeitpunkt hängt ab von der Spacerlänge, der Valenz, der Kopfgruppengröße und der Schwanzlänge. Eine Reihe von einfachen Alkandiy- $\alpha,\omega$ -bis(dimethylalkylammoniumbromid)-Gemini-Tensiden ( $\text{Me}_2\text{N}(\text{CH}_2)_{12}\text{NH}(\text{CH}_2)_s(\text{CH}_2)_{12}\text{NMe}_2$ , [12- $s$ -12]) mit festen Schwanzlängen und variablen Spacerlängen zeigte bei  $s = 6$  wegen der Konkurrenz zwischen Entropieverlust und Enthalpiegewinn ein Minimum an Kompaktionseffizienz. Dieses Minimum entspricht nahezu einem Maximum ( $s = 5$ ) der kritischen Micellisierungskonzentration. Das Gemini-Äquivalent [12-3-12] konnte die DNS effizienter zusammenfügen als das einschwänzige zweiwertige Tensid [12-3-1]. Eine Reihe von Gemini-Tensiden **5** auf der Basis kationischer Peptide mit  $\alpha,\omega$ -Diaminoalkylspacern verhielt sich bei veränderter Spacerlänge ähnlich. Zusätzlich zeigten zwei auf Weinsäurediastereomeren basierende Tenside **4** mit Hexadecansäureresten sowie  $\alpha,\omega$ -Diaminopropyl- und insbesondere Spermidin-Kopfgruppen Effekte der Kopfgruppengrößen, die hauptsächlich auf Entropieeffekten beruhten.<sup>[36]</sup>

Die ausführlichen Untersuchungen konzentrierten sich auf Gemini-Tensid **3** ( $R = \text{Oleyl}$ ,  $n = 6$ ), wegen seiner relativ einfachen Molekülstruktur und seiner guten Transfektionsaktivität. Wird der pH-Wert auf  $< 7$  erniedrigt, vollzieht diese Substanz einen Protonen-induzierten Übergang von einem Vesikel zu einer Micelle. Dieses Verhalten wurde mithilfe der

**Tabelle 1:** Molekulare Abmessungen und Packungen, die durch SAXS-Experimente erhalten wurden.

Verbindung (R, Kopfgruppe)	Aktivität	vorhergesagte Länge [Å] <sup>[a]</sup>	best. Zuordnung/ freies Tensid	best. Zuordnung/ Lipoplex
4 ( $C_{15}H_{31}$ , 3-Aminopropyl)	I	24: 29 Å	lam., $d=53$ Å	lam., $d=64-65$ Å
4 ( $C_{15}H_{31}$ , Lysinamid)	III	26: 31 Å	lam., $d=57$ Å	?, $d=61$ Å
5 (Dodecyl, $n=2$ )	I	19: 23 Å	lam., $d=36$ Å	lam., $d=45$ Å
5 (Oleyl, $n=4$ )	IV	25: 30 Å	lam., $d=46$ Å	lam., $d=52-55$ Å
5 (Oleyl, $n=6$ )	V	25: 30 Å	lam., $d=45$ Å	lam., $d=52$ Å
5 (Dodecyl, $n=8$ )	III	25: 30 Å	lam., $d=44$ Å	lam., $d=51-54$ Å
3 ( $R=$ Oleyl, $n=6$ )	IV/V	26: 30 Å	lam., $d=49$ Å	aus. lam., $d=59$ Å
pH = 7.0				kd. lam., $d=57$ Å
pH = 6.5				kd. lam., $d=55$ Å
pH = 5.5				hex., $a=58$ Å

[a] Anzahl von Atomen: veranschlagte Maximallänge des Moleküls in seiner ausgedehnten Konformation. lam. = lamellar; aus. = ausgedehnt; kd. = kondensiert; hex. = hexagonal;  $d$  = Abstand der Lamellen;  $a$  = Abstand der hexagonalen oder säulenförmigen Anordnung; SAXS = Röntgen-Kleinwinkelstreuung.



**Abbildung 7:** Moleküldynamik-Simulation für das neutrale Gemini-Tensid 3 ( $R=$ Oleyl,  $n=6$ ) in Wasser.

Self-Consistent-Field(SCF)-Theorie näher untersucht und konnte mit signifikanter Protonierung der beiden Aminzentren in Verbindung mit der flexiblen Kohlenhydrat-Kopfgruppe erklärt werden.<sup>[37]</sup> Eine Moleküldynamik-Simulation auf hohem Niveau für das neutrale Tensid (Abbildung 7) wies eine 46 Å dicke Doppelschicht mit bemerkenswerter Verzahnung der Alkylketten auf. Die Dimension der Doppelschicht sowie der Grad der Verzahnung sind identisch mit jenen, die mit Röntgen-Kleinwinkelstreuung (SAXS) erhalten wurden (Abschnitt 4.3).<sup>[37]</sup>

Die Morphologie der Aggregate, die von den Substanzen der allgemeinen Struktur 5 gebildet werden, und deren Komplexe mit  $\lambda$ -Phagen-DNS sind zusätzlich durch Transmission- und Kryo-Rasterelektronenmikroskopie (TEM und Kryo-SEM) untersucht worden.

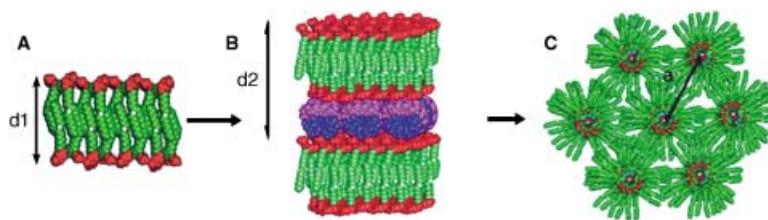
### 4.3. SAXS-Untersuchungen ausgewählter Gemini-Tenside und Lipoplexe

Ausgewählte Gemini-Tenside wurden in Form von konzentrierten Dispersionen und als Lipoplex, gebildet mit Lachssperma-DNS,<sup>[\*]</sup> untersucht.<sup>[38]</sup> Alle untersuchten Dispersionen zeigten zumindest eine gewisse Fernordnung, die sich bei der Addition von DNS veränderte, obwohl die Diffraktionssignale oft breit waren. Diffraktionssignale höherer Ordnung wurden in einigen Fällen beobachtet. Durch Diffraktionssignale höherer Ordnung und/oder durch Korrelation der Dimension ausgedehnter Molekülstrukturen, erhalten aus Molecular Modeling mit dem Programm Quanta/Charm oder durch Schätzen aus Kalotten-Modellen, wurden Packungszuordnungen getroffen. Ausgewählte Ergebnisse sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Die Resultate der meisten auf Weinsäuren und Lysin basierenden Tenside gehen mit lamellaren, durch DNS-Bindung vergrößerten Packungen einher. Bei einer detaillierten Untersuchung der aktivsten Substanz dieses Struktur-Typs (**5**,  $RCO=$ Oleyl,  $n=6$ ) konnte der temperaturabhängige Übergang zwischen ausgedehnten und kondensierten lamellaren Phasen gezeigt werden.

Die Struktur des Lipoplexes, des aus der DNS und dem Kohlenhydrat-gestützten kationischen Gemini-Tensid **3** ( $R=$ Oleyl,  $n=6$ ) gebildet wird und eine ausgezeichnete Transfektionseffektivität hat, wurde bei verschiedenen pH-Werten im Bereich von 8.8–3.0 mithilfe der SAXS und Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM) untersucht. Einzigartig war das Auftreten dreier genau definierter Morphologien des Lipoplexes bei der pH-Wert-Erniedrigung (Abbildung 8): einer lamellaren Phase (bei pH 8.80–7.97), deren Dimensionen mit den Resultaten der beschriebenen Moleküldynamik-Simulation übereinstimmten,<sup>[37]</sup> einer kondensierten lamellaren Phase (bei pH 7.49–6.00) und einer invers-hexagonalen ( $H_{II}$ ) säulenförmige Phase (bei pH 5.75–

[\*] Diese Experimente zur Röntgen-Kleinwinkelstreuung wurden an der Niederländisch-Belgischen Beamline (DUBBLE) am ESRF in Grenoble, Frankreich, mit finanzieller Unterstützung des Niederländischen Forschungsrats (NWO) durchgeführt.



**Abbildung 8.** Kalotten-Modell von Aggregaten von **3** und DNS auf der Grundlage der durch SAXS/EM-Untersuchungen abgeleiteten Morphologie und Symmetrie: a) freie Vesikel,  $d_1 = 48.7 \text{ \AA}$ ; b) anfängliche lamellare Phase des Lipoplexes,  $d_2 = 59.8 \text{ \AA}$ ; c) säulenförmige  $H_{11}$ -Struktur des Lipoplexes,  $a = 57.8 \text{ \AA}$ . Farbenkodierung: grün: Alkylen, rot: Kohlenhydrat-Kopfgruppen, blau und pink: entgegengesetzte DNS-Stränge.

3.81). Molecular Modeling lässt auf eine Korrelation zwischen den beobachteten Lipoplex-Morphologien und dem physikalisch-chemischen Verhalten sowie auf spezifische strukturbedingte Eigenschaften des Tensids schließen.

Nach diesen Ergebnissen sollen zukünftig Tenside Spacer mit sechs Methylengruppen als einen Schlüsselfaktor enthalten. Weitere Schlüsselfaktoren sind zwei Stickstoffatome, die im physiologischen pH-Bereich protoniert werden können, zwei Alkenylreste und hydrophile Kohlenhydrat-Kopfgruppen. Unter der Annahme, dass der Transfektionsmechanismus durch synthetische kationische Tenside über die Endozytose verläuft, schlagen wir vor, dass die Effektivität der Gemini-Tenside **3** ( $R = \text{Oleyl}$ ,  $n = 6$ ) als Genüberträger mit der zuvor nicht beobachteten pH-abhängigen Bildung der invers-hexagonalen Phase des Lipoplexes im endosomalen pH-Bereich erklärt werden kann. Dieser Morphologiewechsel könnte zu einer Destabilisierung des Endosoms durch Verschmelzung des Lipoplexes mit der endosomalen Membran führen und mit dem Austritt der DNS in das Cytoplasma enden.

Wir nehmen an, dass die Säure-induzierte Morphologieänderung des von **3** ( $R = \text{Oleyl}$ ,  $n = 6$ ) und Lachssperma-DNS geformten Lipoplexes von kondensiert lamellar zu hexagonal durch eine enge Anbindung von meist doppelt protonierten Tensidmolekülen mit den DNS-Phosphatgruppen angetrieben wird. Die nachgewiesene, gleichzeitige Zunahme des pH-Werts kann durch Exposition jener unprotonierten Amingruppen, die anfänglich in den kondensierten Doppelschichten enthalten waren, und anschließende Protonierung erklärt werden. In früheren Untersuchungen dieser Gemini-Tenside<sup>[31,39]</sup> wurde ein Protonen-induzierter Übergang von Vesikeln zu Micellen beschrieben und mit der signifikanten Protonierung des zweiten Aminzentrums erklärt. Dies würde zu einem höheren Maß an Gegenionassoziation und zu erhöhter Hydratation führen und in einer Vergrößerung der Kopfgruppe enden. Demnach ist die Bildung von Micellen gegenüber der Doppelschichtbildung gemäß dem Formstrukturkonzept bevorzugt.<sup>[40]</sup>

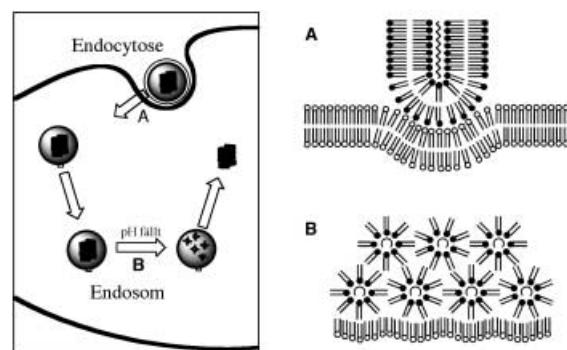
Der hier beobachtete Übergang von einer lamellaren zu einer invers-hexagonalen Phase für den aus **3** ( $R = \text{Oleyl}$ ,  $n = 6$ ) geformten Lipoplex, erfordert eine Verkleinerung der Kopfgruppe. Dies lässt sich logisch mit einer starken Assoziation zwischen den doppelt geladenen Kopfgruppen von **3** ( $R = \text{Oleyl}$ ,  $n = 6$ ) und Phosphatresten der DNS erklären. Es führt zu a) örtlicher Ladungsneutralisation und b) Dehydra-

tation von Phosphat- sowie Kopfgruppe, was in einer wirksamen Abnahme der Kopfgruppengröße resultiert. Der Morphologiewechsel bei pH 5.45 geht mit einem  $pK_a$ -Wert in der Vesikel für **3** ( $R = \text{Oleyl}$ ,  $n = 6$ ) in der Nähe dieses pH-Werts einher. Folglich schlagen wir vor, dass die DNS als Templat für die säulenförmige  $H_{11}$ -Phase anzusehen ist. Dies ist ein Resultat spezifischer Assoziation von Phosphatgruppenpaaren mit doppelt geladenen Gemini-Tensiden im Gegensatz zu der atmosphärischen DNS-Assoziation mit den einfach geladenen Spezies, die in den lamellaren Phasen beobachtet werden. Der Lipoplex von **3** ( $R = C_{18}H_{37}$ ,  $n = 6$ ), das gesättigte Analog zu **3** ( $R = \text{Oleyl}$ ,  $n = 6$ ), vollzieht keinen pH-induzierten Morphologiewechsel. Es zeigt etwas schlechtere, aber dennoch gute Transfektionsaktivität (Klasse IV).

#### 4.4 Austritt aus dem Endosom

Es wurde vorgeschlagen, dass der von synthetischen Tensiden unterstützte DNS-Austritt aus dem Endosom zu mindest in einigen Fällen von der Bildung einer fusogenen, invers-hexagonalen Phase abhängt.<sup>[41]</sup> Diese Phase kann durch die Form des kationischen Tensidmoleküls,<sup>[42]</sup> eines Helferlipids<sup>[43]</sup> oder durch die Wechselwirkung des Lipoplexes mit anionischen Lipiden<sup>[44]</sup> induziert werden. Die pH-induzierte Bildung einer  $H_{11}$ -Phase des Lipoplexes aus **3** ( $R = \text{Oleyl}$ ,  $n = 6$ ) und DNS im endosomalen pH-Bereich, wie sie mit den beschriebenen SAXS- und Kryo-TEM-Untersuchungen nachgewiesen wurde, könnte die Verschmelzung des Lipoplexes mit der endosomalen Membran erleichtern. Die Verschmelzung ist ein wichtiger Schritt auf dem Weg zu Freisetzung der DNS in das Cytoplasma.

Der Nachweis der pH-induzierten und DNS-bestimmten Bildung der hexagonalen Phase des Lipoplexes veranlasste uns, einen detaillierten Mechanismus für die Transfektion durch **3** ( $R = \text{Oleyl}$ ,  $n = 6$ ) vorzuschlagen (Abbildung 9). Der



**Abbildung 9.** Mechanismus-Vorschlag für die Transfektion durch **3** ( $R = \text{Oleyl}$ ,  $n = 6$ ), adaptiert nach Xu und Szoka.<sup>[44a]</sup> Weiße Kopfgruppen stehen für zwitterionische/anionische Membranteile, schwarze für kationische Gemini-Tenside. **A:** Anfang der Endozytose des Lipoplexes an der Zellmembran; **B:** Bildung einer DNS-gestützten fusogenen hexagonalen Phase bei niedrigem pH-Wert, der den Austritt aus dem Endosom ermöglicht. (Die Box ist ein Ausschnitt aus Abbildung 2.)

anfängliche Weg durch die Zellmembranen verläuft vermutlich über eine Endozytose (Abbildung 2).<sup>[44a]</sup>

Es ist außerordentlich bedeutsam für den Transfektionsmechanismus, dass solch fundamentale Morphologieveränderungen des Lipoplexes einfach beim Aufeinandertreffen mit anionischen Membranen auftreten. Trotzdem stellt sich die Frage, warum sie nicht auftreten, wenn der Lipoplex mit der Zelle oder, zumindest anfänglich, mit der endosomalen Membran wechselwirkt. Wir vermuten, dass der auslösende Faktor für den DNS-Austritt aus dem Endosom der allmählich fallende pH-Wert ist, dem diese Organelle nach der Bildung ausgesetzt ist.<sup>[45]</sup> Unsere Entdeckung, dass die  $H_{II}$ -Phase von unverfälschten, kationischen Lipiden einfach durch pH-Wert-Erniedrigung gebildet werden kann, ist für den Transfektionsmechanismus entscheidend, da es eine vernünftige Erklärung liefert, warum der Austritt aus dem Endosom unter diesen Umständen erfolgt.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

1. Mit der Gemini-Tensid-Struktur, wie sie bei einer Vielzahl von Systemen auf der Grundlage kationischer Kopfgruppen vorliegt, ist ein starker Zuwachs an Substanzen zu verzeichnen, die eine ausgezeichnete Transfektionsaktivität bei vielen Zelltypen zeigen. Neuere (unveröffentlichte) Untersuchungen haben die Ausweitung des Transfektionsprozesses auf Oligoribonucleotiden und einige Zelllinien ermöglicht, welche normalerweise nur schwer zu transfizieren sind. Diese Gemini-Tenside sind im Allgemeinen kaum toxisch und haben eine Transfektionseffektivität von mehr als 90%.
2. Diese Substanzen binden stark an die DNS. Es gibt Hinweise, die die logische Schlussfolgerung stützen, dass die Bindungsstärke ein Optimum durchläuft.
3. Es wird angenommen, dass sich die Bindung zur DNS auf große elektrostatische Beiträge stützt. Der Abstand zwischen den beiden  $NH^+$ -Zentren der wirksamsten Transfektanten **3** ( $R = \text{Oleyl}$ ,  $n = 6$ ) und **1a** ( $R = \text{Oleyl}$ , Peptid =  $\epsilon$ -verknüpftes Trilysyl) aus zwei der interessantesten Gemini-Reihen ist mit ungefähr 10 Å sehr ähnlich. Dieser Abstand zwischen den  $NH^+$ -Gruppen ergänzt den Abstand der anionischen Phosphordiestergruppen auf jeder Seite der kleineren DNS-Furche.
4. Die  $\alpha$ - $NH^+$ -Gruppen von **1a** ( $R = \text{Oleyl}$ , Peptid =  $\epsilon$ -verknüpftes Trilysyl) und **3** ( $R = \text{Oleyl}$ ,  $n = 6$ ) haben kleine  $pK_a$ -Werte (etwa 7.5 gegenüber 5.8 und 8.3 in freier Lösung), wesentlich kleinere als jene von  $\epsilon$ - $NH^+$ -Gruppen; Letztere werden bei jedem beliebigen pH-Wert vollständig protoniert.
5. Es wird angenommen, dass der Schlüssel zu der außergewöhnlichen Effizienz von **3** ( $R = \text{Oleyl}$ ,  $n = 6$ ) bei der Gentransfektion auf seiner Fähigkeit beruht, einen lamellaren Lipoplex zu bilden, der bei kritischem pH-Wert im Endosom in die fusogene, invers-hexagonale Phase übergeht. a) Der Abstand der  $NH^+$ -Zentren ermöglicht es der DNS, die Morphologie des Komplexes als fusogene säulenförmige  $H_{II}$ -Phase vorzugeben. b) Das zweite der beiden Aminstickstoffatome in der Kopfgruppe hat in der

Vesikel ein  $pK_a$ -Wert, der etwa dem pH-Wert im Endosom entspricht; die Protonierung dieses Aminstickstoffatoms ruft einen Morphologiewechsel bei einem kritischen pH-Wert hervor. c) Die ungesättigten Alkylketten in **3** reduzieren  $T_c$  ( $T_c$  = die Temperatur, bei der sich die Gelpause in die Flüssigkristallphase umwandelt) auch unterhalb von physiologischen Temperaturen, wodurch die Empfindlichkeit der Aggregate für einen Morphologiewechsel erhöht wird. d) Die hydrophilen Kohlenhydrat-Kopfgruppen erhöhen die Wasserlöslichkeit ohne jedoch die örtlichen Ammoniumphosphat-Wechselwirkungen zu hemmen.

6. Letztlich können Gemini-Tenside auch andere Arten biologischer Aktivität erwarten lassen. Beispielsweise haben viele kationische Tenside bakterizide Eigenschaften, und auch eine Gruppe von Gemini-Tensiden **2a** (Schema 2) auf der Grundlage von Spermin mit Gallensäure als hydrophobem Rest hat sich als sehr effektiv gegen eine Reihe von Bakterienstämmen erwiesen.<sup>[46]</sup>

Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit geben potenzielle Richtlinien für Tensid- und Polymer-Design vor. Sie unterstreichen die Notwendigkeit, die Aufmerksamkeit nicht nur auf die Freisetzung der DNS aus dem Lipoplex (z. B. beim Gebrauch von Tensiden mit chemisch labilen Gruppen) zu richten, sondern auch auf mögliche morphologische Änderungen, die in der Zelle unter kritischen Bedingungen wie einer pH-Wert-Änderung ablaufen. Natürlich handelt es sich hier um komplexe Systeme, doch werden möglicherweise aus der Arbeit mit einfachen Modellen *in vitro* Regeln abzuleiten sein. Diese Überzeugung ist weit verbreitet, wie Hunderte von jährlich erscheinenden Patenten zeigen, die die Anwendung kationischer Liposomen zur Gentransfektion beschreiben. Viele dieser Arbeiten befassen sich nur mit dem Anfang der Geschichte, da Beziehungen zwischen der Struktur und der Aktivität *in vivo* und *in vitro* nicht unbedingt gleich sind.<sup>[41c]</sup>

*Diese Arbeit ist ein Beitrag des Europäischen Netzwerks für Gemini-Tenside und wurde unterstützt von der Europäischen Kommission als Teil ihres Programms für Ausbildung und Mobilität von Forschern (TMR-Programm).*

Eingegangen am 18. September 2002 [M1597]

- 
- [1] ENGEMS – das Europäische Gemini-Tensid-Netzwerk (1997–2001, Internet: [www.ch.cam.ac.uk/misc/ENGEMS/](http://www.ch.cam.ac.uk/misc/ENGEMS/)) – hat Forschungsgruppen aus Großbritannien, den Niederlanden und Schweden unter der Obhut des Rahmenprogramms 4 Training and Mobility of Researchers (TMR) der Europäischen Kommission zusammengeführt. Die hier beschriebenen Substanzen sind patentiert.
  - [2] Der Begriff Gemini wurde 1991 von Menger geprägt, der auch die Chemie dieser bemerkenswerten Substanzen zusammenfasste: F. M. Menger, J. S. Keiper, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 1980–1996; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1906–1920.
  - [3] F. M. Menger, C. A. Littau, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 10083–10090; R. Zana, M. Bennraou, R. Rueff, *Langmuir* **1991**, 7, 1072–1075; R. Zana, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2002**, 97, 205–253; R. Zana, *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, 248, 203–220.

- [4] R. Zana, Y. Talmon, *Nature* **1993**, *362*, 228–230; S. Karaborni, K. Esselink, P. A. J. Hilbers, B. Smit, J. Karthauser, N. M. van Os, R. Zana, *Science* **1994**, *266*, 254–256.
- [5] 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; D. D. Lasic, N. S. Templeton, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1996**, *20*, 221–266.
- [6] J.-P. Behr, *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 382–389.
- [7] J.-Y. Legendre, F. C. J. Szoka, *Pharm. Res.* **1992**, *9*, 1235–1242.
- [8] A. D. Miller, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1862–1880; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1768–1785.
- [9] 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.
- [10] A. D. Miller, *Nature* **1992**, *357*, 455–460.
- [11] E. Marshall, *Science* **1995**, *270*, 1751.
- [12] B. Abdallah, L. Sachs, B. A. Demeneix, *Biol. Cell* **1995**, *85*, 1–7.
- [13] S. Lehrman, *Nature* **1999**, *401*, 517–518.
- [14] H. Pearson, *Nature* **2001**, *413*, 9.
- [15] J. Zabner, A. J. Fasbender, T. Moninger, K. A. Poellinger, M. J. Welsh, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 18997–19007.
- [16] F. L. Graham, A. J. Van der Eb, *Virology* **1973**, *54*, 536–539.
- [17] K. Ohtani, M. Nakamura, S. Saito, K. Nagata, K. Sugamura, Y. Hinuma, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 1589.
- [18] J. P. Lemaitre, B. Bayard, B. Lebleu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 648–652.
- [19] P. L. Felgner, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1990**, *5*, 163–187.
- [20] O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J. P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7297–7301.
- [21] E. Serres, P. Vicendo, E. Perez, T. Noel, I. Rico-Lattes, *Langmuir* **1999**, *15*, 6956–6960.
- [22] J. Haensler, F. C. Szoka, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 372–379.
- [23] J. F. Kukowska-Latallo, A. U. Bielinska, C. Chen, M. Rymaszewski, D. A. Tomalia, J. R. Baker, Jr., in *Self-Assembling Complexes for Gene Delivery: from Laboratory to Clinical Trial* (Hrsg.: A. V. Kabanov, P. L. Felgner, L. W. Seymour), Wiley, New York, **1998**, S. 241–253.
- [24] Y. Barenholz, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2001**, *6*, 66–77.
- [25] D. Matulis, I. Rouzina, V. Bloomfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7331–7342.
- [26] a) K. Jennings, I. Marshall, H. Birrell, A. Edwards, N. Haskins, O. Södermann, A. J. Kirby, P. Camilleri, *Chem. Commun.* **1998**, 1951–1952; b) G. Ronsin, C. Perrin, P. Guedat, A. Kremer, P. Camilleri, A. J. Kirby, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **2001**, 2234–2235.
- [27] P. J. J. A. Buynsters, C. L. García Rodríguez, E. L. Willighagen, N. A. J. M. Sommerdijk, A. Kremer, P. Camilleri, M. C. Feiters, R. J. M. Nolte, B. Zwanenburg, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1397–1406.
- [28] R. Breslow, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1994**, *113*, 493–498; M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908–2953; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754–2794.
- [29] K. C. Nicolaou, R. Hughes, S. Y. Cho, N. Winninger, H. Labischinski, R. Endermann, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3824–3843.
- [30] Zu **1** strukturell verwandte Gemini-Tenside, aus der oxidativen Dimerisierung von Cystein-gestützten Monomeren hergeleitet, wurden von der Straßburger Gruppe wegen ihrer interessanten Transfektionsfähigkeiten beschrieben: E. Dauty, J.-S. Remy, T. Blessing, J.-P. Behr, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9227–9234.
- [31] M. L. Fielden, C. Perrin, A. Kremer, M. Bergsma, M. C. Stuart, P. Camilleri, J. B. F. N. Engberts, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 1269–1279.
- [32] C. McGregor, C. Perrin, M. Monck, P. Camilleri, A. J. Kirby, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6215–6220.
- [33] M. A. Zanta, P. Belguise-Valladier, J. P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 91–96.
- [34] C. McGregor, PhD Thesis, University of Cambridge, **2001**.
- [35] K. H. Jennings, I. C. B. Marshall, M. J. Wilkinson, A. Kremer, A. J. Kirby, P. Camilleri, *Langmuir* **2002**, *18*, 2426–2429.
- [36] L. Karlsson, M. C. P. van Eijk, O. Söderman, *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *252*, 290–296.
- [37] M. Johnsson, A. Wagenaar, J. B. F. N. Engberts, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 757–760; M. C. P. van Eijk, M. Bergsma, S.-J. Marrink, *Eur. Phys. J. E* **2002**, *7*, 317–324.
- [38] P. C. Bell, M. Bergsma, I. P. Dolbnya, W. Bras, M. C. Stuart, A. E. Rowan, M. C. Feiters, J. B. F. N. Engberts, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1551–1558.
- [39] M. Bergsma, M. L. Fielden, J. B. F. N. Engberts, *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *243*, 491–495.
- [40] J. N. Israelachvili, S. Marcelja, R. G. Horn, *Q. Rev. Biophys.* **1980**, *13*, 121–200.
- [41] a) H. H. Ellens, D. P. Siegel, D. Alford, P. L. Yeagle, L. Boni, L. J. Lis, P. J. Quinn, J. Bentz, *Biochemistry* **1989**, *28*, 3692–3703; b) D. P. Siegel, R. M. Epan, *Biophys. J.* **1997**, *73*, 3089–3111; c) S. Audouy, D. Hoekstra, *Mol. Membr. Biol.* **2001**, *18*, 129–143; d) V. Oberle, I. Zuhorn, S. Audouy, U. Bakowsky, J. Smisterová, J. B. F. N. Engberts, D. Hoekstra in *Targeting of Drugs* (Hrsg.: G. Gregoriades, B. McCormack), IOS Press, **2000**, S. 146–155.
- [42] J. Smisterová, A. Wagenaar, M. C. A. Stuart, E. Polushkin, G. Ten Brinke, R. Hulst, J. B. F. N. Engberts, D. Hoekstra, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 47615–47622.
- [43] I. Koltover, T. Salditt, J. O. Rädler, C. R. Safinya, *Science* **1998**, *281*, 78–81.
- [44] a) Y. Xu, F. C. Szoka, Jr., *Biochemistry* **1996**, *35*, 5616–5623; b) I. M. Hafez, P. R. Cullis, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *47*, 139–148; c) I. M. Hafez, N. Maurer, P. R. Cullis, *Gene Ther.* **2001**, *8*, 1188–1196.
- [45] B. Tycko, F. R. Maxfield, *Cell* **1982**, *28*, 643–651.
- [46] G. Ronsin, A. J. Kirby, S. Rittenhouse, G. Woodnutt, P. Camilleri, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2002**, 1302–1306.