

SYNTHESE VERZWEIGTER LIPIDE UND GEMINI-LIPIDE
FÜR DIE KATIONISCHE LIPOSOMALE GENTRANSFEKTION

DISSERTATION



zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Dipl. Pharm. Manuela Folz
geboren am 20. August 1981 in Leipzig

1. Gutachter Prof. Dr. B. Dobner
2. Gutachter Prof. Dr. P. Imming
3. Gutachter Prof. Dr. U. Bakowsky

Halle/Saale im Oktober 2012

verteidigt am 18. März 2013

Manuela Folz

Synthese verzweigter Lipide und Gemini-Lipide für die kationische liposomale
Gentransfektion

Dissertation, 2012

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie,

Institutsbereich Pharmazeutische Chemie und Klinische Pharmazie,

Abteilung für Biochemische Pharmazie

131 Seiten, 63 Abbildungen, eine Tabelle

Widmung

Die vorliegende Dissertation widme ich meiner lieben Mutti, die trotz eigener schwieriger Lebensumstände mir stets liebevolle und aufmunternde Ratschläge gegeben hat. Ohne ihre Unterstützung hätte ich diese Arbeit wohl nie vollenden können.

Tausend Dank!

Ich hab Dich unendlich lieb!

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	I
<i>Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole</i>	IV
1 Einleitung und Zielstellung	1
2 Synthetisch-präparative Arbeiten	10
2.1 Synthese α -verzweigter Transfektionslipide.....	13
2.1.1 Aufbau der hydrophoben Einheit	13
2.1.1.1 Darstellung der Dialkylmalonsäurediethylester	13
2.1.1.2 Hydrolyse zu Dialkylmalonsäuren	14
2.1.1.3 Synthese der α -verzweigten Carbonsäuren durch Decarboxylierung der Dialkylmalonsäuren	15
2.1.2 Einführung der Spacer	16
2.1.2.1 Kupplung zum Amid nach Aktivierung zum Säurechlorid.....	16
2.1.2.2 Umsetzung der Tetradecylhexadecansäure mit verschiedenen Aminen unter Verwendung des Kupplungsreagenzes BOP	18
2.1.2.3 Darstellung des 2-Tetradecylhexadecansäure-(2-aminoethyl)amids durch Einsatz von HBTU als Kupplungsreagenz	20
2.1.2.4 Reaktion zwischen Ethylendiamin und 2-Tetradecylhexadecansäure mit T ₃ P	21
2.1.2.5 Amidsynthese durch Einsatz von PyBOP als Kupplungsreagenz.....	22
2.1.3 Reaktionen zur Anknüpfung und Variation der polaren Kopfgruppen.....	24
2.1.3.1 Peptidkupplung mittels Carbodiimid-Methode	24
2.1.3.2 Peptidkupplung mit aktiviertem, BOC-geschütztem Lysin	28
2.2 Synthese der Gemini-Lipide.....	31
2.2.1 Bedeutung der Geministruktur für die Gentransfektion.....	31
2.2.2 Darstellung der Gemini-Lipide mit Alkyl-Linker	32
2.2.2.1 Darstellung der Gemini-Grundstruktur durch verknüpfende Zweit- alkylierung.....	32
2.2.2.2 Verseifung und Decarboxylierung zur Gemini-Dicarbonsäure.....	33
2.2.2.3 Einführung der Spacer.....	34
2.2.2.4 Verknüpfung mit Lysin zur Einführung der polaren Kopfgruppen	36
2.2.3 Darstellung der Gemini-Lipide mit ungesättigtem Linker	37
2.2.3.1 Synthese der Alkylallylmalonester.....	37

2.2.3.2	GRUBBS-Kupplung zur Darstellung der Gemini-Lipid-Struktur mit ungesättigtem Linker	38
2.3	Darstellung des Transfektionslipids mit Azomethinstruktur	39
2.3.1	Veresterung der 2-Tetradecylhexadecansäure	40
2.3.2	Reduktion des 2-Tetradecylhexadecansäuremethylesters zum Alkohol.....	40
2.3.3	Oxidation des 2-Tetradecylhexadecanols.....	41
2.3.4	Darstellung des Azomethins.....	42
3	Transfektionsuntersuchungen.....	44
3.1	Allgemeine Grundlagen des Gentransfers.....	44
3.2	Bestimmung der Transfektionseffizienz und Toxizität am Zellkulturmodell.....	48
4	Physiko-chemische Charakterisierung der Transfektionslipide.....	56
4.1	Ergebnisse der Differentialkalorimetrie	56
4.2	Monoschicht-Experimente	59
5	Zusammenfassung und Ausblick	65
6	Experimentelle Arbeiten	67
6.1	Analysenmethoden	67
6.1.1	Chromatographie	67
6.1.2	Schmelzpunktbestimmung	70
6.1.3	Elementaranalyse (EA)	70
6.1.4	Massenspektrometrie (MS)	70
6.1.5	NMR-Spektroskopie.....	71
6.2	Chemikalien	71
6.2.1	Vorbehandlung der verwendeten Lösungsmittel.....	71
6.2.2	Kommerziell erworbene Chemikalien	72
6.3	Synthesvorschriften	73
6.3.1	Synthese der Ausgangsverbindungen.....	73
6.3.2	Synthese der verzweigten Transfektionslipide.....	77
6.3.2.1	Decarboxylierung der Dialkylmalonsäuren	77
6.3.2.2	Einführung der Spacermoleküle.....	79
6.3.2.3	Einführung der polaren Kopfgruppe	88
6.3.3	Darstellung der Geminitransfektionslipide	109
6.3.3.1	Zweitalkylierung	109
6.3.3.2	Verseifung	110
6.3.3.3	Decarboxylierung	111
6.3.3.4	Einführung der Spacermoleküle.....	112
6.3.3.5	Umsetzung mit der geschützten Aminosäure.....	114
6.3.4	Darstellung des Transfektionslipids mit Azomethinstruktur	116

6.3.4.1	Esterbildung	116
6.4.4.2	Reduktion des 2-Tetradecylhexadecansäuremethylesters	116
6.4.4.3	Oxidation des 2-Tetradecylhexadecanols.....	117
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	119
8	Literaturverzeichnis.....	123

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Arg	Arginin
ber.	berechnet (theoretische Werte für EA)
β-Gal	β-Galactosidase
BAM	Brewster Angle Microscopy / BREWSTERwinkel-Mikroskopie
BCA	Bicinchonsäure
BOC	<i>tert.</i> -Butoxycarbonyl-Schutzgruppe
BOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat
CBZ	Carboxybenzyl-Schutzgruppe
¹³ C-NMR	¹³ Carbon Nuclear Magnetic Resonance (¹³ C-Kernspinresonanz)
δ	Chemische Verschiebung (NMR)
d	Dublett (NMR)
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DC-Chol	3β[<i>N</i> -(<i>N',N'</i> -Dimethylaminoethan)carbamoyl]cholesterol
DEAE	Diethylaminoethyl-Dextran
dest.	destilliert
DMRIE	1,2-Dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxyethylammoniumbromid
DNA	Deoxyribonucleic acid (DNS - Desoxyribonucleinsäure)
DOGS	Dioctadecylamidoglycylspermin
DOPE	Dioleylphosphatidylethanolamin
DOPC	Dioleylphosphatidylcholin
DOSPA	2,3-Dioleilyoxy- <i>N</i> -[2-(spermincarboxyamido)ethyl]- <i>N,N</i> -dimethyl-1-propanammoniumtrifluoroacetat
DOTAP	<i>N</i> -[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]- <i>N,N,N</i> -trimethylammoniumchlorid
DOTMA	<i>N</i> -[1-(2,3-dioleilyoxy)propyl]- <i>N,N,N</i> -trimethylammoniumchlorid
DSC	Differential Scanning Calorimetry (dynamische Differentialkalorimetrie)
E.coli	Escherichia coli
EA	Elementaranalyse
ESI	Electro Spray Ionisation (Elektrospray-Ionisation)
GC	Gaschromatographie

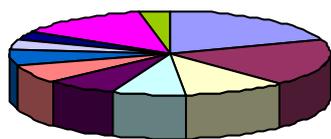
gef.	gefunden (gemessene Werte für EA)
ges.	gesättigt
GIXD	Grazing Incidence X-Ray-Diffraction
Gly	Glycin
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HMPA	Hexamethylphosphorsäuretriamid
¹ H-NMR	Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance (¹ H-Kernspinresonanz)
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
HSAB	Hard and Soft Acids and Bases (Reaktionsprinzip nach Pearson durch Einteilung der Reaktionskomponenten in harte und weiche Säuren und Basen)
IRRAS	Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie
kDA	Kilodalton
konz.	konzentriert
Leu	Leucin
LM	Laufmittel
Lys	Lysin
m	Multiplett (NMR)
m/z	Massezahl pro Ladung
M	Molare Masse
MesCl	Methansulfonsäurechlorid (Mesylochlord)
Met	Methionin
mp	Schmelztemperatur
MPLC	Middle Pressure Liquid Chromatography (Mitteldruckflüssigchromatographie)
mRNA	messenger Ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
MS	Massenspektrum
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
ONPG	ortho-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
PAMAN	Polyamidoamin
PCC	Pyridiniumchlorochromat
PCS	Photon Correlation Spectroscopy (Photonen-Korrelations-Spektroskopie)

PDC	Pyridiniumdichromat
PDMAEMA	Poly[2-(dimethylamino)ethylmethacrylat]
PEG	Polyethylenglycol
PPI	Poly(propylenimin)
ppm	parts per million
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrilidinophosphoniumhexafluorophosphat
q	Quartett (NMR)
R _f	Retention factor (Retentionsfaktor)
RNA	ribonucleic acid (RNS - Ribonukleinsäure)
s	Singulett (NMR)
SAINT-4	Dioleilmethylpyridiniumchlorid
SC	Säulenchromatographie
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
t	Triplett (NMR)
TBAI	Tetrabutylammoniumiodid
TEA	Triethylamin
T ₃ P	2,4,6-Tripropyl-1,3,5,2,4,6-trioxatriphosphorinan-2,4,6-trioxid
X-Gal	5-Brom-4-chlorindol-3-yl- β -D-galactopyranosid

1 Einleitung und Zielstellung

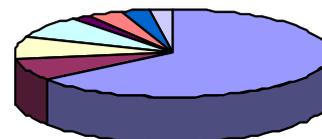
Die Gentherapie, von einigen auch als Therapie des 21. Jahrhunderts bezeichnet, bietet die Möglichkeit genetische und erworbene Krankheiten durch Veränderung oder Manipulation von Genen kausal zu behandeln.¹⁻³ Die eingesetzten nukleinsäurehaltigen Arzneimittel werden entsprechend ihrer therapeutischen Relevanz in Gen-Inhibitoren, Gen-Vakzine und Substitutionsgene unterschieden.⁴ Gen-Inhibitoren sind in der Lage, defekte Gene auf der mRNA-Ebene zu inaktivieren⁵ und somit unter anderem das extreme Wachstum von Tumorzellen zu unterbinden. Die häufig Antigene spezifischer Pathogene enthaltenden Gen-Vakzine können eine zellvermittelte oder humorale Immunantwort und die Antikörperproduktion aktivieren.⁶ Die dritte Therapiemöglichkeit basiert auf der Substitution defekter Gene durch vollständig funktionsfähige DNA-Moleküle, womit die Zelle die Fähigkeit erhält, spezifische körpereigene Proteine zu synthetisieren. Dies ist besonders bedeutend für die Behandlung genetisch bedingter Krankheiten, wie der Immunschwächekrankheit SCID (severe combined immunodeficiency),⁷ Cystische Fibrose,⁸ Hämophilie A und B⁹ oder Phenylketonurie.¹⁰ Der Anteil antitumoraler Therapien innerhalb klinischer Studien zur Gentransfektion liegt indes im Vergleich zur Behandlung monogenetischer Erkrankungen um das achtfache höher.¹¹ In *Abbildung 1* sind die mit Gentherapie behandelten Krankheiten und die eingesetzten Gentypen innerhalb klinischer Studien dargestellt.

Eingesetzte Gentypen in klinischen Gentransfektionsstudien



Antigene	19,7%
Zytokine	18,3%
Tumorsuppression	10,2%
Wachstumsfaktoren	7,5%
Mangel	6,9%
"Selbstmord"	7,0%
Rezeptoren	6,4%
Replikationsinhibitoren	4,3%
Marker	2,9%
andere	13,4%
ohne Angaben	3,0%

Behandelte Krankheiten in klinischen Gentransfektionsstudien



Krebserkrankungen	64,5%
Kardiovaskuläre Krankheiten	8,5%
Infektionskrankheiten	8,0%
monogenetische Erbkrankheiten	8,3%
Neurologische Erkrankungen	1,8%
andere	3,7%
Genmarkierung	2,9%
gesunde Probanden	2,3%

Abb. 1: Erkrankungen und angewandte Gentypen innerhalb klinischer Studien zur Gentransfektion¹¹

Neben Infektionen, die aufgrund von Resistenzentwicklung und mangelnden Therapieoptionen bisher nicht heilbar und nur sehr schwer zu behandeln sind, stehen Neuropathien, wie Morbus Parkinson¹² und Morbus Alzheimer,¹³ sowie kardiovaskuläre¹⁴ und ophthalmologische¹⁵ Erkrankungen im Focus der Forschung.

Da die eingesetzten Nukleinsäuren aufgrund ihrer durch Phosphorsäurereste bedingten negativen Ladung von der Zelloberfläche abgestoßen werden, ist es notwendig ein geeignetes Transportsystem zu verwenden. Idealerweise sollte dieses System stabil, biokompatibel, un-toxisch und kostengünstig sein, sowie die Möglichkeit besitzen, das genetische Material gewebespezifisch zu transportieren.⁴ Generell unterscheidet man die virale und die nicht-virale Gentransfektion. Als virale Trägersysteme, die wie in *Abb.2* dargestellt den Hauptteil an Vektoren innerhalb klinischer Studien bilden, werden hauptsächlich Retro- und Adenoviren, sowie seltener auch Lenti-, Herpes simplex und adenoassoziierte Viren eingesetzt.¹⁶ Die von Natur aus infizierenden Vehikel besitzen die Fähigkeit, ihr eigenes genetisches Material in Wirtszellen einzuschleusen. Diese natürliche Eigenschaft wird für die Gentherapie ausgenutzt, in dem die viruseigenen Gene, die für die Replikationsphase der Virenvermehrung entscheidend sind, durch therapeutische Nukleinsäuresequenzen substituiert werden. Der hocheffizienten und teilweise persistenten viralen Transfektion steht jedoch eine Reihe von schwerwiegenden Nachteilen gegenüber: So besteht neben der Gefahr der Virusrekombination die Möglichkeit der Erzeugung einer starken Immunantwort oder einer Entzündungsreaktion, die als Todesursache eines Patienten innerhalb einer klinischen Studie mit Adenoviren bereits beschrieben wurde.¹⁷ Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die ektopische chromosomale Integration viraler DNA entweder zu einer Unterbrechung der Expression von Tumorsuppressorgenen oder zu einer Aktivierung von Onkogenen^{18,19} und

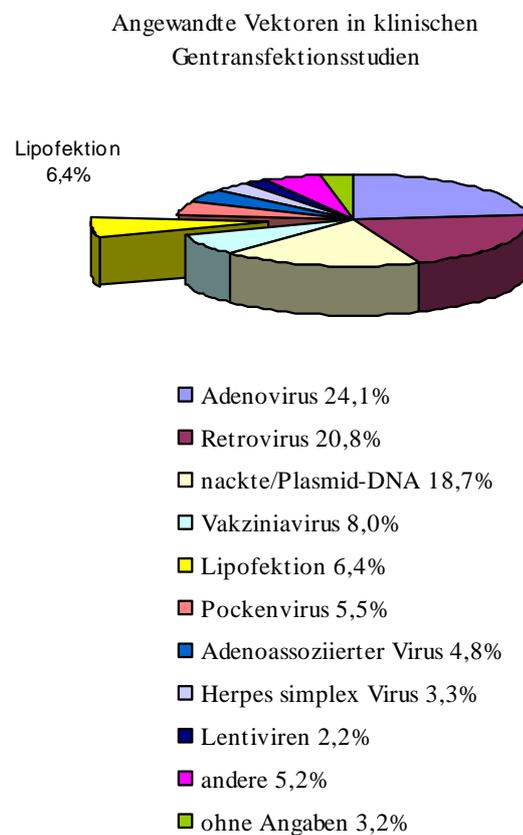


Abb.2: Vektorsysteme innerhalb klinischer Studien zur Gentransfektion,¹¹ Stand März 2011

damit zu einer malignen Zellveränderung führen kann.²⁰ Basierend auf diesen sicherheitsrelevanten Nachteilen viraler Trägersysteme gewinnt der nicht-virale Gentransfer, zu dem neben chemischen auch physikalische Methoden zählen, zunehmend an Bedeutung, obgleich im März 2011 noch etwa zwei Drittel der klinischen Studien mit viralen Genfähren durchgeführt wurden.¹¹ Die nicht-virale Transfektion von Nukleinsäuren erfolgt nicht nur mit verringerter, aber dennoch existierender Immunogenität,²¹ sie ist außerdem leicht reproduzierbar und weniger kostenintensiv. Weiterhin sind nicht-virale Genvektoren in großen Mengen herstellbar und zeichnen sich durch eine hohe Biokompatibilität aus.²²

Die zu den nicht-viralen, physikalischen Techniken zählende Mikroinjektion²³ ist die effizienteste und direkteste Möglichkeit des Gentransfers, da die DNA unter Verwendung von Mikronadeln direkt ins Zytosol oder in den Zellkern gespritzt wird. Der laboratorische Aufwand ist jedoch enorm und die Applikationstechnik aufwendig. Zudem können nur vereinzelte Zellen auf diesem Weg transfiziert werden.^{4,23} Ein sehr effizientes, einfaches, mechanisches Verfahren ist die Bioballistik, bei welcher mittels der "gene gun" DNA-ummantelte Gold- oder Wolframpartikel mit hoher Geschwindigkeit in das jeweilige Zielgewebe geschossen werden. Einerseits durchdringen diese Teilchen auch physikalische Barrieren wie Epidermis und Stratum Corneum, andererseits können zwei oder mehr DNA-Moleküle mit nur einer Anwendung co-transfiziert werden.²⁴⁻²⁶ Nachteilig wirken sich jedoch der Kostenfaktor und der begrenzte Einsatz im Körperinneren aus. Die bereits 1982 beschriebene Elektroporation stellt ebenfalls eine geeignete Transfektionsmethode dar, wobei durch elektrische Impulse hoher Intensität eine transiente, lokalisierte Destabilisierung des Membranpotentials und damit verbunden eine gesteigerte Permeabilität der Membran hervorgerufen wird, infolgedessen die exogene DNA ins Zellinnere gelangt.²⁷⁻²⁹ Ein ähnliches Transportprinzip liegt der Photoporation zugrunde. Hierbei wird die Membran jedoch durch Laserbestrahlung perforiert.^{30,31} Eine bei beiden zuletzt genannten Verfahren vermehrt auftretende Gewebeschädigung kann durch Anwendung von Ultraschallwellen größtenteils vermieden werden. In vitro gelangt die nackte DNA durch die mittels Ultraschall gesteigerte Membranporosität gleichfalls ins Zytosol. Nach der Behandlung können die Schäden jedoch leicht repariert werden, womit sich die Zellviabilität deutlich erhöht. Die Sonoporation in vivo erfolgt durch Bildung und Zerstörung kleiner gelöster Gasbläschen aufgrund akustischer Druckveränderungen und daraufhin gebildeter Membranporen. Dieser als Kavitation bezeichnete Vorgang führt in verschiedenen Geweben ebenfalls zu einer effizienten Gentransfektion.³²⁻³⁴ Die Magnetofektion stellt den Transport komplexierter DNA mit magnetischen

Partikeln innerhalb eines externen Magnetfeldes dar und führt zumindest ex vivo zu hohen Transfektionsraten bei geringer Toxizität.^{35,36} Der hohe apparative und finanzielle Aufwand sowie die unpraktikablen Einsatzmöglichkeiten physikalischer Gentransfermethoden sind jedoch als nachteilig im Bezug auf zukünftige klinische Anwendungen zu betrachten.³⁷

Gegenüber diesen Einschränkungen stellt die chemische Gentransfektion ein vorteilhaftes Verfahren zum Einschleusen von Genen in Zellen und Gewebe dar. Dabei bieten neben der Calciumphosphatpräzipitation die Poly- und Lipofektion geeignete Möglichkeiten für effektives Einbringen von Nukleinsäuren ins Zytosol und den Zellkern.

Der Gentransfer mittels Calciumphosphat, bei dem durch Mischung von Lösungen aus DNA und Calciumionen mit Phosphatpuffer Präzipitate entstehen, die endozytotisch in das Zellinnere und zum Teil selbst in den Zellkern gelangen, ist eine der am häufigsten eingesetzten Methoden zur Transfektion von Neuronen. Die Calciumphosphatpräzipitation ist leicht anzuwenden und verfügt über eine minimale Toxizität. Verglichen mit anderen Verfahren, wie der liposomalen, polysomalen oder viralen Gentransfektion ist jedoch die Effizienz dieser Methode deutlich geringer.^{38,39}

Innerhalb der Klasse der Polymervektoren stellen PLL (Poly(L-Lysin)) und PEI (Polyethylenimin) die Hauptvertreter dar. Bereits 1975 konnte die Fähigkeit des PLL, DNA zu kondensieren, belegt werden.⁴⁰ Im Jahr 1987 wurde der Vektor für die in vitro und in vivo Gentransfektion erstmalig eingesetzt.^{41,42} PEI, welches als lineares und als verzweigtes Polymer Anwendung findet, wurde seit seinem ersten erfolgreichen Gentransfer 1995 zur Verbesserung physikochemischer und biologischer Eigenschaften vielfältig derivatisiert.^{43,44} Weiterhin werden Polymethacrylate, wie PDMAEMA, das Poly[2-(dimethylamino)ethylmethacrylat]⁴⁵ und Polymere mit Kohlenwasserstoff-Grundgerüst, wie Chitosan, dem bekanntesten natürlichen Vektor mit hoher Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit,⁴⁶⁻⁴⁸ zur Polyfektion eingesetzt. Ebenso finden das Diethylaminoethyl-Dextran (DEAE-Dextran), das über Jahrzehnte am häufigsten verwendete Dextran-Polymer,⁴⁹ sowie verschiedene Poly(allylamine)^{50,51}, neben PLL weitere Poly(aminosäuren) und Poly(aminoester), innerhalb der Gentransfektion Verwendung.⁵² Eine Sonderform der Polymervektoren stellen die Dendrimere dar, die sich durch einheitliche molekulare Strukturen und Eigenschaften sowie die Fähigkeit, „Gastmoleküle“ in ihrem Inneren einzuschließen, auszeichnen. Dabei werden insbesondere PAMAN-Dendrimere (Polyamidoamin-Dendrimere)⁵³ und PPI (Poly(propylenimin)-Dendrimere)⁵⁴ als Genvektoren angewendet. In *Abb.3* sind einige der hier beschriebenen Polymere dargestellt.

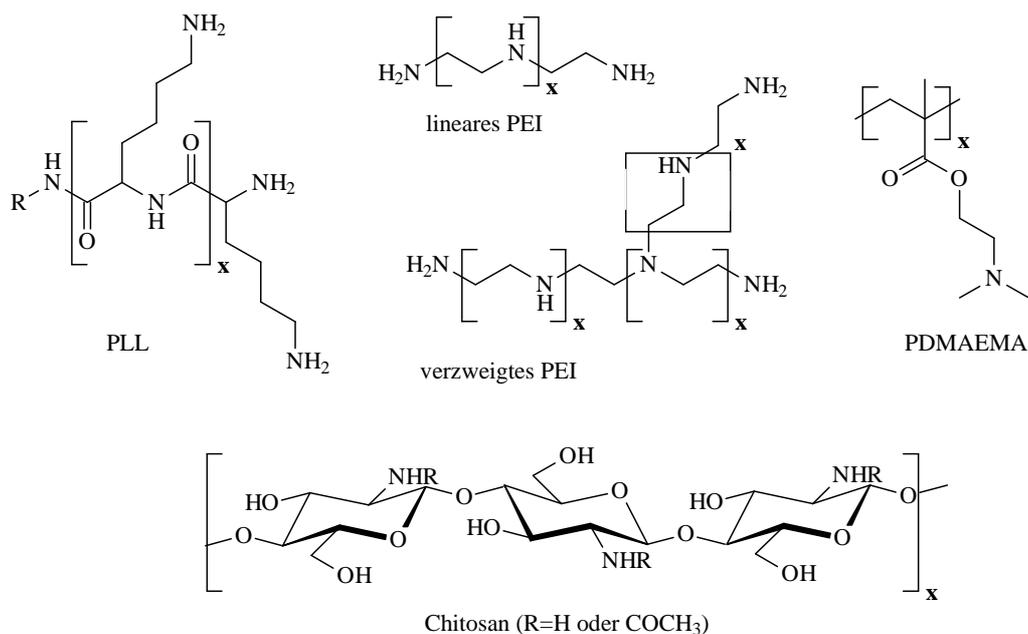


Abb.3: Ausgewählte Polymere für die Gentransfektion⁵²: PLL (Poly(L-Lysin)), PEI (Polyethylenimin), PDMAEMA (Poly[2-(dimethylamino)ethyl-methacrylat]) und Chitosan

Aufgrund der geringeren Toxizität stellen kationische Lipide gegenüber den Polymeren eine geeignete Alternative für die Gentransfektion dar. Dabei werden die Lipide meist in Kombination mit neutralen Helferlipiden zu Liposomen verarbeitet und anschließend durch Komplexierung mit DNA in Lipoplexe umgewandelt.

Kationische Lipide sind amphiphile Moleküle bestehend aus einer polaren Kopfgruppe, die über einen Spacer mit einem hydrophoben Molekülteil verbunden ist.

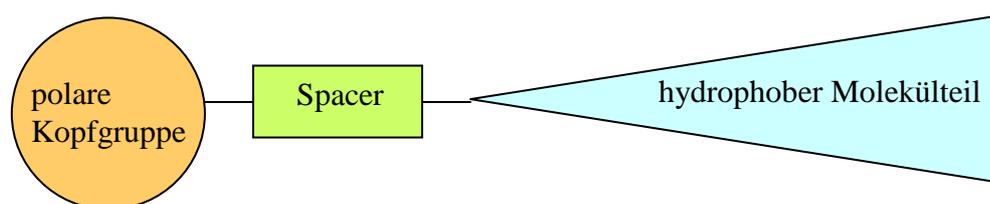


Abb.4: Schematischer Aufbau eines kationischen Transfektionslipids

Der Spacer dient als Bindeglied und Abstandhalter zwischen dem polaren und dem unpolaren Molekülteil der Verbindung und trägt entscheidend zur chemischen Stabilität und Bioabbaubarkeit dieser Verbindung bei. Etherverbindungen, wie im von FELGNER⁵⁵ 1987 erstmalig in Kombination mit dem Helferlipid Dioleylphosphatidylethanolamin (DOPE) zur Gentransfektion angewendeten DOTMA (*N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammoniumchlorid), sind zwar chemisch stabil aber schlecht biologisch abbaubar. Esterverknüpfungen, wie im *N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammoniumchlorid (DOTAP) sind

dagegen gut biologisch abbaubar, aber chemisch nicht sehr stabil.⁵⁶ Carbamat- und Amidbindungen sind sowohl chemisch stabil als auch bioabbaubar und werden demzufolge häufig genutzt. Der hydrophobe Molekülteil, welcher als fusogener Bestandteil die Penetration in die Zelle ermöglicht, besteht vorwiegend aus in Kettenlänge und Sättigungsgrad variierenden Kohlenwasserstoffketten. Verbreitet ist vor allem der Einsatz von Fettsäureketten mit acht bis achtzehn C-Atomen. Einfach ungesättigte Ketten sind dabei vorteilhaft, da aufgrund der Zunahme der Membranfluidität höhere Transfektionsraten erzielt werden können.⁵⁷ Parameter kationischer Kopfgruppen, wie Größe und Ladung, beeinflussen die Transfektions-effizienz jedoch stärker als diejenigen hydrophober Alkylketten.⁵⁸ Der Anzahl positiver Ladungen je Molekül entsprechend werden Transfektionslipide in monovalent (DOTAP, DOTMA, DC-Chol (3 β [N-(N',N'-Dimethylaminoethan)carbamoyl]cholesterol), DMRIE (1,2-Dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxyethylammoniumbromid), SAINT-4 (Dioleilmethylpyridiniumchlorid)) und multivalent (DOSPA (2,3-Dioleyl-oxy-N-[2-(spermincarboxyamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanammoniumtrifluoroacetat), DOGS (Dioctadecylamido-glycylspermin)) eingeteilt (siehe Abb.5).⁵⁹

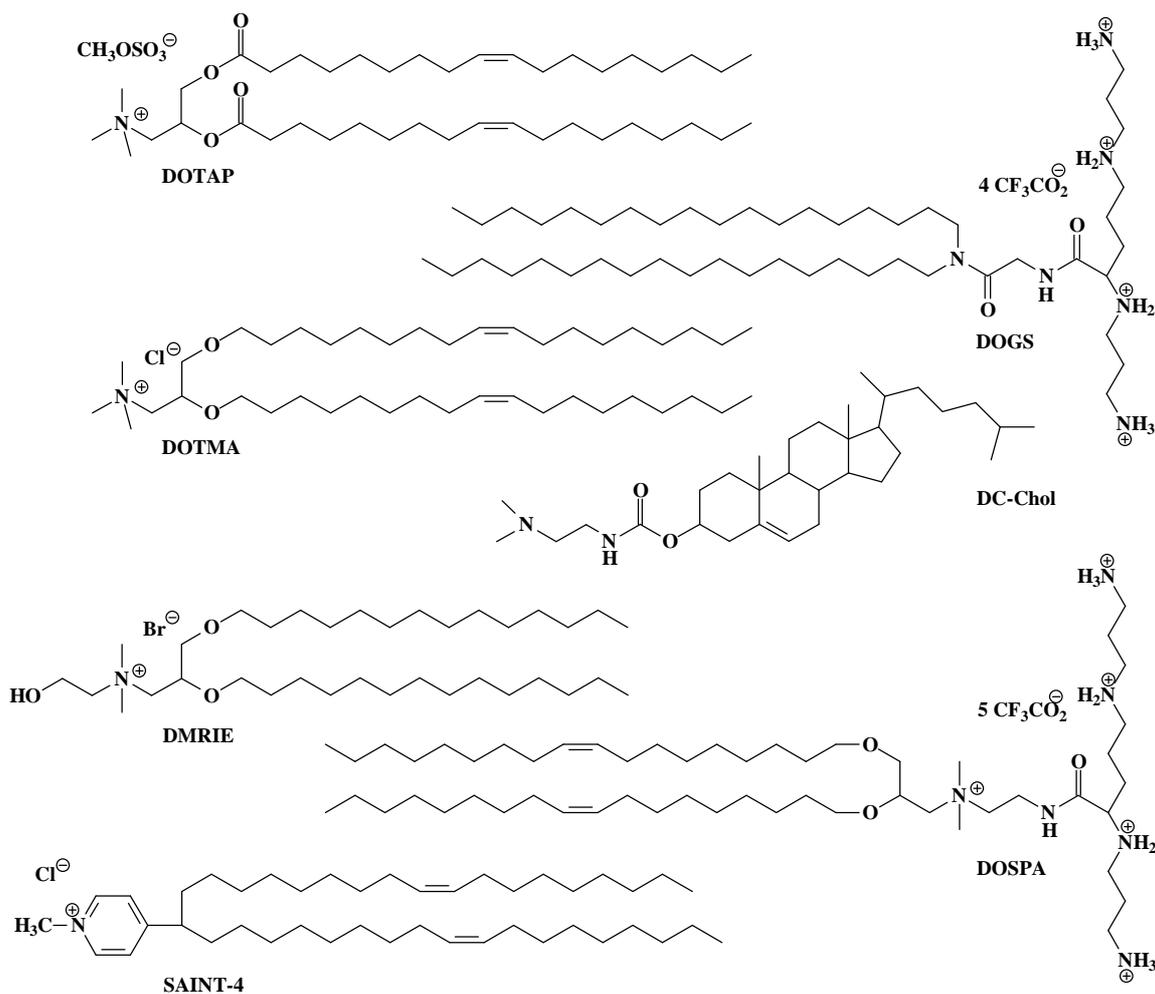


Abb.5: Auswahl kationischer Lipide für die liposomale Gentransfektion⁵⁹

Dabei vermögen Lipopolyamine die DNA nicht nur zu binden, sondern darüber hinaus zu kompaktieren.⁶⁰ Vorwiegend befinden sich die positiven Ladungen an Aminogruppen mit unterschiedlichem Substitutionsgrad, aber auch an Amidin-, Guanidinium- oder Pyridiniumgruppen.⁶¹⁻⁶³

Sonderformen stellen kationische Lipide dar, deren positive Ladungen von Arsenium- oder Phosphoniumgruppen getragen werden, womit signifikant geringere Zytotoxizitäten erreicht werden können.^{57,64} Der Einbau nukleosidischer Kopfgruppen, wie z.B. Uridin, welches aus der Pyrimidinbase Uracil und der Pentose D-Ribose besteht, führt ebenfalls zu einer verminderten Zellschädigung. Eine verbesserte Transfektionsrate konnte damit bisher nicht erreicht werden, da trotz der Möglichkeit, zusätzlicher Wasserstoffbrückenbindungen und Wechselwirkungen überlappender π -Orbitale zwischen dem kationischen Lipid und den Basenpaaren der Nukleinsäure, die DNA schlechter kondensiert wird. Damit ist folglich nicht nur die Anzahl an DNA-Molekülen je Lipoplex geringer, anscheinend werden die Nukleinsäuren zudem vermehrt im Zytoplasma und nur vereinzelt im Zellkern freigesetzt.⁶⁵

Neben den Strukturvariationen zur Reduktion der Zelltoxizität sollen chemische Veränderungen der Transfektionslipide gleichfalls zu einer Steigerung der Effizienz des Gentransfers führen. Dies wird unter anderem durch die Einführung säurelabiler Strukturen ermöglicht. BOOMER und Mitarbeiter konnten belegen, dass das von ihnen synthetisierte, als BCAT bezeichnete *O*-[2R-1,2-di-*O*-(1',9'-Z-octadecadienyl)glycerol]-3-*N*-(bis-2-aminoethyl)carbammat aufgrund der Hydrolyse im sauren Milieu bessere Transfektionsergebnisse erzielt als säureunempfindliche Analoga dieser Verbindung.⁶⁶

Eine weitere Möglichkeit besteht im Einbau von Disulfidbrücken, welche in der stark reduktiven intrazellulären Umgebung zum Kollaps der Liposomenstruktur und damit verbunden zur verstärkten Freisetzung der DNA führen.^{56,67,68}

Bisher ist es trotz der weltweiten wissenschaftlichen Bemühungen nicht gelungen, einen idealen Vektor für die erfolgreiche Übertragung genetischen Materials bei gleichzeitig guter Verträglichkeit für den Organismus zu finden. Die Forschung auf dem Gebiet der Gentransfektion sollte demzufolge weiterhin intensiviert werden. Zusammenfassend sind in *Abbildung 6* auf der nachfolgenden Seite verschiedene Gentransfermethoden in einer Übersicht dargestellt.

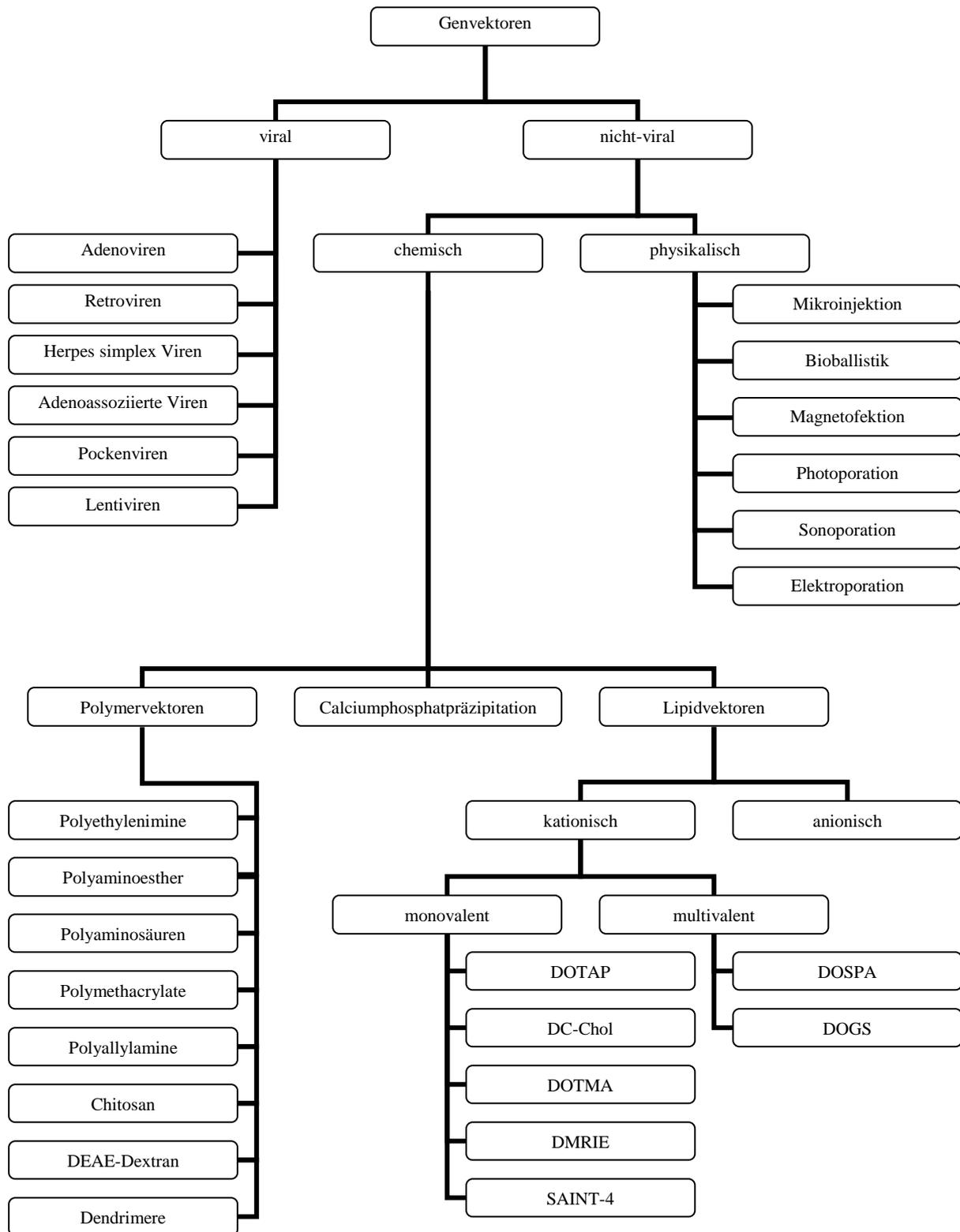


Abb.6: Übersicht ausgewählter Gentransfer-Verfahren

Das Ziel der vorliegenden Dissertationsschrift bestand in der Synthese und physikochemischen Charakterisierung neuartiger kationischer Lipide für den liposomalen Gentransfer. Folgende Schwerpunkte waren dabei festgelegt:

- Ausgehend vom Malonsäurediethylester sollten α -langkettig-verzweigte kationische Transfektionslipide und Geminilipide unter Variation der Synthesewege und Reaktionsbedingungen zur Ausbeutenoptimierung dargestellt werden.
- Die Veränderung des Spacers durch Verwendung linearer und verzweigter Polyamine stand dabei ebenso im Vordergrund wie die Modifikation der Alkylketten der hydrophoben Domäne im Bezug auf Kettenlänge und Sättigungsgrad.
- Ferner sollten die Kopfgruppen der Verbindungen in den Parametern Größe und Ladung durch Einsatz verschiedener Aminosäuren in unterschiedlicher Anzahl variiert werden.
- Es sollte ein säurelabiles Transfektionslipid mit Azomethinstruktur synthetisiert werden.
- Die dargestellten Transfektionslipide sollten nach erfolgreicher Synthese und Reinigung physiko-chemisch charakterisiert werden, zum Teil durch Mitarbeiter des *Max-Planck-Instituts für Kolloid und Grenzflächenforschung* in Golm unter der Leitung von Herrn Prof. G. BREZESINSKI. Durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe *Biochemische Pharmazie* der Martin-Luther-Universität Halle, geleitet von Herrn Prof. A. LANGNER, sollten die Verbindungen zudem auf ihre Transfektionseigenschaften und Verträglichkeit an Zellkulturen getestet werden.
- Abschließend sollten die jeweiligen Ergebnisse aus den biochemischen und den physikochemischen Versuchen unter Einbeziehung der verschiedenen Strukturvariationen diskutiert werden.

2 Synthetisch-präparative Arbeiten

Grundbaustein nahezu jeglicher in der vorliegenden Dissertationsschrift aufgeführten Verbindungen ist der Malonsäurediethylester **1**, welcher aufgrund vielfältiger Reaktionsmöglichkeiten die ideale Ausgangssubstanz für die einzelnen Synthesen bildet.⁶⁹⁻⁷¹ Als β -Dicarbonylverbindung besitzt der Malonester eine aktive Methylenkomponente, die durch die benachbarten elektronenziehenden Carbonylgruppen über freibewegliche und daher leicht substituierbare Wasserstoffatome verfügt. Basierend auf der hohen CH-Acidität und der daraus folgenden einfachen Bildung des reaktiven Carbanions durch verschiedene Basen, erhalten die Malonestersynthesen (z.B. KNOEVENAGEL-Reaktion,⁷² MICHAEL-Addition⁷³) eine bemerkenswerte präparative Bedeutung.

In Gegenwart alkalischer Kondensationsmittel, wie Natriumalkoholat, NaNH_2 oder NaH erfolgt im wasserfreien Milieu unter Wasserstoffentwicklung die Abspaltung des Wasserstoffatoms der CH-aciden Methylenkomponente.⁷⁰ Das entstehende mesomeriestabilisierte Anion kann mit einer Vielzahl diverser Alkylierungs- und Acylierungsmittel reagieren. Unter leicht veränderten Reaktionsbedingungen ist der entstandene Alkylmalonester aufgrund seiner weiterhin vorhandenen CH-Acidität einer Zweitalkylierung zugänglich. Durch nachfolgende Hydrolyse- und Decarboxylierungsschritte sind folglich zahlreiche Mono- und Dicarbonsäuren ausgehend vom Malonsäurediethylester **1** darstellbar. Die besonders einfache Alkylierung der CH-aciden Verbindung erfolgt vor allem durch Umsetzung des gebildeten Enolats mit Alkylhalogeniden, -sulfaten oder -tosylaten und führt häufig zum C-Alkylierungsprodukt, obgleich durch die Ambidenz des Anions ebenso das O-Alkylierungsprodukt entstehen kann. In welchem Verhältnis die beiden Isomere dabei erhalten werden, ist vor allem vom Reaktionsmedium abhängig.⁷⁴

Aufgrund einer höheren Ladungsdichte erfolgt die Reaktion mit einem Alkylhalogenid in aprotischen Lösungsmitteln am stärker basischen Zentrum, während diese Position in protischen Lösungsmitteln durch Wasserstoffbrücken stärker solvatisiert wird, mit daraus resultierender geringerer Nukleophilie und der folglich eintretenden Reaktion am weicheren, weniger solvatisierten Zentrum. Die Regioselektivität ist weiterhin abhängig vom eingesetzten Alkylierungsmittel. In aprotonischem Milieu führt die $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion bei Verwendung von Alkylbromid weitestgehend zum C-alkylierten Produkt. Entsprechend dem HSAB-Konzept nach PEARSON⁷⁵ besteht die Ursache dieser Regioselektivität in der bevorzugten Reaktion harter Lewis-Säuren mit harten Basen und weicher Säuren mit weichen basischen Zentren. Im ambidenten Enolat stellt das Sauerstoffatom ein hartes und das β -C-Atom ein

weiches Zentrum dar. Alkylbromid verfügt über ein weiches Kohlenstoffatom als Reaktionszentrum. Basierend auf den bevorzugten Reaktionsrichtungen weich-weich, häufig orbitalkontrolliert, und hart-hart, meist ladungskontrolliert, führt die Umsetzung mit Alkylbromid folglich wie beschrieben zum C-Alkylierungsprodukt.⁷⁴

Diesen Grundlagen und den Erkenntnissen innerhalb der Arbeitsgruppe⁶⁹ entsprechend erfolgte die Alkylierung im ersten Reaktionsschritt nahezu aller in dieser Dissertation beschriebenen Synthesen wie in *Abb.7* dargestellt unter Verwendung der jeweiligen Alkylbromide in abs. Toluol. In Anwesenheit des als Base eingesetzten, Natriumamids konnte zunächst durch Deprotonierung der Malonsäurediethylester **1** in die Enolatform überführt und im Verlauf einer S_N2-Reaktion das C-Alkylierungsprodukt gebildet werden. Aufgrund ausreichender Reaktivität wurden die Alkylbromide **2-4** als Alkylierungsmittel eingesetzt. Der Zusatz katalytischer Mengen Tetrabutylammoniumiodid (TBAI) diente der Phasen-Transfer-Katalyse der Reaktion, indem das lipophile, quarternäre Ammoniumion mit dem Carbanion als Ionenpaar aus der festen Phase in die organische Phase transportiert wurde, in welcher die Substitutionsreaktion mit der Alkylierungskomponente erfolgte. Dabei freigesetztes Bromid überführte den Katalysator in seine ursprüngliche Form und stellte ihn folglich der Reaktion wieder zur Verfügung.

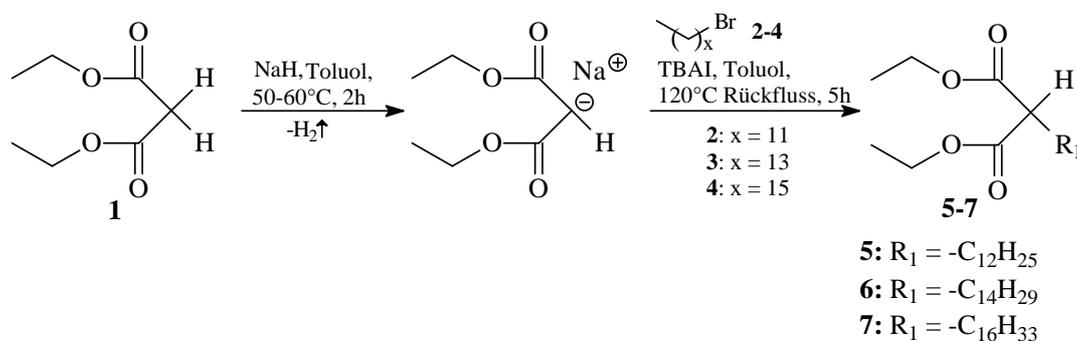


Abb.7: Malonesteralkylierung unter Verwendung von Alkylbromiden zu den Monoalkylmalonestern **5-7**

Die Reaktionsansätze wurden ausgesalzt und nach den üblichen Verfahren aufgearbeitet. Die erhaltenen Alkylmalonsäurediethylester **5-7** mussten durch die unvermeidbare Bildung der entsprechenden Dialkylverbindungen⁷⁶⁻⁷⁸, die etwa zu 20% entstanden, im Anschluss der Reaktion säulenchromatographisch mit einer Mischung aus Heptan und Ether steigender Polarität gereinigt werden. Sollten die Alkylmalonester im zweiten Alkylierungsschritt mit dem gleichen Alkylbromid umgesetzt werden wie in der Erstalkylierung, wurde auf das chromatographische Trennverfahren verzichtet.

Die Darstellung des für die Synthese des Oleylmalonsäurediethylesters **10** notwendigen Oleylmesylats **9** erfolgte unter Schutzgasatmosphäre durch Reaktion von Oleylalkohol **8** und mit Methansulfonsäurechlorid entsprechend dem im experimentellen Teil dieser Dissertation beschriebenen Verfahren. Eine angefertigte Kontroll-DC im Anschluss an die Reaktion zeigte die quantitative Umsetzung des Alkohols, der nachfolgende Reaktionen erheblich stören könnte.

Die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches erfolgte durch Hydrolyse mit Wasser im Eisbad und nachfolgender Extraktion mit Chloroform inklusive Aussalzen der wässrigen Phase aufgrund der guten Wasserlöslichkeit des Oleylmesylats. Nach entsprechender Reinigung mittels Säulenchromatographie konnte das Produkt in gleicher Weise wie die Alkylbromide **2-4** für die Darstellung des Oleylmalonesters **10** eingesetzt werden. Das Mesylat wurde unter Schutzgasatmosphäre zum gebildeten Malonesteranion hinzugefügt, damit ein Angriff von Luftsauerstoff an der Doppelbindung weitestgehend verhindert werden konnte. Der Reaktionsverlauf ist in *Abbildung 8* dargestellt.

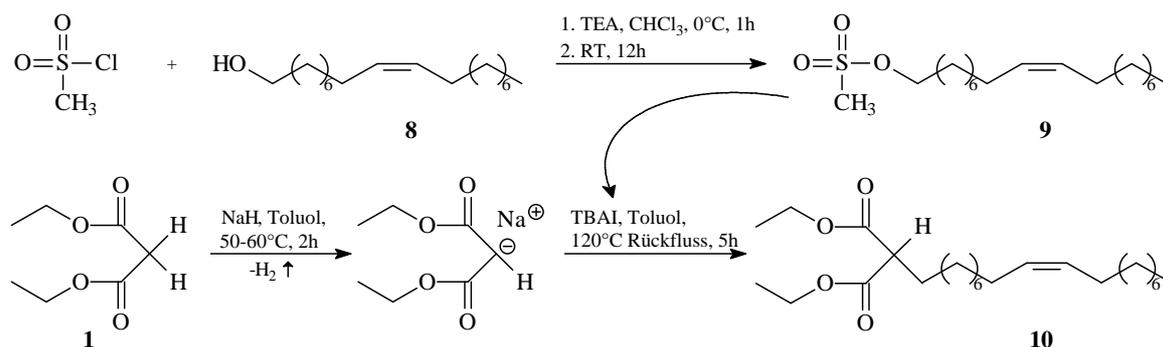


Abb.8: Synthese des Oleylmesylats **9** und anschließende Umsetzung zum Oleylmalonsäurediethylester **10**

Der Oleylmalonester wurde entsprechend dem bereits für die gesättigten Alkylierungsprodukte beschriebenen Reinigungsprozess aufgearbeitet und mittels Säulenchromatographie mit einem Elutionsmittelgemisch aus Heptan und Ether mit steigender Polarität vom ebenfalls entstandenen Dioleylmalonester abgetrennt.

2.1 Synthese α -verzweigter Transfektionslipide

2.1.1 Aufbau der hydrophoben Einheit

2.1.1.1 Darstellung der Dialkylmalonsäurediethylester

Die Synthese des hydrophoben Molekülteils der α -verzweigten Lipide basierte auf einer Zweitalkylierung monoalkylierter Malonsäureester. Auf diesem Weg konnte in Anlehnung an publizierte Arbeiten⁷⁹⁻⁸¹ eine zweite Kohlenwasserstoffkette in 2-Position der in den folgenden Reaktionsschritten erhaltenen Carbonsäuren in das Molekül eingeführt werden. Diese Methode wurde aufgrund positiver Erfahrungen innerhalb der Arbeitsgruppe gegenüber anderen Verfahren favorisiert.^{69,82,83} Im Unterschied zur Einführung des ersten langkettigen Alkylrestes erfolgte die Umsetzung nun jedoch unter leicht veränderten Reaktionsbedingungen, welche aufgrund der im Vergleich zum unsubstituierten Malonester geringeren Acidität der Monoalkylierungsprodukte erforderlich waren. Die benötigten höheren Reaktionstemperaturen nach Zusatz des Alkylhalogenids und des Katalysators zum Monoalkylmalonesteranion wurden durch den Austausch von Toluol mit dem höhersiedenden Xylol erreicht. Zudem wurde die Reaktionszeit auf zwölf Stunden angehoben, um möglichst eine vollständige Umsetzung des Eduktes zu erzielen (siehe *Abb.9*).

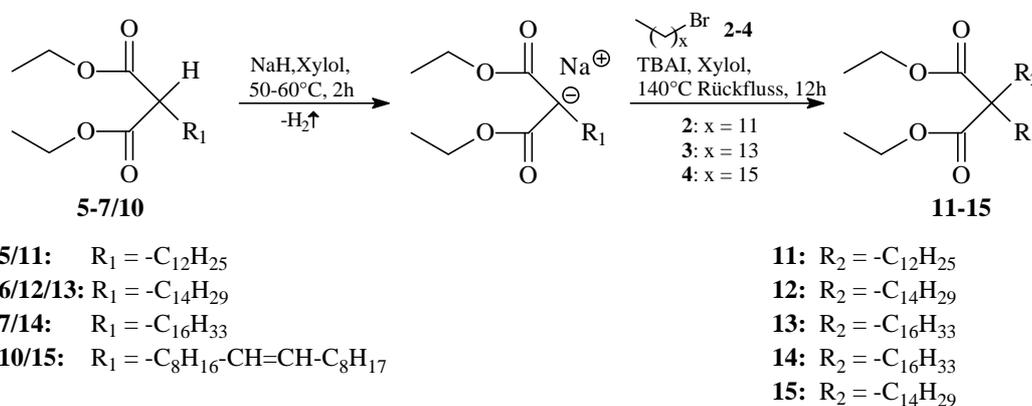


Abb.9: Synthese der Dialkylmalonsäurediethylester durch Zweitalkylierung in Xylol

Analog der Erstalkylierung erfolgten die Aufarbeitung und die säulenchromatographische Reinigung der Substanzen Verwendung eines Elutionsmittelgemisches aus Heptan und Ether steigender Polarität.

Die gebildeten Dicarbonsäuren Di-dodecylmalonsäure **16**, Di-tetradecylmalonsäure **17**, Hexadecyltetradecylmalonsäure **18**, Di-hexadecylmalonsäure **19** und Oleyltetradecylmalonsäure **20** wurden anschließend von der wässrigen Phase abgetrennt und im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Der wasserfreie Zustand der Verbindungen war erforderlich für die Entfernung einer Säurefunktion aus dem Molekül durch Decarboxylierung unter Einwirkung thermischer Energie. Die Dialkylmalonsäuren wurden ohne Reinigung als Rohprodukte der Decarboxylierung unterzogen.

2.1.1.3 Synthese der α -verzweigten Carbonsäuren durch Decarboxylierung der Dialkylmalonsäuren

Die Darstellung des α -verzweigten hydrophoben Molekülteils gelang durch Eliminierung einer Säurefunktion aus dem Molekül. Diese als Redoxreaktion ablaufende Decarboxylierung erfolgt durch Abspaltung von Kohlenstoffdioxid in Abhängigkeit von der eingesetzten Carbonsäure. Gesättigte, unverzweigte Edukte decarboxylieren schlechter als Verbindungen, welche, wie die Malonsäurederivate, über elektronenziehende Substituenten in α -Position verfügen. Aufgrund eines cyclischen Übergangszustands, der durch die nahezu gleichzeitige, konzertierte Abfolge von Bindungsbruch und Bindungsbildung charakterisiert ist, stellt die intramolekulare Eliminierung (E_i) den grundlegenden Mechanismus der Decarboxylierung dar. Dabei nehmen die Abgangsgruppe am α -C-Atom und der Wasserstoff des β -C-Atoms eine syn-periplanare Position ein, wodurch folglich die monomolekulare Reaktion stereospezifisch als syn-Eliminierung abläuft.⁸⁴ Nach diesem Reaktionsprinzip verläuft neben der Pyrolyse von Carbonsäureestern auch die COPE-Eliminierung von Trialkylaminoxiden^{85,86} und die TSCHUGAEFF-Reaktion.⁸⁷ Bei der Decarboxylierung der Dialkylmalonsäuren wird, wie in *Abbildung 11* dargestellt, pyrolytisch gleichfalls ein Olefin in Form des Endiols gebildet, welches jedoch sofort zur energieärmeren Ketonform tautomerisiert.

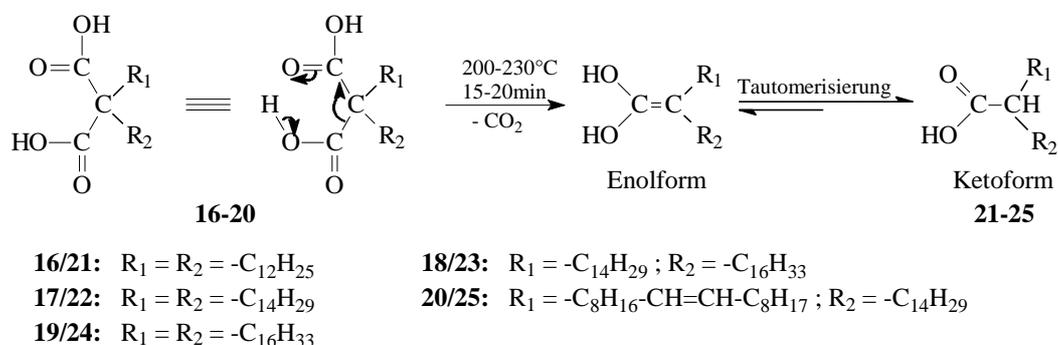


Abb.11: Abschließender Reaktionsschritt zur Darstellung der α -verzweigten Fettsäuren **21-25** durch Decarboxylierung der Dialkylmalonsäuren **16-20**

Die rasche Decarboxylierung der Malonsäurederivate **16-20** erfolgte durch Erhitzen im Metallbad bei 200 bis 230 °C innerhalb von 15 Minuten. Die Reaktionstemperaturen mussten oberhalb des Schmelzpunktes gewählt werden, da Malonsäuren im Vergleich zu Acetessigsäuren recht stabil sind.⁷⁴ Nach abgeschlossener Gasbildung und somit Vollständigkeit der Umsetzung wurden die Produkte **21-25** abgekühlt, zur Aufreinigung aus Heptan umkristallisiert und anschließend charakterisiert. Einzig die ungesättigte Verbindung 2-Tetradecylicosa-11-ensäure **25** (C_{18u/14}) wurde mit Hilfe der Mitteldruckflüssigchromatographie (MPLC) mit einem Laufmittelgemisch Heptan/Ether unter Erhöhung der Polarität gereinigt. Die Ausbeuten variierten stark von 30 % der 2-Dodecyltetradecansäure **21** (C₁₂) bzw. 34 % der 2-Tetradecylicosa-11-ensäure **25** (C_{18u/14}) bis zu 46% der 2-Tetradecyloctadecansäure **23** (C_{14/16}) und 59 % der 2-Hexadecyloctadecansäure **24** (C₁₆). Die höchste Ausbeute mit 78 % wurde bei der Darstellung der 2-Tetradecylhexadecansäure **22** (C₁₄) erhalten.

2.1.2 Einführung der Spacer

Durch die nachfolgenden Arbeitsschritte sollte nun eine Spacergruppe in das Molekül eingeführt werden, wobei für die Auswahl geeigneter Verbindungen mehrere Aspekte einbezogen wurden. Neben einer guten Reaktivität in weiterführenden Synthesen standen ferner die Bedeutung des Spacers als "Abstandhalter" im Transfektionslipid und die mögliche Variabilität der Produkte im Vordergrund. Der Einsatz von Diaminen, wie Ethylen- und Butylendiamin, sowie des Polyamins Spermin bot sich an, da die freie, endständige primäre Aminfunktion ein guter Ausgangspunkt für weitere Umsetzungen darstellte. Ebenfalls erschien die Verwendung von Tris(aminoethyl)amin sinnvoll, da auf diese Art und Weise nicht nur zwei freie Aminogruppen für weitere Reaktionen zur Verfügung standen, sondern ebenso eine Verzweigung innerhalb des Spacers erzeugt wurde, welche möglicherweise positiven Einfluss auf die Transfektionseffizienz hat.

2.1.2.1 Kupplung zum Amid nach Aktivierung zum Säurechlorid

Eine Möglichkeit der Verknüpfung der hydrophoben Einheit mit den Spacermolekülen bietet die Methode der Säurechloridaktivierung einschließlich nachfolgender Umsetzung mit Aminen. Aufgrund der für Carbonsäureester häufig notwendigen hohen Reaktionstemperaturen stellt die Reaktion von Acylhalogeniden mit primären Aminen, welche bereits bei Raumtemperatur durchführbar ist, eine gute Option zur Synthese der Amidverbindungen dar. Dafür werden die eingesetzten Carbonsäuren zunächst durch anorganische Säurechloride, wie

Thionylchlorid⁸⁸⁻⁹⁰, Phosphortrichlorid⁸⁹ oder Phosphorpentachlorid^{89,91} in Acylchloride umgewandelt. Der Einsatz von SOCl_2 wird dabei aufgrund der Bildung der leicht flüchtigen Reaktionsnebenprodukte Chlorwasserstoff und Schwefeldioxid und der damit verbundenen Produktreinheit favorisiert. Zudem sind die entstehenden langkettigen Acylhalogenide nicht flüchtig, so dass bei gleichzeitigem Ausgleich der Reaktionsträgheit dieser Verbindungen durch Einsatz des Thionylchlorids im Überschuss hohe Ausbeuten erzielt werden können.

Die Umsetzung der Carbonsäuren **22** und **24** zu den jeweiligen Acylchloriden erfolgte durch Versetzen mit Thionylchlorid im Überschuss innerhalb eines Reaktionszeitraums von zwölf Stunden. Die entstandenen klaren Lösungen wurden am Rotationsverdampfer unter Verwendung einer Wasserstrahlpumpe zur Beseitigung des überschüssigen SOCl_2 eingengt. Die sich anschließende Aminolyse erfolgte ohne Zwischenreinigung, da eine vollständige Umsetzung sowie, basierend auf der Flüchtigkeit der erhaltenen Nebenprodukte, die Reinheit der Produkte angenommen wurde.

Carbonsäurehalogenide können mit Nucleophilen schnell reagieren, bei langkettigen Acylhalogeniden sind dagegen häufig langsamere Reaktionen zu beobachten. Als Ursache kommt neben der Herabsetzung der Reaktionsgeschwindigkeit durch den +I-Effekt der Alkylkette gleichfalls eine verminderte Löslichkeit der Edukte in Betracht. Der Reaktionsablauf erfolgt dabei nach einem Additions-Eliminations-Mechanismus über tetraedrisch konfigurierte Zwischenprodukte. Entstehen während der Umsetzung der Acylhalogenide mit nucleophilen Reagenzien säurelabile Reaktionsprodukte werden dem Reaktionsansatz Basen zur Bindung freigesetzter Halogenwasserstoffsäuren hinzugefügt.⁸⁴ Als säurebindende Mittel können dabei entweder Pyridin (EINHORN-Variante),⁷⁴ tert. Amine, wie Triethylamin (TEA),⁹² oder Alkalihydroxide (SCHOTTEN-BAUMANN-Variante)⁹³ eingesetzt werden.

Die Umsetzungen der Säurechloride mit Ethylen- und Butylendiamin wurden unter Verwendung der Hilfsbase TEA, welches zur Verhinderung der Hydrolyse des Acylchlorids wasserfrei war, durchgeführt. Die Acylhalogenide der Verbindungen **22** und **24** wurden zunächst in eisgekühltem Chloroform gelöst und tropfenweise mit einer Lösung des 20fachen Überschuss an Ethylen- **28** bzw. Butylendiamin **29** in Chloroform, sowie mit TEA unter fortwährender Kühlung und permanentem Rühren versetzt. Nach einem Reaktionszeitraum von zwei Stunden erfolgte die Filtration der erhaltenen Suspension mit anschließender Vorreinigung der organischen Phase durch dreimaliges Waschen mit Wasser. Der Trocknung über Natriumsulfat folgten ein erneuter Filtrationsschritt und die Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsvakuumverdampfer. Die reinen Carbonsäureamide **30-33** konnten letztlich durch das MPLC-Verfahren mit einem Laufmittelgemisch aus Chloroform und

Methanol steigender Polarität gewonnen werden. Die Umsetzung der Carbonsäuren **22/24** via Säurechlorid-methode (*Abb.12*) führte zu den Carbonsäureamiden **30-33** in folgenden Ausbeuten: 59 % 2-Tetradecylhexadecansäure-(2-aminoethyl)amid **30** (E₁₄), 26 % 2-Hexadecyloctadecansäure-(2-aminoethyl)amid **31** (E₁₆), 61 % 2-Tetradecylhexadecansäure-(2-amino-butyl)amid **32** (P₁₄) und 19 % 2-Hexadecyloctadecansäure-(2-aminoethyl)amid **33** (P₁₆).

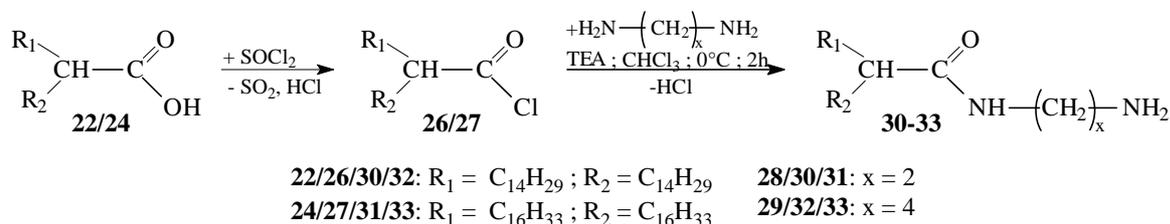


Abb.12: Spacerkupplung über Säurechloridaktivierung zur Synthese der Carbonsäureamide **30-33**⁷⁴

Das 2-Tetradecylhexadecansäureamid **34** wurde ebenfalls auf diese Art und Weise synthetisiert, die Umsetzung erfolgte jedoch mit Ammoniak (siehe *Abb.13*) und führte letztlich zu einem Lipid mit abweichender Grundstruktur, welches in weiteren Reaktionen zu einer neuen Verbindungsklasse umgesetzt werden kann, unter anderem durch die Anknüpfung von Glycin als Spacermolekül.

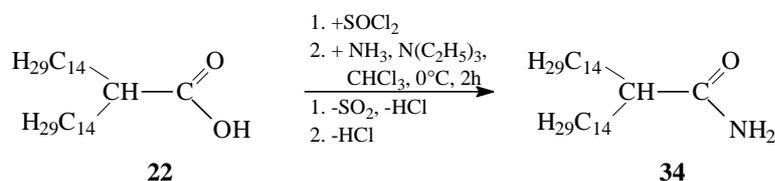


Abb.13: Darstellung des 2-Tetradecylhexadecansäureamids

In Abhängigkeit von der Molekülgröße sind Säurechloride häufig stechend riechende Flüssigkeiten, die an der Luft rauchen und eine starke Reizwirkung auf die Schleimhäute besitzen. Basierend auf dieser Tatsache sowie dem erhöhten Syntheseaufwand durch die zweistufige Umsetzung der Carbonsäuren zum Amid wurde nach weiteren Synthesestrategien zur Verknüpfung des Spacermoleküls mit der hydrophoben Moleküleinheit gesucht. Hervorragend geeignet für die Bildung einer Amidbindung war dabei der Einsatz verschiedener Kupplungsreagenzien, die häufig in der Peptidsynthese Anwendung finden.

2.1.2.2 Umsetzung der Tetradecylhexadecansäure mit verschiedenen Aminen unter Verwendung des Kupplungsreagenzes BOP

BOP [(Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat] **35**, das ebenso als CASTRO's Reagenz⁹⁴ in der Literatur bezeichnet wird, gilt als das erste publizierte

"Oniumsalz" basierend auf der 1-Hydroxybenzotriazol-Grundstruktur (HOBt). Die Kupplungsreaktion verläuft durch Versetzen der Carbonsäure mit einem Amin in Anwesenheit des Kupplungsreagenzes und eines tertiärenamins (TEA). Durch die Reaktion der deprotonierten Säure mit dem BOP **35** entstehen sowohl die aktivierte Acylphosphoniumverbindung als auch das Anion des HOBt **41**, welches leicht mit der aktivierten Säure zum reaktiven Benzotriazolester reagiert, der letztlich der Aminolyse unterzogen wird. Die treibende Kraft dieser Reaktion stellt dabei die Bildung des *ortho*-Phosphorsäuretriamids **36** dar (siehe Abb.14).⁹⁵

Die Peptidkupplung der Tetradeacylhexadecansäure **22** mit verschiedenen als Spacer fungierenden Aminen erfolgte jeweils unter Zugabe von BOP **35** im Verhältnis 1:1. Die Säure wurde dazu zunächst in abs. Dichlormethan gelöst und mit TEA versetzt. Nachfolgend wurde ein Gemisch aus Kupplungsreagenz und dem zwanzigfachen Aminüberschuss hinzugefügt. Die Synthese des Carbonsäureamids **30** erfolgte durch die Verwendung von Ethylen-diamin **28**, während die Verbindung **32** durch Umsetzung mit Butylendiamin **29** erhalten wurde. Ferner wurden Spermin **37** als lineares und Tris(2-aminoethyl)amin **38** als verzweigtes Polyamin eingesetzt und dabei die Amide **39** und **40** erhalten.

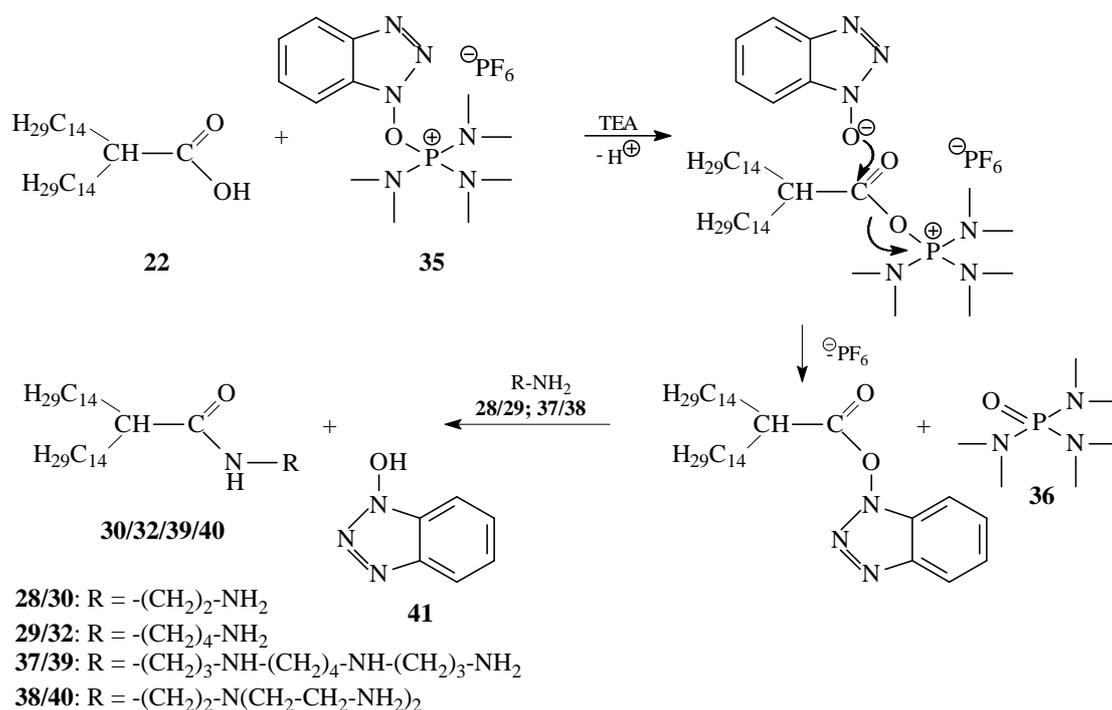


Abb.14: Synthese der Amide **30/32/39/40** durch Kupplungsreaktion mit BOP⁹⁶

Im Anschluss an den zwölfstündigen Reaktionszeitraum wurde der ausgefallene weiße Niederschlag abfiltriert und die organische Phase mit gesättigter Natriumchloridlösung ausgeschüttelt sowie zweifach mit Wasser gewaschen. Mittels Trocknung der Lösungsmittelphase über Na_2SO_4 , Filtration und nachfolgender Entfernung des Dichlormethans am Rotationsvakuumverdampfer konnte das Reaktionsgemisch aufgearbeitet werden. Im abschließenden

Arbeitsschritt wurden durch das säulenchromatographische Trennverfahren die Rohprodukte **30** und **32** mit einem Elutionsgemisch aus Chloroform/Methanol und die Verbindungen **39** und **40** mit Chloroform/Methanol/Ammoniak mit zunehmender Polarität gereinigt.

Die Cancerogenität und respiratorische Toxizität des als Zwischenprodukt entstehenden Hexamethylphosphorsäuretriamids (HMPA) **36** limitierten den Einsatz von BOP **35**,⁹⁷ weshalb nachfolgend Synthesen unter Verwendung des Kupplungsreagenzes eingestellt wurden. Alternativ wurden (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP) **42**, *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU) **43** und 2,4,6-Tripropyl-1,3,5,2,4,6-trioxatriphosphorinan-2,4,6-trioxid (T₃P) **44** als Reagenzien mit verminderter Toxizität eingesetzt (siehe *Abb. 15*), unter denen das Pyrrolidinoanalogon **42** des BOP **35**, basierend auf annähernd hohen Produktausbeuten und vergleichbaren Reaktionsbedingungen, letztlich favorisiert wurde.

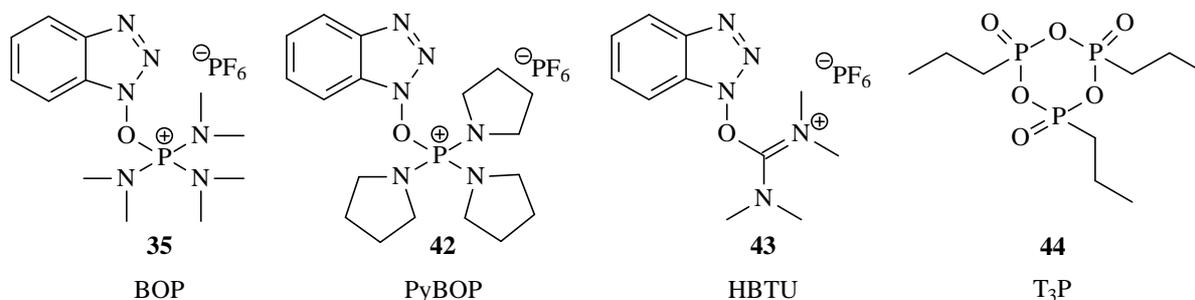


Abb.15: Übersicht der eingesetzten Kupplungsreagenzien BOP **35** und PyBOP **42**, HBTU **43** und T₃P **44** zur Darstellung der Carbonsäureamide

2.1.2.3 Darstellung des 2-Tetradecylhexadecansäure-(2-aminoethyl)amids durch Einsatz von HBTU als Kupplungsreagenz

Eine weitere Option zur Synthese des Amids **30** besteht in der Umsetzung der Tetradecylhexadecansäure **22** mit Ethylendiamin unter Verwendung von HBTU **43** als Kupplungsreagenz (siehe *Abb. 16*).

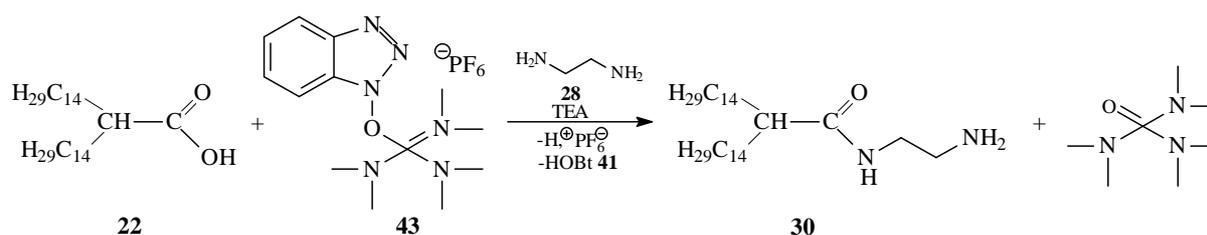


Abb.16: Darstellung des 2-Tetradecylhexadecansäure(2-aminoethyl)amids **30** durch Einsatz von HBTU **43**⁹⁶

Das Diamin wurde wie in den bereits beschriebenen Reaktionen erneut in zwanzigfachem Überschuss vorgelegt und mit einer Mischung aus Tetradecylhexadecansäure und HBTU **43** sowie der Hilfsbase TEA und Dichlormethan unter permanentem Rühren langsam versetzt. Einem Reaktionszeitraum von zwölf Stunden folgte die Aufarbeitung entsprechend dem bereits bei der BOP-Kupplung beschriebenen Verfahren (siehe Kapitel 2.1.2.2). Die Reinigung des entstandenen Carbonsäureamids **30** wurde per MPLC mit einer Chloroform/Methanol-Mischung steigender Polarität als Elutionsmittel durchgeführt.

Der Einsatz von HBTU **43** zur Amidknüpfung führte vermutlich basierend auf der schlechten Löslichkeit im bisher als Reaktionsmedium favorisierten Dichlormethan nur zu einer Amid-Ausbeute von weniger als 30 Prozent. Infolgedessen wurde von einer Verwendung dieses Kupplungsreagenzes in weiteren Reaktionen abgesehen.

2.1.2.4 Reaktion zwischen Ethylendiamin und 2-Tetradecylhexadecansäure mit T₃P

Das neue Propylphosphonsäurecycloanhydrid T₃P **44**, welches wie die BOP- und PyBOP-Derivate nahezu racemisierungsfrei Peptidbindungen knüpft, wurde als weiteres Kupplungsreagenz ausgewählt. Zusätzlich zum preisgünstigen Erwerb bietet es den Vorteil, wasserlösliche Phosphonat-Nebenprodukte zu bilden, welche leicht durch Ausschütteln mit Wasser aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden können. Ferner ist es in allen zur Peptidsynthese eingesetzten aprotischen Lösungsmitteln sehr gut löslich.^{98,99}

Die Umsetzung der α -verzweigten Carbonsäure **22** (siehe *Abb.17*) erfolgte unter Vorlage von Ethylendiamin und anschließendem Zutropfen einer Mischung aus dem Edukt, einer 50 %igen Lösung des T₃P in Essigsäureethylester sowie der Base TEA. Innerhalb des Reaktionszeitraums von zwölf Stunden bildete sich ein weißer Niederschlag. Das Reaktionsgemisch wurde am Rotations-vakuumverdampfer eingengt und der erhaltene Rückstand in Chloroform aufgenommen. Die Aufreinigung entsprach dem bei der BOP-Kupplung verwendeten Verfahren (siehe Kapitel 2.1.2.2). Mittels MPLC-Trennverfahren mit einem Laufmittelgemisch aus Chloroform und Methanol mit steigender Polarität wurde das gebildete Carbonsäureamid **30** gereinigt.

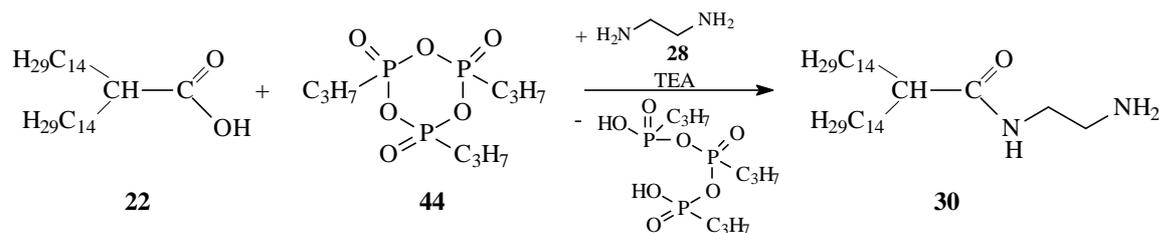


Abb.17: Synthese des Carbonsäureamids **30** unter Verwendung von T₃P

Vermutlich begründet durch die geringe Löslichkeit des Eduktes in Ethylacetat, konnte das 2-Tetradecylhexadecansäure-(2-aminoethyl)amid **30** auch auf diesem Reaktionsweg nur mit einer Ausbeute von 33 % gewonnen werden, weshalb auf weiteren Einsatz des Kupplungsreagenzes verzichtet wurde. In zukünftigen Arbeiten könnte das Mischen des in Ethylacetat gelösten T₃P mit Chloroform oder Dichlormethan zu einer wesentlichen Ausbeuteerhöhung führen.

2.1.2.5 Amidsynthese durch Einsatz von PyBOP als Kupplungsreagenz

Aufgrund der Cancerogenität des als Zwischenprodukt bei Kupplungsreaktionen mit BOP entstehenden HMPA **36** wurde das Derivat PyBOP **42** als sichere Alternative entwickelt,¹⁰⁰ da es zur Bildung des weniger reaktiven Nebenprodukts 1,1',1''-Phosphorsäure(tris-pyrrolidid) **51** führt. Zudem konnte belegt werden, dass PyBOP **42** als Pyrrolidino-Analogon dem Dimethylamino-Derivat BOP **35** bei der Knüpfung einer Peptidbindung in geringem Umfang überlegen ist.¹⁰¹

Die Darstellung der Carbonsäureamide **30/31**, **40**, **45-50** unter Verwendung von PyBOP **42** (siehe *Abb.18*) wurde in Anlehnung an die bereits beschriebene BOP-Kupplung durchgeführt. Entgegen der bei der BOP-Reaktion üblichen Vorlage der Carbonsäure wurden jeweils die Amine **28** und **38** vorgelegt und mit einem Gemisch aus PyBOP **42**, Carbonsäure **21-25** und TEA in Dichlormethan unter Rühren versetzt. Die Dimerisierung bzw. Trimerisierung der Verbindungen sollte somit weitgehend verhindert und die Ausbeuten möglichst gesteigert werden.

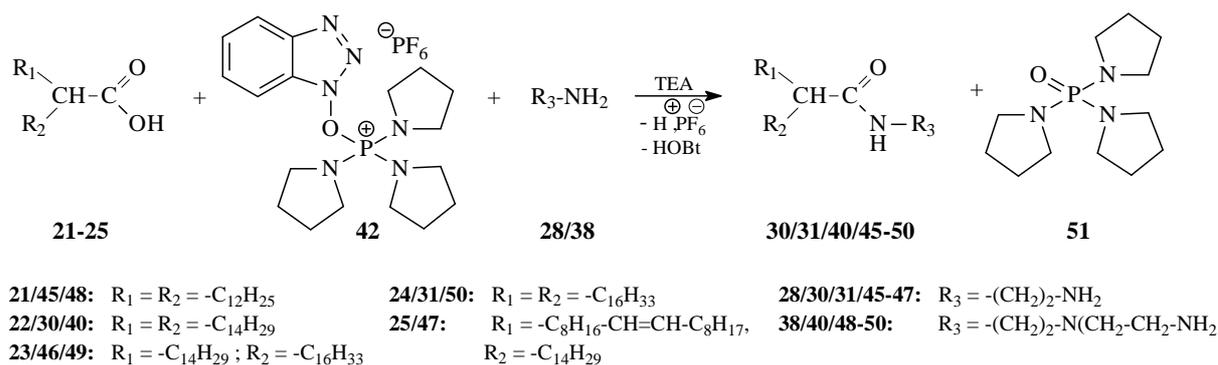


Abb.18: Einführung der Spacermoleküle mittels PyBOP-Kupplung zur Darstellung der Carbonsäureamide **30/31/40/45-50**

Die Umsetzungen erfolgten im mit der BOP-Kupplung vergleichbaren Verhältnis der Komponenten Carbonsäure/PyBOP/Amin 1:1:20. Aufgrund der dünnschichtchromatographisch im Anschluss an die Aufarbeitung nachgewiesenen Verunreinigungen war die Reinigung der erhaltenen Verbindungen **30/31/40/45-50** mittels MPLC-Trennverfahren unerlässlich. Für die synthetisierten Carbonsäureamide **30/45-47** mit nur einer freien primären Aminfunktion eignete sich das Elutionsmittelgemisch aus Chloroform/Methanol mit zunehmender Polarität während die Lipide **40/48-50** mit zwei endständigen primären Aminogruppen Ammoniak als dritte Elutionskomponente benötigten (siehe *Tab.1*, Kapitel 6.1.1). Die Dimere **52-54** als Nebenprodukte der Umsetzung der Carbonsäuren mit Tris(2-aminoethyl)amin entstanden trotz 20fachen Überschusses desamins mit bis zu 10 % Ausbeute (siehe *Abb.19*). Sie wurden daher analytisch charakterisiert und als Edukte in weiteren Reaktionen umgesetzt.

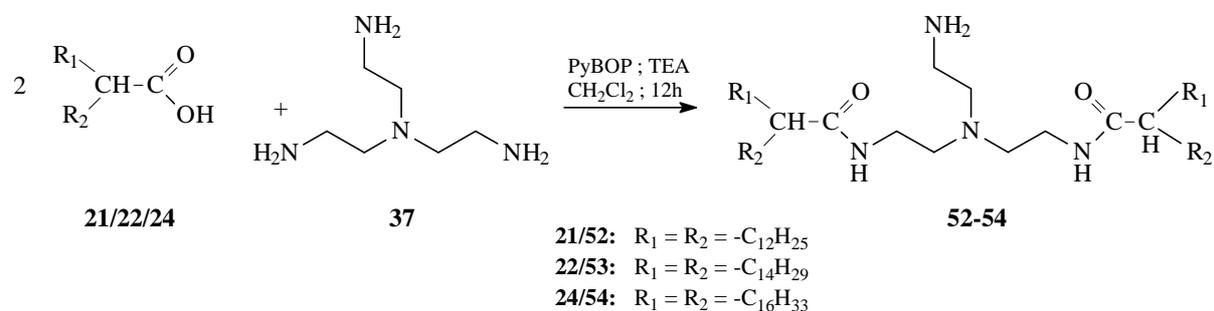


Abb.19: Nebenreaktion der PyBOP-Kupplung unter Dimerisierung

2.1.3 Reaktionen zur Anknüpfung und Variation der polaren Kopfgruppen

Mit dem Ziel möglichst verträgliche Transfektionslipide zu erhalten, wurde nach geeigneten Verbindungen für die polare Kopfgruppe gesucht. Da für biogene, physiologisch im Organismus vorkommende Aminosäuren nur geringe Toxizitäten und eine gute Bioabbaubarkeit angenommen werden können, stellten sie ideale Zielstrukturen für die Kopfgruppe dar.

Innerhalb der vorliegenden Dissertation beschriebene Kupplungsreaktionen zur Einführung der polaren Kopfgruppe wurden mit verschiedenen Aminosäuren als Acylkomponenten durchgeführt. Dabei war die Verwendung N-terminal-geschützter Verbindungen notwendig, um die Bildung von Di- und Polypeptiden der Aminosäuren untereinander zu verhindern und infolge dessen den Anteil entstehender Nebenprodukte zu minimieren.

Substituenten, welche leicht mit den Aminogruppen der Aminosäuren reagieren, unter den gewählten Reaktionsbedingungen stabil sind und sich nach erfolgreicher Umsetzung einfach aus dem Molekül entfernen lassen, stellen ausgezeichnete Schutzgruppen dar. Für die geplanten Synthesen eigneten sich sowohl die *tert.*-Butoxycarbonyl(BOC)-Gruppe, welche bereits unter milden Bedingungen hydrolytisch in saurem Milieu entfernt werden kann, als auch die Carboxybenzyl(CBZ)-Schutzgruppe, aus der durch katalytische Hydrierung als instabiles Zwischenprodukt die freie Carbamidsäure entsteht, die sofort zerfällt.

2.1.3.1 Peptidkupplung mittels Carbodiimid-Methode

Der abschließende Reaktionsschritt in der Darstellung der verzweigten Transfektionslipide **67-77** erfolgte nach SHEEHAN mittels der klassischen Carbodiimid-Methode unter Verwendung von *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zur Aktivierung der Carboxylgruppe der eingesetzten Aminosäuren.^{102,103}

Das Reaktionsprinzip beruht dabei auf der Übertragung der aktivierten Acylgruppe eines intermediär gebildeten *O*-Acylisoharnstoffderivats **64** auf die Aminkomponente, wobei zusätzlich ein komplexerer Mechanismus diskutiert wird.¹⁰⁴⁻¹⁰⁷ Zur Vermeidung der bei dieser Reaktion häufig auftretenden Racemisierung und des Acetyltransfers, der zur Bildung des inaktiven *N*-Acylharnstoffderivats **65** führt, wurde das von KÖNIG und GEIGER als Additiv eingeführte HOBt **41** zugesetzt.¹⁰⁸ Es reagiert schnell zu einem Intermediat, welches für die Kupplung mit dem Amin reaktiv genug ist und somit der Entstehung des *N*-Acyl-Nebenprodukts entgegen wirkt.¹⁰⁹ Zudem ist es dem oft genutzten *N*-Hydroxysuccinimid (HOSu) bezüglich Reaktionsausbeute, Unterdrückung der Epimerisierung sowie der Aminolysegeschwindigkeit des aktiven Esters überlegen.¹¹⁰

Wie in *Abbildung 20* dargestellt, wurden die Carbonsäureamide **30-33** in abs. Dichlormethan gelöst und unter Rühren mit HOBt **41**, sowie der jeweiligen geschützten Aminosäure im Verhältnis 1:1:1 versetzt. Dem Reaktionsansatz wurde weiterhin das Kupplungsreagenz DCC in 1,5facher molarer Menge zugefügt. Zunächst entstand ein klares Reaktionsgemisch in dem sich nach wenigen Minuten ein weißer Niederschlag bildete. Nach Prüfung auf Vollständigkeit der Reaktion mittels Kontroll-DC wurde dieser abfiltriert und anschließend aus Heptan sowie Methanol zur Aufreinigung umkristallisiert.

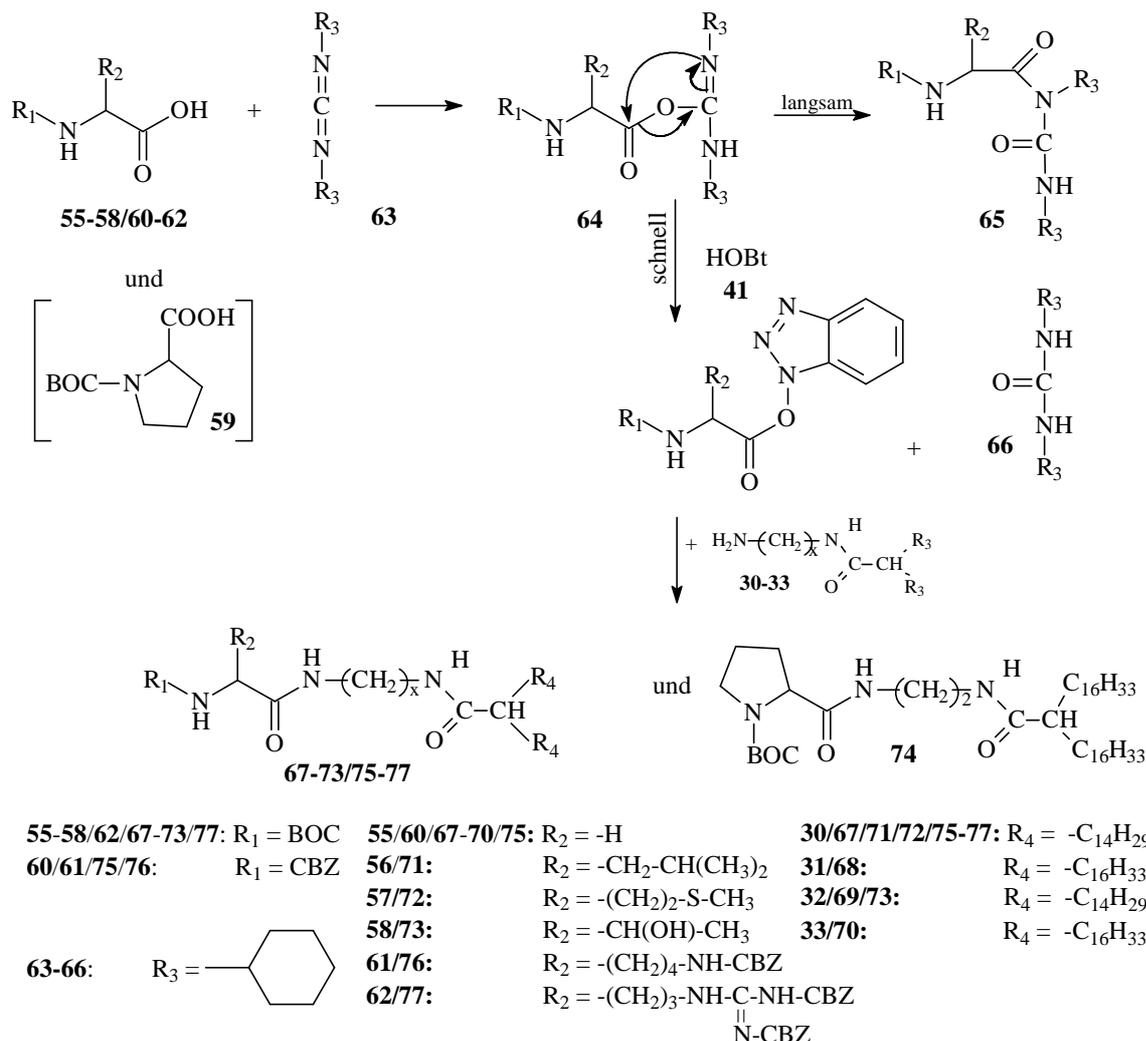


Abb.20: Synthese der Transfektionslipide **67-77** via Carbodiimidmethode

Die DC-rein erhaltenen Produkte **67-77** wurden im folgenden Arbeitsschritt schließlich der jeweils notwendigen Schutzgruppenabspaltung unterzogen (siehe *Abb.21*). Die BOC-Schutzgruppen der Lipide **67-74** ließen sich besonders schonend in Ethylacetat als Reaktionsmedium unter Rühren durch Einleiten von Chlorwasserstoff abspalten. DC-Untersuchungen nach verschiedenen Reaktionszeiträumen bis zu zwölf Stunden wiesen jedoch stets auf die Unvoll-

Die reinen Reaktionsprodukte **78** und **86** konnten letztlich durch Säulenchromatographie mit Chloroform/Methanol/Ammoniak als Elutionsmittelgemisch mit zunehmender Polarität erhalten werden.

Die CBZ-Schutzgruppen des Lipids **77** sollten ebenfalls, wie in *Abb.23* dargestellt, durch Hydrierung aus dem Molekül entfernt werden. Dazu wurde das erhaltene Rohprodukt zunächst in einem Lösungsmittelgemisch aus abs. Ethanol und Ethylacetat suspendiert und anschließend in der Hydrierapparatur bei 30 °C und einem Druck von 3 bar über einen Zeitraum von mehreren Tagen gerührt. Die während und nach der Reaktion angefertigten DC-Untersuchungen deuteten auf Nebenprodukte durch partielle Hydrierung hin. Mit Hilfe der Massenspektrometrie und der H^1 -NMR-Analyse konnte das Vorhandensein der BOC-Schutzgruppe an der α -ständigen Aminogruppe, welche nicht durch Hydrierung abgespalten werden kann, nachgewiesen werden. Die folglich notwendige Abspaltung der Schutzgruppe erfolgte durch Zugabe konz. Salzsäure zur Suspension des Zwischenproduktes in Ethylacetat, wobei die BOC-Schutzgruppe aus der Verbindung unter Erhalt des Lipids **88** entfernt werden konnte.

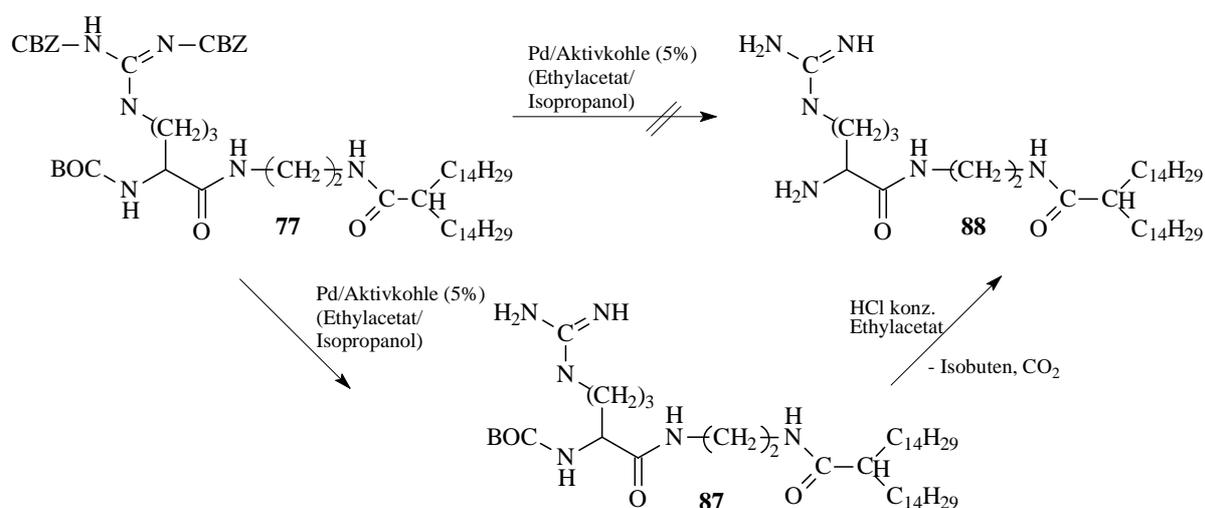


Abb.23: Zweistufige Schutzgruppenabspaltung der Verbindung **77**

Die anschließende Reinigung der Verbindung **77** wurde mittels MPLC mit einem Elutionsmittelgemisch aus Chloroform, Methanol und Ammoniak mit steigender Polarität durchgeführt. Die erhaltenen Fraktionen wiesen durch eine bräunliche Verfärbung auf enthaltene Verunreinigungen hin. Zudem wurde nur ein geringer Anteil des Produktes von der Säule eluiert. Die Verwendung einer Umkehrphasen-Chromatographie für die Reinigung dieser verhältnismäßig polaren Verbindung ist folglich vorteilhafter.

2.1.3.2 Peptidkupplung mit aktiviertem, BOC-geschütztem Lysin

Aktivierte Ester können häufig leichter hydrolysieren und neigen dazu, mit einer Vielzahl von verschiedenen Nucleophilen zu reagieren. Besonders bedeutsam ist dabei die Fähigkeit, Amine unter milden Bedingungen und mit verminderter Racemisierung zu reinen Amidinen umzusetzen. Ermöglicht wird die hohe Reaktivität durch den im Vergleich zum Alkylester elektrophileren Carbonylkohlenstoff, hervorgerufen durch den elektronenziehenden Charakter der zur Esterbildung eingesetzten Alkohole, wie 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) **41**, 1-Hydroxy-7-aza-benzotriazol (HOAt) oder N-Hydroxysuccinimid (HOSu) **90**.⁹⁶

Die Einführung der Lysinkopfgruppe wurde mit dem im Handel erhältlichen, bereits aktivierten Ester Di-BOC-Lysin-*N*-hydroxysuccinimid **89** durchgeführt, mit dem Vorteil, dass außer dem üblicherweise als Hilfsbase verwendeten TEA keine weiteren Reagenzien für die Umsetzungen erforderlich waren.

Die Carbonsäureamide **30-33/45-47** wurden in abs. Dichlormethan unter magnetischem Rühren mit dem bereits aktivierten Di-BOC-Lysin-*N*-hydroxysuccinimid **89** im Verhältnis 1:1 und wenigen Tropfen TEA versetzt und nach einem zwölfstündigen Reaktionszeitraum am Rotationsvakuumverdampfer eingengt (Abb.24).

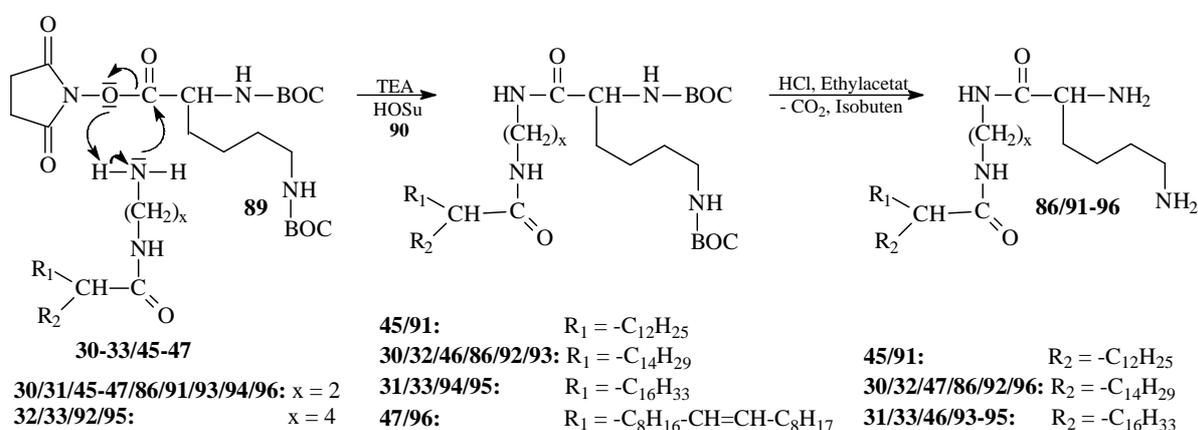


Abb.24: Kupplungsreaktion der Carbonsäureamide **30-33/45-47** mit aktiviertem, BOC-geschütztem Lysin

Die Umsetzung der als Nebenprodukte der Amidsynthese mit Tris(aminoethyl)amin entstandenen Dimere **52** und **53** erfolgte auf gleiche Art und Weise, dargestellt in Abbildung 25.

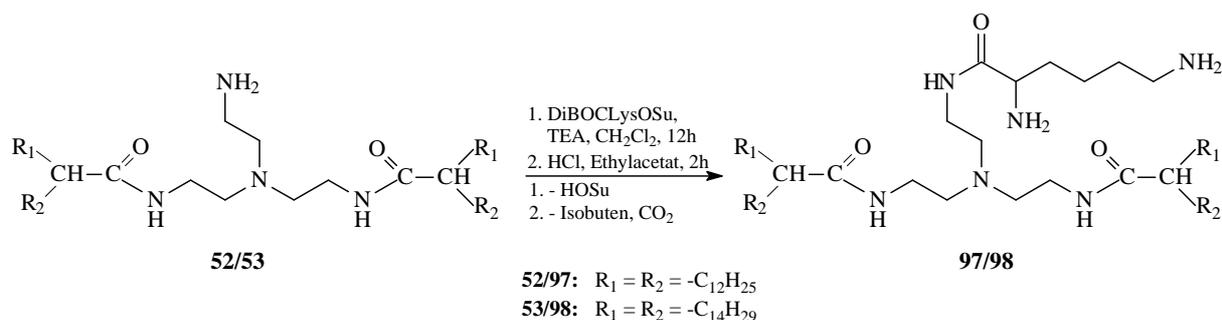


Abb.25 Anknüpfung der Lysinkopfgruppe an die Dimere **52** und **53**

Für die Verbindungen **40/48-50** wurde der Anteil an Di-BOC-Lysin-*N*-hydroxysuccinimid **89** auf das Doppelte erhöht, damit jeweils die zwei vorhandenen freien Aminogruppen mit Lysin verknüpft werden konnten (*Abb.26*). Basierend auf den nachgewiesenen und teilweise nicht unerheblichen Mengen an Nebenprodukten mit nur einem endständigen Lysin, deren Anteil mittels DC-Untersuchungen auf bis zu 25 % geschätzt werden konnte, sollte jedoch bei zukünftigen Umsetzungen die Aminosäure mindestens im Verhältnis 3:1 zum Edukt eingesetzt werden.

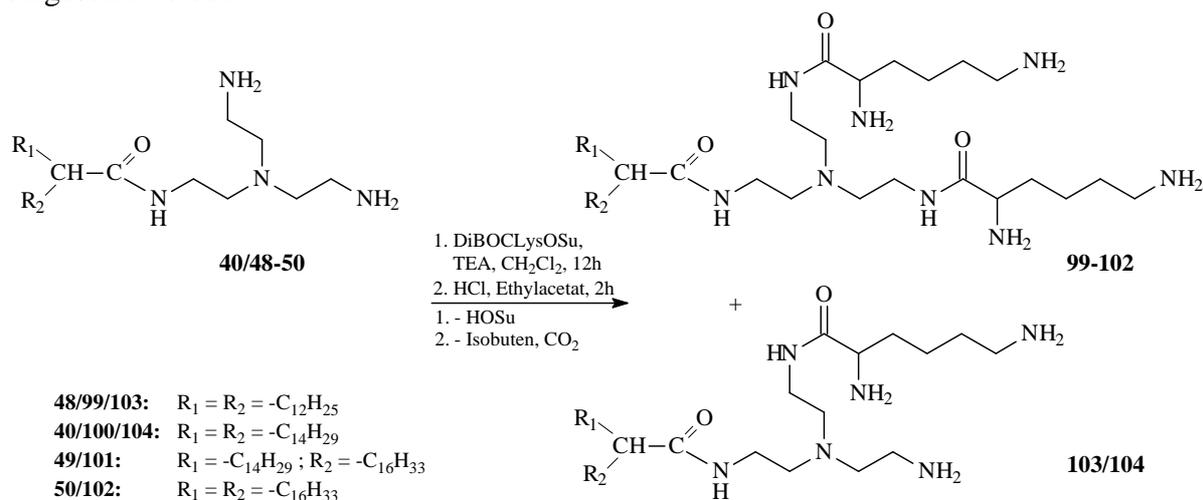


Abb.26 Umsetzung der Tris(2-aminoethyl)amin-Derivate **40/48-50** mit DiBOCLysOSu zu den DiLysin-Produkten **99-102** und den ebenfalls entstehenden Monolysin-Nebenprodukten **103** und **104**

Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte unter Verzicht auf chromatographische Reinigung direkt im anschließenden Arbeitsschritt durch Versetzen einer Suspension des Rohproduktes in Ethylacetat mit konzentrierter Salzsäure unter Rühren. Auf diese Art und Weise konnten letztlich alle BOC-geschützten Derivate vollständig in die freie Form überführt werden. Die erhaltenen Reaktionsprodukte wurden abschließend mittels MPLC mit Chloroform/Methanol/Ammoniak mit zunehmender Polarität gereinigt und neben den physiko-chemischen Charakterisierungen den Untersuchungen auf Transfektionseffizienz und Toxizität unterzogen. Zur weiteren Variation der Kopfgruppe wurden einige der synthetisierten

Verbindungen erneut mit Di-BOC-Lysin-*N*-hydroxysuccinimid umgesetzt (siehe Abb.27). Die Synthese erfolgte analog dem bereits beschriebenen Verfahren unter Verwendung der gereinigten Transfektionslipide **78-83** im Verhältnis 1:1 und der Lipide **86/91/92/94** im Verhältnis 1:2 zum dem aktivierten Lysin.

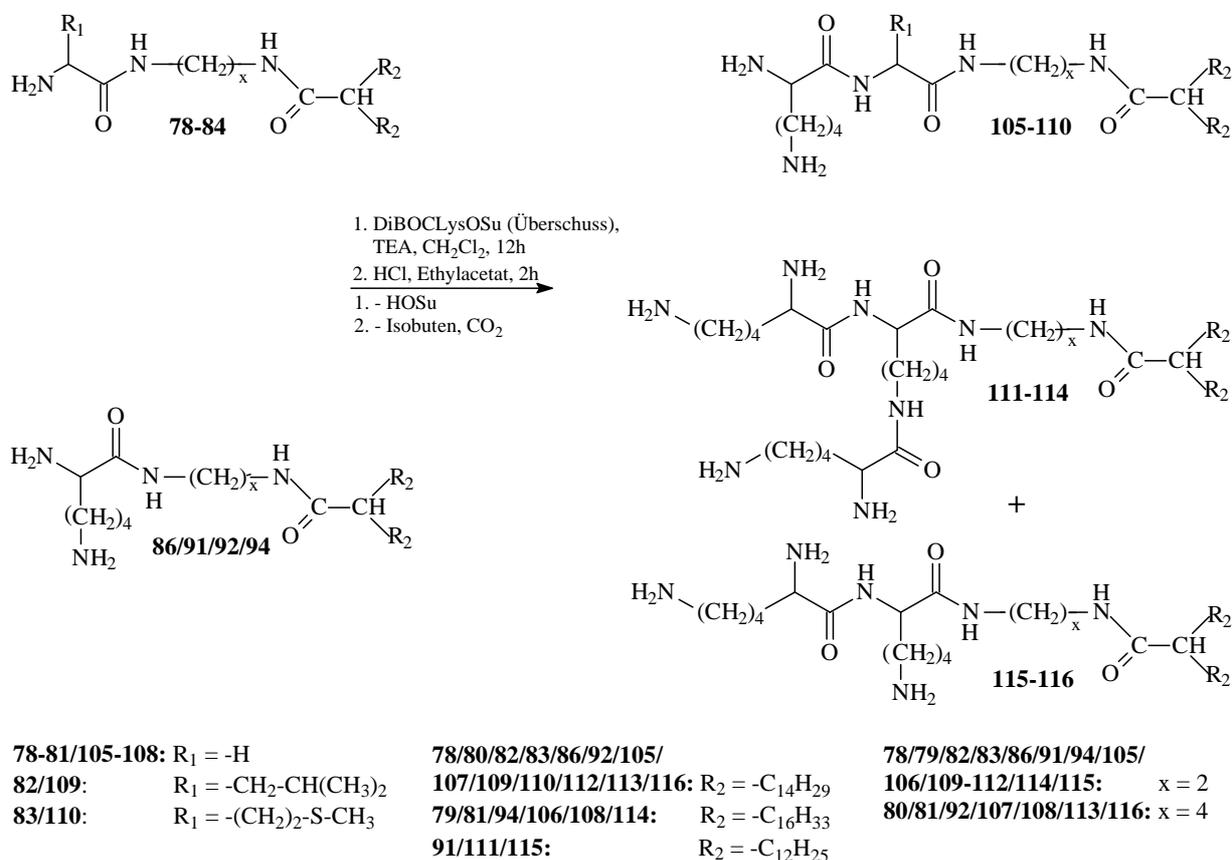


Abb.27: Variation der Kopfgruppe durch Anbindung von ein (**105-110/115/116**) bzw. zwei zusätzlichen Lysinmolekülen (**111-114**)

Durch diese Reaktionen mit nachfolgender Schutzgruppenabspaltung und Reinigung mit Hilfe der MPLC konnten die Verbindungen **105-110** rein erhalten werden. Die Umsetzungen der Edukte mit Lysinkopfgruppe **86/91/92/94** mit Di-BOC-Lysin-*N*-hydroxysuccinimid im Verhältnis 1:2 gestalteten sich dagegen schwieriger, da Reaktionsgemische der Bis- und Tris-Lysin-Derivate erhalten wurden. Diese wurden ebenfalls der vorab dargestellten Aufarbeitungs- und Reinigungsschritte unterzogen, wobei durch das MPLC-Verfahren die Tris-Lysin-Lipide **111-114** und die Bis-Lysin-Derivate **115** und **116** rein gewonnen werden konnten. Für die Darstellung der reinen Tris-Lysin-Transfektionslipide sollte entsprechend der erhaltenenen Bis-Nebenprodukte und den damit verbundenen geringeren Ausbeuten zukünftig mindestens mit dem dreifachen Überschuss der geschützten, aktivierten Aminosäure gearbeitet werden.

2.2 Synthese der Gemini-Lipide

2.2.1 Bedeutung der Geminstruktur für die Gentransfektion

Die Gemini-Lipide finden Anwendung in antibakteriellen Präparaten und Hautpflegeprodukten, können beim Aufbau hochporöser Materialien, in analytischen Trennverfahren und bei Solubilisierungsprozessen¹¹¹ eingesetzt werden und stellen geeignete Strukturen für die Gentransfektion dar. Diese Klasse von Verbindungen, die erstmals 1991 den Begriff „Gemini-Tenside“ zugeordnet bekam,¹¹² ist charakterisiert durch amphiphile Moleküle, welche laut KIRBY¹¹³ aus einem Linker, zwei hydrophoben Alkylketten sowie zwei polaren Kopfgruppen bestehen (siehe *Abb.28*).

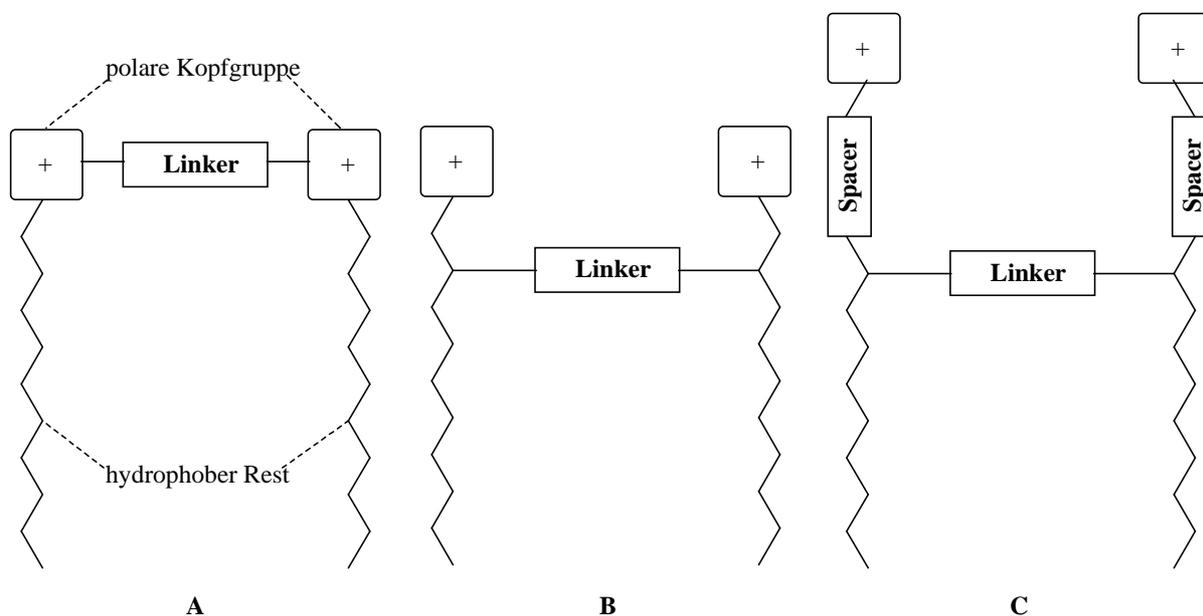


Abb.28: Prinzipieller Aufbau der Gemini-Tenside, **A** und **B** nach KIRBY¹¹³, **C** entspricht der Grundstruktur der in dieser Dissertationsschrift beschriebenen Gemini-Transfektionslipide

Der Linker zwischen den Kohlenwasserstoffketten kann dabei stark in Kettenlänge, Polarität und Flexibilität variieren. So können als Linker polare Polyether, unpolare aliphatische Kohlenwasserstoffe mit zwei bis zwölf Methylengruppen mit hoher Beweglichkeit sowie starre, aromatische Verbindungen eingesetzt werden.¹¹¹ Hauptsächlich wurden symmetrische Gemini-Lipide mit identischen Kopfgruppen und Alkylketten beschrieben, einige besitzen jedoch einen unsymmetrischen Aufbau.^{114,115}

Basierend auf den außergewöhnlichen Eigenschaften dieser Strukturen, wie der im Vergleich zu monovalenten Lipiden mit nur einer polaren Kopfgruppe und einer Alkylkette bis zu 1000fach höheren Oberflächenaktivität, stellen sie interessante Verbindungen für die

Genstransfektion dar. Diese Eigenschaft der Gemini-Lipide verbessert die Wechselwirkungen mit biologischen Membranen und bietet durch die damit verbundene Möglichkeit der Dosisreduktion den Vorteil der Verminderung in-vivo erzeugter Nebenwirkungen.¹¹³ Folglich sind Gemini-Lipide durch die Kombination des zur Bindung der Nukleinsäure notwendigen kationischen Charakters und der guten oberflächenaktiven Eigenschaften als Transfektionsagentien besonders geeignet.¹¹⁶⁻¹¹⁸

Bereits 2001 synthetisierten MCGREGOR und seine Mitarbeiter eine Reihe multivalenter Gemini-Tenside mit Lysin-haltigen Kopfgruppen, deren Transfektionseffizienz mit kommerziell erhältlichen liposomalen Transfektionsektoren vergleichbar war.¹¹⁹ Die Arbeitsgruppe um BELL synthetisierte Gemini-Lipide aus Zuckermolekülen, welche durch säurebedingte Umwandlung der Morphologie des Lipoplexes die Destabilisierung und folglich die Ruptur der Endosomenmembran und der damit verbundenen DNA-Freisetzung im Zellinneren begünstigten, was letztlich zur Verbesserung der Transfektionsrate führte.¹²⁰

Durch die im Folgenden beschriebenen Reaktionen sollten Gemini-Lipide mit Lysinkopfgruppen und einer aus zwei Alkylketten bestehenden hydrophoben Einheit synthetisiert werden. Der Austausch des gesättigten Linkers durch einen ungesättigten sollte zudem die Wechselwirkung mit Membranen verbessern. Mit der darausfolgenden vermehrten Aufnahme des Vehikels in die Zelle und der vereinfachten Freisetzung des Lipoplexes aus dem Endosom sollte eine höhere Transfektionseffizienz erzielt werden.

2.2.2 Darstellung der Gemini-Lipide mit Alkyl-Linker

2.2.2.1 Darstellung der Gemini-Grundstruktur durch verknüpfende Zweitalkylierung

Die Synthese der Gemini-Lipid-Moleküle erfolgte ausgehend von den durch Alkylierung aus Malonsäurediethylester hergestellten Alkylmalonestern **6** und **7** entsprechend den bereits beschriebenen Alkylierungsreaktionen. Der Reaktionsablauf ist vergleichbar mit der Darstellung der Dialkylmalonester **11-15** durch Bildung des Natriummalonats mittels Einsatz von 60%igem Natriumhydrid und nachfolgender Umsetzung mit einem Alkylhalogenid. Anstelle der bisher verwendeten langkettigen Alkylhalogenide wurde zur Einführung des Linkers das kurzkettige Alkyldihalogenid 1,4-Diiodbutan **117** verwendet, das durch Einsatz im Verhältnis von 0,4:1 zum Ester überwiegend zur Verknüpfung zweier Alkylmalonester-Moleküle und somit zur Struktur des Gemini-Lipids führen sollte (siehe *Abb.29*).

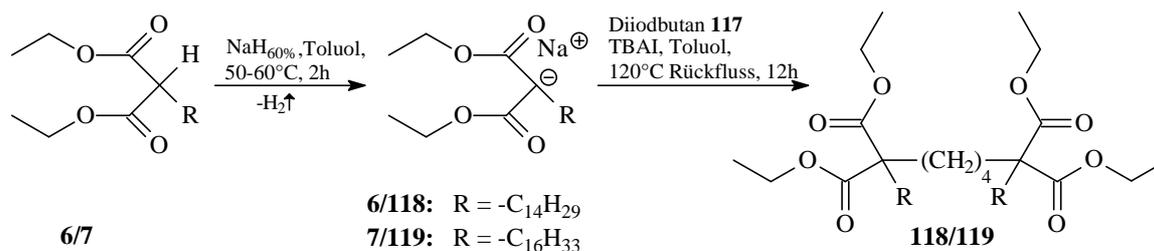


Abb.29: Zweitalkylierung unter Verwendung von 1,4-Diiodbutan **117** zur Darstellung der Gemini-Grundstruktur

Die Aufreinigung der Gemini-Ester **118/119** erfolgte im Anschluss der Reaktion analog den bisher beschriebenen Aufarbeitungsschritten durch Ausschütteln mit gesättigter NH₄Cl-Lösung und mehrmaligem Waschen mit Wasser, Abtrennung der organischen Phase und Trocknung derer über Na₂SO₄. Nach Filtration und Entfernen des Toluols wurden die Lipide **118/119** mittels SC mit einem Heptan-Ether-Gemisch steigender Polarität gereinigt.

2.2.2.2 Verseifung und Decarboxylierung zur Gemini-Dicarbonsäure

Zur Überführung der Gemini-Ester in die Form der freien Di-Carbonsäuren wurden die dargestellten Verbindungen **118/119** zunächst wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben durch überschüssiges Kaliumhydroxid in abs. Ethanol verseift. Anstelle des fünffachen Überschusses wurde das Kaliumhydroxid jedoch im Verhältnis 20:1 zum Ester eingesetzt, da möglichst alle vier Esterfunktionen eines Moleküls unter Abspaltung des Alkohols reagieren sollten. Durch vollständige Verseifung innerhalb von zwölf Stunden und anschließender Überführung der Kaliumsalze der Verbindungen in die freien Säuren unter Verwendung konz. HCl gelang die Darstellung der Gemini-Tetra-Carbonsäuren, welche ohne erneute Säulenchromatographie der Decarboxylierung unterzogen werden konnten. Dazu wurden die Lipide **120/121** im Metallbad auf 200 bis 230 °C zwanzig Minuten lang erhitzt und nach abgeschlossener Gasbildung abgekühlt. Durch Umkristallisation aus Heptan wurden die Lipide **122/123** rein erhalten (siehe *Abb.30*).

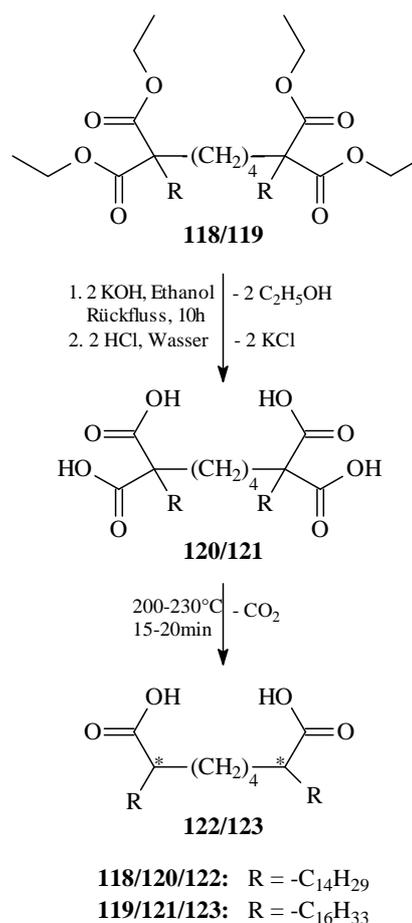


Abb.30: Synthese der Gemini-Lipide **122/123** durch Verseifung und Decarboxylierung

2.2.2.3 Einführung der Spacer

Für die Darstellung der Gemini-Diamide wurde mit der Säurechloridmethode und der Kupplung mit BOP auf zwei der bereits beschriebenen Verfahren zurückgegriffen. Als geeignetes Spacermolekül wurde zunächst Ethylendiamin eingesetzt. Nachfolgende Synthesversuche mit dem verzweigten Tris(2-aminoethyl)amin scheiterten trotz 40fachem Überschuss an Amin an der Vielzahl der entstandenen Nebenprodukte, die durch das MPLC-Verfahren nicht aus dem Produktgemisch entfernt werden konnten.

Synthese der Gemini-Dicarbonsäureamide via Säurechloridmethode

Die gereinigten Gemini-Dicarbonsäuren wurden durch Reaktion mit Thionylchlorid im Überschuss bei Raumtemperatur innerhalb von zwölf Stunden zu nicht flüchtigen Acylhalogeniden umgesetzt. Aus den erhaltenen klaren Lösungen wurde das Reagenz am Rotationsverdampfer entfernt. Die anschließende Aminolyse der Säurechloride führte zur Verknüpfung der hydrophoben Gemini-Grundstruktur mit Ethylendiamin **28** als Spacer. Analog der bereits dargelegten Verfahrensweise erfolgte die Umsetzung in abs. Chloroform bei 0 °C unter Zusatz von TEA mit dem für die Umsetzung zweier Acylhalogenidfunktionen je Molekül notwendigen 40fachen Überschuss an Ethylendiamin **28**, womit die Bisacylierung am Diamin vermieden werden sollte (Abb.31). Der per DC verfolgte Reaktionsverlauf wies auch nach mehrstündigem Rühren auf unvollständig umgesetzte Zwischenverbindung in Form von Monoamiden hin, welche selbst durch Ausdehnung der Reaktionsdauer auf 24 Stunden nicht vollständig in die erzielten Diamidverbindungen **126** und **127** überführt werden konnten.

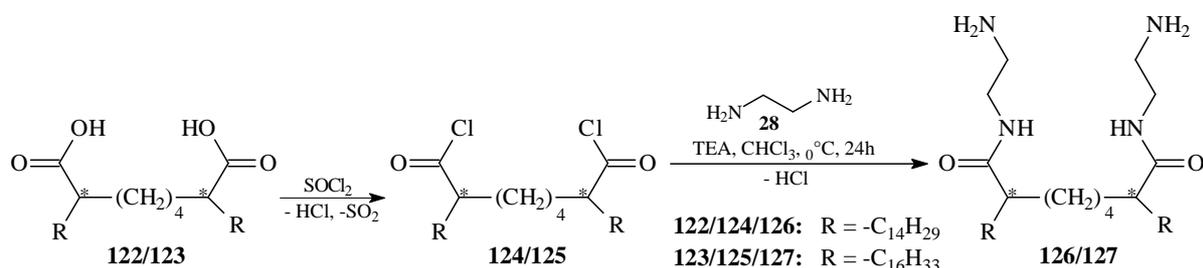


Abb.31: Darstellung der Gemini-Amide **126** und **127** mittels Säurechlorid-Methode

Einem Filtrationsschritt folgend wurde die organische Phase wiederholt mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, erneut filtriert und eingengt. Die säulenchromatographische Reinigung der erhaltenen Rohprodukte wurde anschließend mit einem Lösungs-

mittelgemisch aus Chloroform, Methanol und Ammoniak mit ansteigender Polarität durchgeführt.

Kupplungsreaktion der Gemini-Dicarbonsäuren mit Ethylendiamin unter Verwendung von BOP

Die zweite Methode zur Darstellung der Gemini-Dicarbonsäureamide **126** und **127** unter Verwendung des Kupplungsreagenzes BOP erfolgte entsprechend der analogen Umsetzung der Tetradecylhexadecansäure mit verschiedenen Aminen. Möglichst hohe Ausbeuten sollten dabei durch Vorlage des 40fachen Überschusses Ethylendiamin **28** und langsames Zutropfen einer Lösung aus Di-Carbonsäure, BOP und TEA in Dichlormethan erzielt werden. Das Kupplungsreagenz wurde aufgrund der zwei vorhandenen freien Carboxylgruppen je Molekül im Verhältnis 2:1 zu den Carbonsäuren eingesetzt (siehe *Abb.32*).

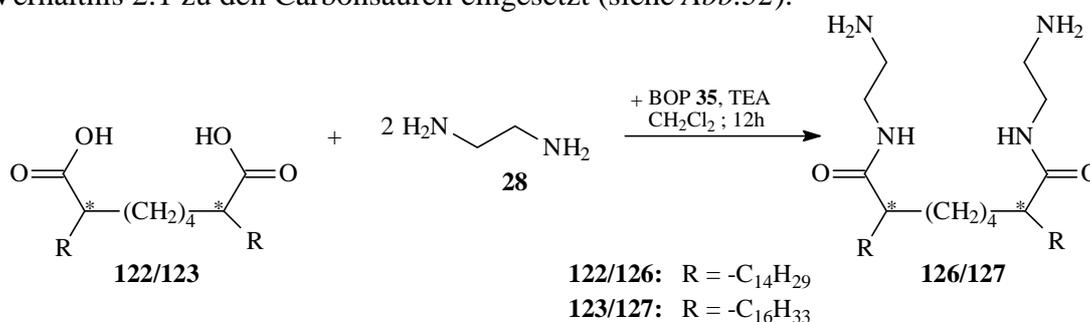


Abb.32: Synthese der Gemini-Dicarbonsäureamide **126** und **127** durch das BOP-Kupplung-Verfahren

Nach einer Dauer von zwölf Stunden erfolgte die Aufarbeitung des Reaktionsansatzes durch Abtrennung des ausfallenden weißen Niederschlags mittels Filtration einschließlich nachfolgenden Ausschüttelns der organischen Phase mit gesättigter Natriumchloridlösung und zweifachem Waschen mit Wasser. Der Trocknung über Na₂SO₄, Filtration sowie Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsvakuumverdampfer schloss sich jeweils die Reinigung der Rohprodukte durch die MPLC mit Chloroform/Methanol/ Ammoniak als Elutionsgemisch aufsteigender Polarität an.

Auf Grund der bereits erwähnten Toxizität des als Zwischenprodukt der BOP-Kupplung entstehenden Hexamethylphosphorsäuretriamids sollte zukünftig die Reaktion zur Darstellung der Gemini-Dicarbonsäureamide **126** und **127** mit PyBOP oder vergleichbaren Reagenzien geringerer Toxizität durchgeführt werden.

2.2.3 Darstellung der Gemini-Lipide mit ungesättigtem Linker

Die Steigerung der Transfektionseffizienz aufgrund stärkerer Wechselwirkung mit der Zell- bzw. Endosomenmembran sollte durch den Einbau eines ungesättigten Linkers in das Gemini-Lipid erreicht werden. Eine hohe Vergleichbarkeit zwischen gesättigtem und ungesättigtem Gemini sollte durch den identischen Molekülbau erreicht werden, so dass sich letztlich beide Verbindungsgruppen nur durch eine Doppelbindung unterscheiden würden. Es wurde ein vergleichbarer Reaktionsweg ausgewählt, welcher sich einzig durch die Art der Verknüpfung zweier Alkylmalonester-moleküle zum Gemini-Lipid von der Synthese der bereits beschriebenen Gemini-Lipide unterscheiden sollte.

2.2.3.1 Synthese der Alkylallylmalonester

Als Ausgangsverbindungen für die Darstellung der Alkylallylmalonester **131** und **132** wurden die Alkylmalonester **6** und **7** eingesetzt, deren Synthese bereits in der vorliegenden Dissertationsschrift beschrieben wurde. Der Tetradecylallyl- und der Hexadecylallylmalonsäurediethylester wurden entsprechend des bisher beschriebenen Alkylierungsverfahrens (siehe 2.1.1.1) unter Darstellung des Malonesteranions als reaktives Zwischenprodukt mittels Natriumhydrid synthetisiert. Anstelle der langkettigen Alkylbromide wurde jedoch Allylbromid als Alkylierungsmittel eingesetzt. Auf Grund der höheren Aktivität des Allylbromids konnte bei geringeren Reaktionstemperaturen und daher folglich in Toluol statt Xylol als Reaktionsmedium gearbeitet werden. Zur Vermeidung der Oxidation an der Doppelbindung wurde die Umsetzung unter Ausschluss von Luftsauerstoff unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt (siehe *Abb.34*).

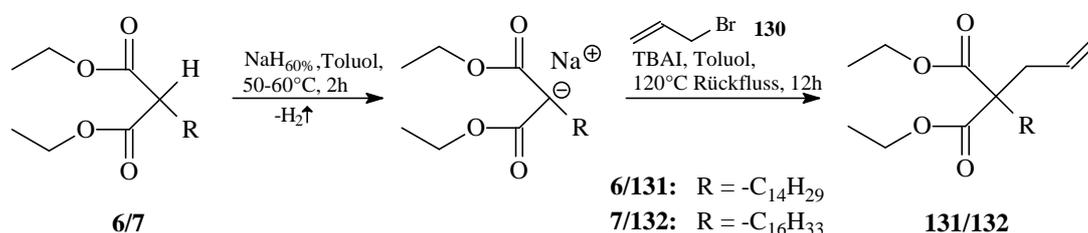


Abb.34: Darstellung der Alkylallylmalonsäurediethylester **131** und **132**

Die Aufarbeitung erfolgte durch einen Waschschrift mit gesättigter Ammoniumchloridlösung sowie zweimaligem Waschen mit Wasser. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat

getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingengt. Anschließend wurden die erhaltenen Produkte **131** und **132** in einer GRUBBS-Kupplung umgesetzt.

2.2.3.2 GRUBBS-Kupplung zur Darstellung der Gemini-Lipid-Struktur mit ungesättigtem Linker

Robert H. GRUBBS vom California Institute of Technology (Caltech) entwickelte metallorganische Katalysatoren („GRUBBS-Katalysatoren“), die für die Olefinmetathese besonders geeignet waren und erhielt dafür im Jahr 2005 den Nobelpreis für Chemie.¹²¹ Bei der Olefinmetathese handelt es sich um eine C-C-Verknüpfungsreaktion, die durch den wechselseitigen Austausch der Alkyldeneinheiten zweier Olefine charakterisiert ist.

Der nach CHAUVIN bezeichnete Mechanismus, der über eine Metall-Carben-Zwischenstufe verlaufenden Metathesereaktion, besteht aus einer Reihe formaler [2+2] Cycloadditions- und Cycloreversionsschritte, welche letztlich zum Alkyldenaustausch führen.^{122,123} Aufgrund der hohen Stabilität gegenüber Sauerstoff, Wasser oder zahlreichen Verunreinigungen in den gängigen Lösungsmitteln und der damit begründeten einfachen Handhabung, wurde ein von GRUBBS entwickelter Rutheniumkatalysator der ersten Generation für die Darstellung des ungesättigten Linkers der Gemini-Lipide ausgewählt.

Die Synthese wurde der Literatur^{124,125} entsprechend durch Lösen der Alkylallylmalonester in Dichlormethan und die langsame Zugabe von zehn Molprozent des ebenfalls in CH₂Cl₂ gelösten GRUBBS-Katalysators Benzylidenbis(tricyclohexylphosphin)dichlororuthenium **133** durchgeführt (siehe *Abb.35*). Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz unter Rühren zunächst über einen Zeitraum von 15 Stunden zum Rückfluss erwärmt. Zur Vermeidung der Oxidation der Doppelbindung wurde unter Argon gearbeitet. Eine nach dem Reaktionszeitraum angefertigte DC in Chloroform zeigte jedoch keine Umsetzung der eingesetzten Malonester. Die Verlängerung der Reaktionsdauer um weitere zehn Stunden unter den gleichen Reaktionsbedingungen führte zu keiner Verbesserung.

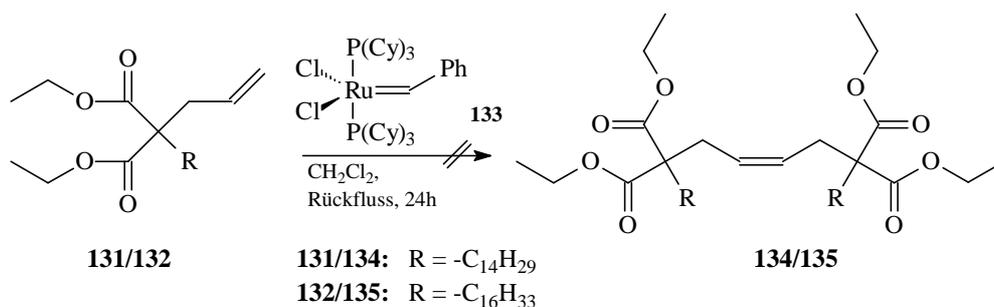


Abb.35: Syntheseversuch zur Darstellung der Gemini-Lipide mit ungesättigtem Linker unter Verwendung eines Grubbs-Katalysators

Da die Edukte durch die Reaktion nicht zerstört wurden, ist eine Aufreinigung dieser und die erneute Umsetzung mit einem Grubbs-Katalysator denkbar. Möglicherweise behinderten jedoch die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten durch sterische Abschirmung die Reaktion, so dass alternativ auch die Bildung der ungesättigten Linkerstruktur im ersten Reaktionsschritt vorstellbar ist, wobei erst im Anschluss daran die langen Alkylketten in das Molekül eingefügt werden.

2.3 Darstellung des Transfektionslipids mit Azomethinstruktur

Die Endozytose gilt als wahrscheinlichster Aufnahmeprozess der kationischen Lipoplexe in das Zellinnere. Daher befindet sich die mit dem Liposom assoziierte DNA intrazellulär in endosomalen Vesikeln. Die geringe Freisetzungsrates der im Endosom eingeschlossenen DNA ins Zytoplasma zählt zu den am stärksten limitierenden Faktoren eines effizienten Gentransfers mittels kationischer Liposomen.^{126,127}

Da Endosomen über ATPase abhängige Protonenpumpen verfügen, erfolgt in ihrem Inneren eine Verringerung des pH-Wertes von 7,4 auf etwa 5,0.⁴ Basierend auf dieser Tatsache und der Erkenntnis, dass die DNA nicht nur aus dem Endosom, sondern auch aus dem Lipoplex freigesetzt werden muss, damit die Zelle transfiziert werden kann, entstand die Idee, säurelabile Lipide zu synthetisieren. BOOMER nutzte dafür in dem bereits beschriebenen Transfektionslipid BCAT eine säureempfindliche Carbamatstruktur.⁶⁶ PRATA hingegen synthetisierte kationische Amphiphile, die im sauren Milieu durch hydrolytische Spaltung von Esterstrukturen eine Ladungsumkehr erfahren und in Folge des nunmehr anionischen Charakters die DNA freisetzen.¹²⁸

Als ideales Strukturelement kam für ein säurelabiles Transfektionslipid die Azomethinfunktion in Betracht. Schiff'sche Basen können bereits mit schwachen Säuren im wässrigen Milieu leicht hydrolysiert werden, so dass die Veränderung der Liposomenstruktur und damit verbunden die Freisetzung der DNA im Endosomeninneren denkbar war.

Folglich sollte durch Überführung der bereits synthetisierten 2-Tetradecylhexadecansäure **22** in den Methylester und anschließende Reduktion der korrespondierende Alkohol dargestellt werden, welcher daraufhin oxidativ zum 2-Tetradecylhexadecanal umgesetzt werden sollte. Im letzten Syntheseschritt war letztlich die Reaktion des Aldehyds mit Tris(2-aminoethyl)amin **38** zum Azomethin geplant.

2.3.1 Veresterung der 2-Tetradecylhexadecansäure

Die Veresterung einer Carbonsäure erfolgt häufig protonenkatalysiert unter Einsatz des entsprechenden Alkohols in Form einer chemischen Gleichgewichtsreaktion.

Der Zusatz einer starken Säure steigert dabei die Reaktionsgeschwindigkeit der sonst nur sehr langsam ablaufenden Reaktion von Carbonsäuren mit Alkoholen, wobei die Veresterungsgeschwindigkeit der Protonenkonzentration direkt proportional ist. Der Einsatz des Alkohols im Überschuss ermöglicht die weitgehend quantitative Umsetzung der Carbonsäure. Ebenso führt der kontinuierliche Entzug des Wassers durch wasserbindende Mittel oder azeotrope Destillation zu einer Erhöhung der Ausbeute.

Die Darstellung des 2-Tetradecylhexadecansäuremethylesters **136** erfolgte, wie in *Abbildung 36* dargestellt, unter Einsatz von überschüssigem Methanol und katalytischem Zusatz von konz. Schwefelsäure entsprechend der im Experimentellen Teil dieser Arbeit beschriebenen Verfahren und nachfolgender Reinigung.

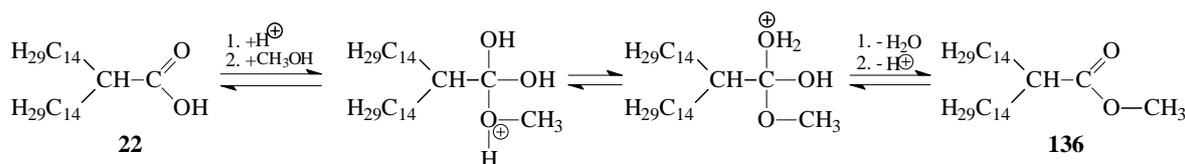


Abb.36: Veresterung der Tetradecylhexadecansäure **22** mit Methanol

DC-Untersuchungen belegten die vollständige Umsetzung der verzweigten Carbonsäure zum Methylester, welcher im darauf folgenden Reaktionsschritt zum korrespondierenden Alkohol reduziert werden sollte.

2.3.2 Reduktion des 2-Tetradecylhexadecansäuremethylesters zum Alkohol

Aufgrund des günstigen Reaktionsverlaufs unter milden Bedingungen wurde für die Umsetzung des Carbonsäureesters **136** zum Alkohol die Verwendung eines Reduktionsmittels auf Hydridbasis in Betracht gezogen. Damit können auch kleine Substanzmengen hervorragend reduziert werden. Ferner ermöglichen Metallhydride die Reaktion ohne Angriff an zusätzlich im Molekül vorhandenen C-C-Mehrfachbindungen und können ebenso reaktionsträge Carbonsäurederivate, wie Ester und Amide reduzieren. Zur Vermeidung der Bildung molekularen Wasserstoffs muss die Reaktion jedoch im wasserfreien Milieu durchgeführt werden.⁷⁴

Das für die Reaktion bevorzugte Lithiumaluminiumhydrid **137**, welches üblicherweise im Verhältnis 0,5:1 zum Ester eingesetzt wird, führt dabei zunächst zur Bildung eines Lithiumaluminiumalkoholatkomplexes, welcher durch protische Lösungsmittel, wie Wasser oder Alkohol, hydrolytisch gespalten wird. Folglich stammen die H-Atome des synthetisierten Alkohols aus dem LiAlH_4 **137**, während das am Sauerstoffatom befindliche Wasserstoffatom, aus dem zur Aufarbeitung verwendeten Lösungsmittel stammt.⁸⁴

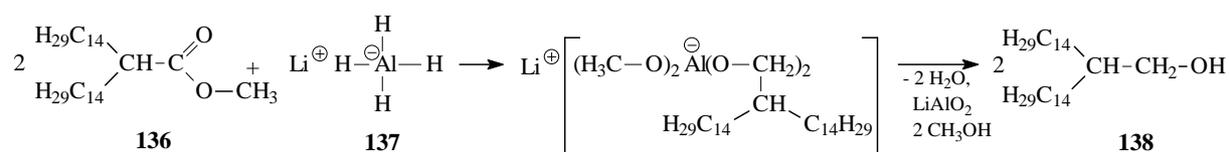


Abb.37: Reduktion des Tetradecylhexadecansäuremethylesters **136** zum korrespondierenden Alkohol **138**

Die üblicherweise zur Reduktion von Estern benötigte Menge an LiAlH_4 musste aufgrund der geringeren Reaktivität der Ausgangsverbindung, basierend auf den langen Alkylketten, verdoppelt werden, so dass folglich die Reduktion des Carbonsäureesters **136** mit Lithiumaluminiumhydrid **137** im Verhältnis 1:1 in wasserfreiem Ether entsprechend dem gängigen Verfahren durchgeführt wurde (Abb.37). Die abschließende DC zeigte die vollständige Reduktion des verzweigten Carbonsäureesters zum 2-Tetradecylhexadecanol **138**. Im nachfolgenden Syntheseschritt sollte dieser nun zum korrespondierenden Aldehyd oxidiert werden.

2.3.3 Oxidation des 2-Tetradecylhexadecanols

Im Gegensatz zu tertiären Alkoholen lassen sich primäre und sekundäre Alkanole leicht unter milden Reaktionsbedingungen oxidieren. Die Aldehydsynthese aus primären Alkoholen kann jedoch durch weitere Oxidation zu Carbonsäuren führen. Die Entstehung dieser unerwünschten Nebenprodukte kann durch destillative Entfernung leicht flüchtiger Aldehyde aus dem chemischen Gleichgewicht gehemmt werden, vorausgesetzt deren Siedetemperatur liegt niedriger als die des korrespondierenden Alkohols. Daneben verhindert der Ablauf der Reaktion in wasserfreiem Medium die Bildung des zur Oxidation zur Säurefunktion notwendigen Aldehydhydrats. Chrom(VI)-Reagenzien, wie Chromtrioxid, Chromsäure und verschiedene Chromate, Mangan-(IV)-oxid, Dimethylsulfoxid und Halogenverbindungen, wie Chlor und Unterchlorige Säure können als Oxidationsmittel eingesetzt werden. Selektive Oxidationen ungesättigter Alkanole können unter Erhalt der Doppelbindung mit Pyridiniumchlorochromat (PCC) oder mit Pyridiniumdichromat (PDC) durchgeführt werden.⁷⁴

Die Verwendung von Chromtrioxid in Kombination mit verdünnter Schwefelsäure und Aceton nach JONES¹²⁹ kam für die Darstellung des Aldehyds nicht in Betracht, da aufgrund des vorhandenen Wassers, wie bereits erwähnt, die Oxidation bis zur Stufe der Carbonsäure erfolgt. Neben dem als COLLINS Reagenz¹³⁰ bezeichneten Chromtrioxid-Dipyridin bietet sich das nach dem Nobelpreisträger COREY¹³¹ benannte Pyridiniumchlorochromat (COREY-Reagenz) als Alternative an. Es zeichnet sich als ein mildes, selektives und stabiles Reagenz für die effiziente Oxidation einer Vielzahl verschiedener Alkohole zu den jeweils korrespondierenden Carbonylen aus.^{132,133}

Die Synthese des 2-Tetradecylhexadecanals **140** (Abb.38) erfolgte nach COREY durch Versetzen des Oxidationsmittels PCC **139** in wasserfreiem Dichlormethan mit 2-Tetradecylhexadecanol **138** und anschließender Aufarbeitung entsprechend dem üblichen Verfahren.¹³¹

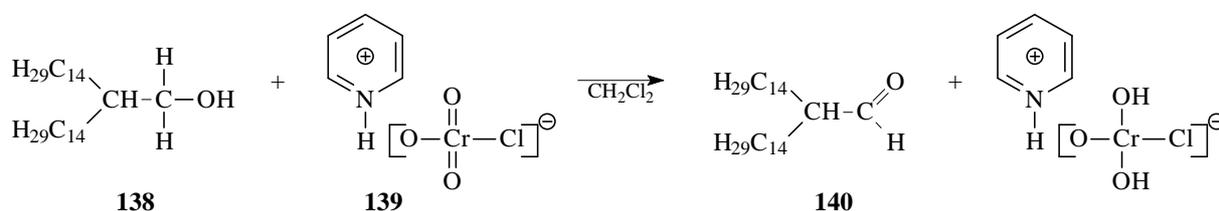


Abb.38: Oxidation des Tetradecylhexadecanols **138** zum korrespondierenden Aldehyd **140** nach COREY^{131,133}

Letztlich konnte das 2-Tetradecylhexadecanal **140** mittels Säulenchromatographie mit einem Elutionsmittelgemisch aus Heptan/Chloroform steigender Polarität gereinigt werden. Zügiges Arbeiten sowie Tiefkühlen des Produktes sollten weitestgehend die Oxidation des Aldehyds zur Carbonsäure durch Sauerstoff verhindern. Das Produkt wurde jedoch nur mit einer Ausbeute von 24 % erhalten.

2.3.4 Darstellung des Azomethins

Aldehyde können häufig bereits unter milden Bedingungen mit stark nucleophilen primären Aminen reagieren, wobei das intermediär entstehende Additionsprodukt instabil und somit im Allgemeinen nicht isolierbar ist. Die Kondensationsreaktion bleibt folglich nicht auf der Stufe des Additionsproduktes stehen, sondern führt durch Abspaltung von Wasser, dessen Sauerstoffatom aus der Carbonylfunktion des eingesetzten Aldehyds stammt, im weiteren Reaktionsverlauf zu einem Carbenium-Immonium-Ion. Dieses wandelt sich in Abhängigkeit von der Anwesenheit eines Protons am Stickstoff in ein stabiles Azomethin oder in ein Enamin um. Gewöhnlich erfolgt die Abspaltung des Protons am Stickstoff leichter als am

β -Kohlenstoff, so dass primäre Amine meist zur Bildung der Azomethinstruktur führen. Für Reaktionen primärer Amine mit geringerer Nucleophilie wird häufig ein Katalysator wie Ameisensäure oder p-Toluensulfonsäure zugesetzt.^{70,74}

Das 2-Tetradecylhexadecanal **140** sollte im abschließenden Syntheseschritt mit Tris(2-aminoethyl)amin **38** in abs. Toluol unter Anwesenheit von p-Toluensulfonsäure als Katalysator zum Azomethin durch Erhitzen unter Rückfluss am Wasserabscheider umgesetzt werden (Abb.39). Leider konnte selbst nach mehrstündigem Erhitzen kein abgeschiedenes Reaktionswasser nachgewiesen werden. Zudem wies die angefertigte Kontroll-DC nur die eingesetzten Ausgangsstoffe aber kein mögliches Reaktionsprodukt auf. Unter Umständen beruhte das Scheitern der Umsetzung auf der hohen Reaktionsträgheit des Aldehyds, verursacht durch die beiden vorhandenen langen Alkylketten.

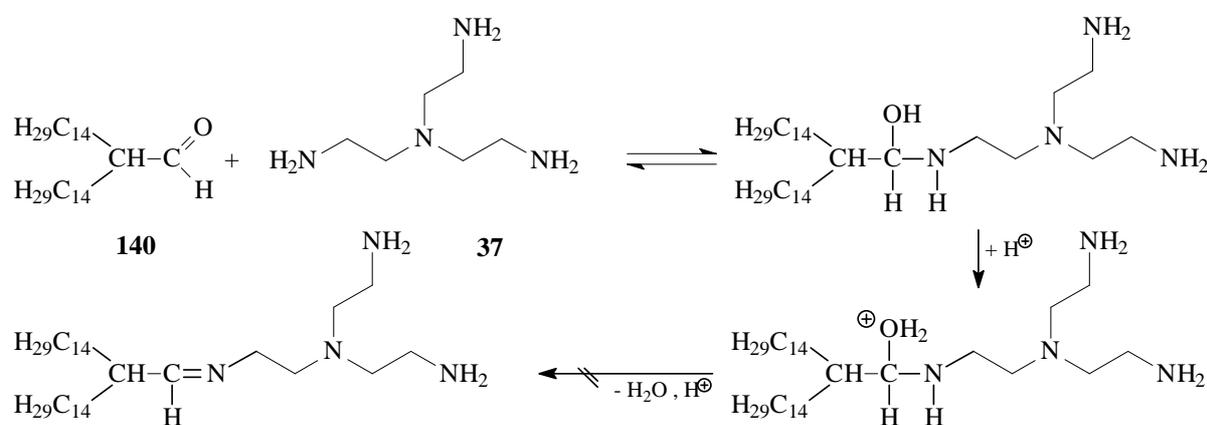


Abb.39: Syntheseversuch zur Darstellung des Azomethins

Folglich könnte in weiterführenden Arbeiten die Synthese des Azomethins durch Reaktion eines kurzkettigen Aldehydmoleküls mit einem Amin zum Azomethin und nachfolgende Einführung der Alkylketten ins Molekül gelingen.

3 Transfektionsuntersuchungen

3.1 Allgemeine Grundlagen des Gentransfers

Die zwei wichtigsten Kriterien für die erfolgreiche Gentransfektion sind Sicherheit und Effizienz – das Gentransfersystem sollte folglich selbst keine Immunantwort des Organismus auslösen, nicht infektiös sein und zu keiner insertionellen Mutagenese führen. Zudem muss der Vehikel in der Lage sein, mit dem therapeutischen Gen zu interagieren und es dabei vor dem enzymatischen Abbau durch Nukleasen sowie gegenüber Wechselwirkungen mit den Bestandteilen von Blut und Gewebsflüssigkeiten zu schützen.¹³⁴⁻¹³⁶ Extra- und intrazelluläre Barrieren (siehe *Abb.40*) können somit die Effizienz des Transportsystems entscheidend beeinflussen. Bisher werden vor allem klinische Applikationen nicht-viraler Gentransfersysteme durch verschiedene extrazelluläre Hindernisse wie geringe Stabilität im Blut, Phagozytose durch Makrophagen, Adhäsion an unerwünschtem Gewebe oder durch Abbau der DNA limitiert. Hat der Vektor erst einmal die Zielzelle erreicht, gilt es weitere Hürden zu überwinden, bis das therapeutische Gen tatsächlich zum eigentlichen Zielort gelangt ist.^{137,138}

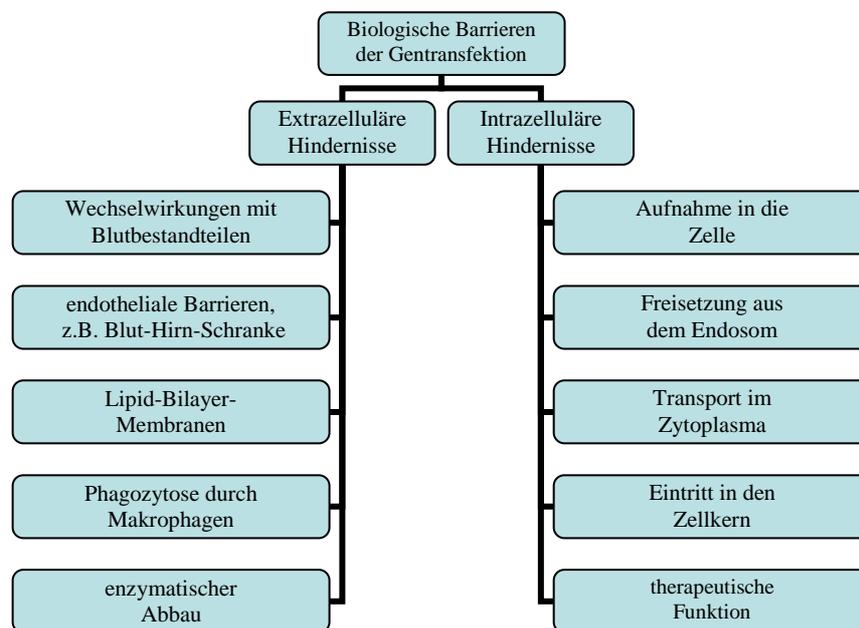


Abb.40: Biologische Barrieren des Gentransfers⁴

Der erste wichtige Schritt zur erfolgreichen Gentransfektion stellt die Aufnahme des Vektors in das Zellinnere dar (*Abb.41*). Elektrostatische Wechselwirkungen unter Beteiligung von Heparinsulfat-Proteoglykanen, welche die Zellmembran bedecken, führen zur Assoziation der meist positiv geladenen Genfähre mit der negativ geladenen Zelloberfläche, womit die

Endozytose kleinerer Partikel mit einem maximalen Durchmesser von 200 nm ermöglicht wird. Die ursprünglich beschriebene Membranfusion lamellarer Strukturen konnte hingegen durch Untersuchungen mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Lipide widerlegt werden, da diese nicht innerhalb der Plasmamembran nachgewiesen werden konnten.¹³⁹

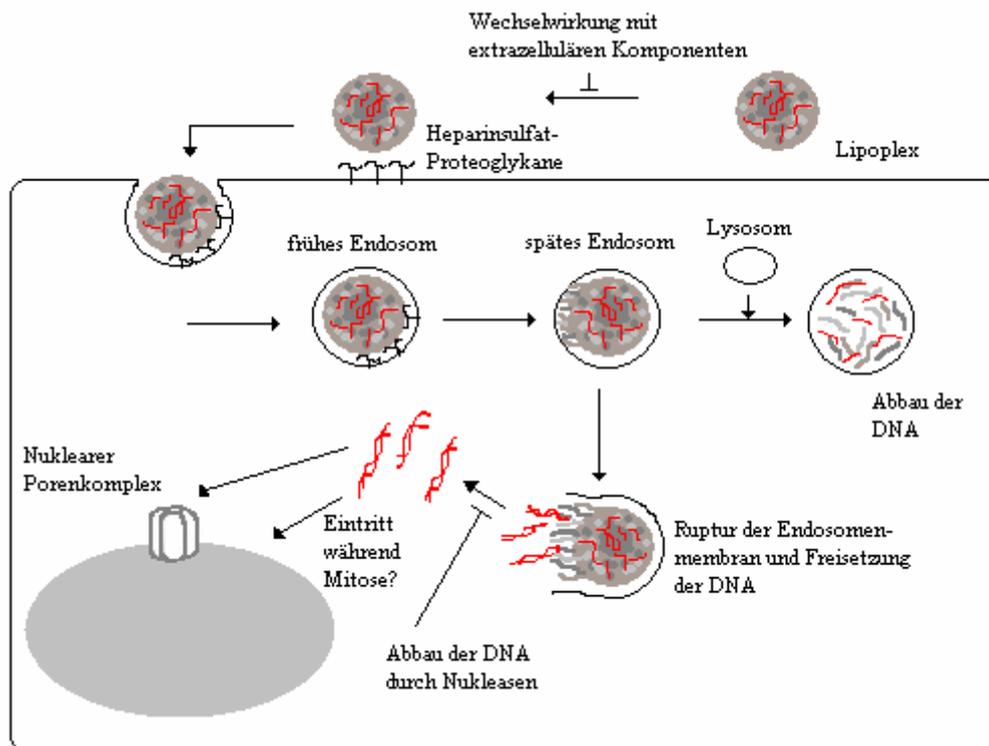


Abb.41: Möglicher Ablauf der Gentransfektion von der Aufnahme der Genfähe in die Zelle bis zum Eindringen der Nukleinsäure in den Zellkern¹³⁸

Die Aufnahme in spezielle Zelltypen gelingt durch Konjugation des Gentransfersystems mit geeigneten Liganden und der daraus folgenden rezeptorvermittelten Endozytose über spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche:^{140,141} Transferrin, Folat, verschiedene Wachstumsfaktoren und Antikörper können zielgerichtet Tumorzellen erreichen, während Kohlenhydrate wie Galactose und Mannose vor allem zur Wechselwirkung mit Rezeptoren auf Hepatocysten und Makrophagen führen.¹⁴²

Einem möglichen Aufnahmeprozess entsprechend befindet sich der DNA beinhaltende Vektor zunächst in der Zelle innerhalb von Endosomen. Diese Vesikel verfügen über ATPase-abhängige Protonenpumpen, die den pH-Wert von 7,4 auf etwa 5 erniedrigen. In späteren Stadien verschmelzen die Endosomen mit Lysosomen, die neben einem geringen pH-Wert von 4,5 bis 5 zusätzlich eine hohe Konzentration an Nukleasen aufweisen. Ein weitestgehender Schutz der DNA vor endosomalem Abbau kann folglich nur durch eine frühzeitige

Freisetzung aus dem Endosom gewährleistet werden. Für die lipid- und polymerbasierten Transportsysteme werden dabei zwei verschiedene Freisetzungswege diskutiert.^{44,143,144} Bei der Lipofektion erfolgt scheinbar eine Fusion lamellarer Lipidstrukturen mit der Endosomenmembran, vermutlich durch Phosphatidylserin, welches von der zytoplasmatischen (nach außen gerichteten) zur luminalen (zum Endosomeninneren gerichteten) Seite des Vesikels wandert.¹²⁶ Lipoplexe, die zusätzlich mit dem Helferlipid DOPE hergestellt wurden, weisen eine hohe Variabilität innerhalb ihrer Morphologie auf, einschließlich der invers-hexagonalen Phase H_{II} , welche die Membranfusion erleichtert und zur Destabilisierung der Membran führt.¹³⁹ *Abbildung 42* zeigt schematisch die lamellare und die invers-hexagonale Struktur der Lipoplexe.

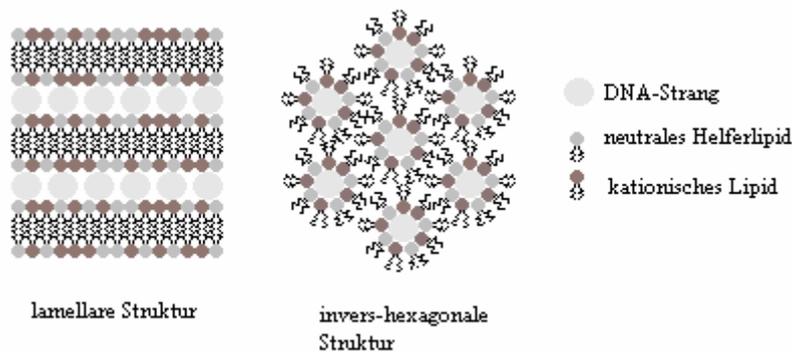


Abb.42: Lamellare und invers-hexagonale Struktur der Lipoplexe¹⁴⁵

Im Gegensatz zur Freisetzung der Lipoplexe aus den Endosomen durch Interaktion mit der Endosomenmembran basiert die Freisetzung der aus Polymeren und DNA zusammengesetzten Polyplexe auf einem anderen Prinzip: POLLARD¹⁴⁶ et al. nutzte die Protonenschwamm-Hypothese als Erklärung für die ausgezeichneten Transfektionsergebnisse PEI-basierter Polymere. Der Protonenschwamm-Effekt wird mit Hilfe des Protonierungsgrades der Polyplexe beschrieben. Bei einem physiologischem pH-Wert von 7,4 liegen nur wenige Stickstoffatome der Polyplexe protoniert vor. In späten Endosomen kommt es über ATPase abhängige Protonenpumpen zum vermehrten Einstrom von Protonen und folglich zu einer Verringerung des pH-Wertes.¹⁴⁷ Ionisierbare Polymere können durch Protonierung weiterer Stickstoffatome den pH-Wert abpuffern, wodurch der Einstrom der Protonen verstärkt wird. Dieser Vorgang induziert den Einstrom von Chloridionen und damit verbunden das Eindringen von Wassermolekülen ins Endosomenlumen. Dieser Osmoseprozess führt zunehmend zum Anschwellen des Vesikels bis dieser letztlich aufplatzt und die Polyplexe aufgrund der Ruptur ins Zytosol freigesetzt werden.^{44,59,148} Dieser Vorgang wurde mit Hilfe der konvokalen Mikroskopie an lebenden Zellen durch MERDAN et al. bestätigt.¹⁴⁹

Nach erfolgter Freisetzung muss die DNA durch das Zytosol hindurch zum Zellkern gelangen. Die Diffusion im viskosen Zellinneren, die wesentlich langsamer verläuft als in verdünnten Lösungen,¹⁵⁰ ist stark von der Molekülgröße abhängig. Folglich gelangen kleinere Plasmide schneller zum Nukleus. Aufgrund der zytosolischen Präsenz calciumsensitiver Nukleasen, die mit einer Halbwertszeit von 50-90min die DNA abbauen und somit gleichfalls eine bedeutsame metabolische Barriere darstellen,^{151,152} erhält die Diffusionsgeschwindigkeit einen entscheidenden Einfluss auf die Transfektionseffizienz. Lipoplexe, welche die DNA teilweise beim Verlassen der Endosomen freisetzen,^{126,153} sind davon stärker abhängig als Polymere, die im Zytosol weiterhin die DNA komplexieren und diese folglich stärker vor enzymatischem Abbau schützen. Des Weiteren konnte für PEI-basierende Gentransfersysteme ein aktiver Transportvorgang über Mikrotubuli in die perinukleare Region nachgewiesen werden.¹⁵⁴

Für den erfolgreichen Gentransfer muss jedoch ein weiteres Hindernis, die Kernmembran, überwunden und die freie oder komplexierte DNA in den Zellkern transportiert werden.¹⁵⁵ Für den Austauschvorgang zwischen Nukleus und Zytoplasma sind Porenkomplexe innerhalb der Kernhülle bedeutsam. Die passive Diffusion durch diesen nuklearen Porenkomplex (NPC) gelingt nur kleinen Partikeln mit einem Durchmesser von 9-11 nm.¹⁵⁶ Proteinstrukturen mit einem Molekulargewicht von mehr als 20 kDa gelangen hingegen durch einen aktiven, ATP-abhängigen Transportprozess, der durch die Reorganisation kurzer Peptidsequenzen ausgelöst wird, in das Kerninnere. Möglicherweise dringen Genvektoren auf einem vergleichbaren Weg in den Nukleus ein.^{157,158} Ferner wird ein Transportmechanismus diskutiert, der auf dem passiven Eintritt der DNA in den Zellkern während der Zellteilung und dem damit verbundenen, vorübergehenden Auflösen der Kernmembran beruht. Die Abhängigkeit der Transfektionseffizienz vom jeweiligen Stadium des Zellzyklus variiert indessen stark bei verschiedenen Gentransfersystemen. Polyplexe aus linearen PEI-Molekülen sind scheinbar gegenüber dem Zellzyklus unempfindlich, während die Transfektionseffizienz Lipofectamine™-haltiger Lipoplexe von den einzelnen Zellteilungsphasen abhängig ist.¹⁵⁹⁻¹⁶¹

Den wichtigsten Transfektionsvorgang stellt jedoch die Freisetzung der DNA aus der Genfahre für die erfolgreiche Transkription dar.¹⁶² Die Interaktion liposomaler Vektoren mit den verschiedenen Membransystemen innerhalb der Zelle führt anscheinend bereits zur Dissoziation der DNA,¹⁶³ während Polysomen die DNA häufig stärker komplexieren und die Transkription infolgedessen behindern. Dieser limitierende Schritt konnte inzwischen durch die Synthese verschiedener abbaubarer Polymerstrukturen beseitigt werden.⁵²

3.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz und Toxizität am Zellkulturmodell

Die verschiedenen Methoden zur Bestimmung der Transfektionseffizienz und der Toxizität der synthetisierten kationischen Lipide an Zellkulturen sowie die physiko-chemische Charakterisierung der erhaltenen Liposomen (bestehend aus kationischem Lipid und Helferlipid) bzw. Lipoplexe (zusammengesetzt aus Liposom und DNA) wurden von Frau Dipl. Pharm. Nicole Erdmann, Mitarbeiterin der AG Biochemische Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. habil Andreas Langner durchgeführt. Für die Realisierung der Lipofektionsversuche wurden zunächst aus den kationischen Lipiden unter Verwendung eines Helferlipids Liposomen formuliert. Neben der Filmbildungsmethode¹⁶⁴ stehen u.a. die Extrusion¹⁶⁵ und die Detergenzdialyse¹⁶⁶ als weitere Herstellungsverfahren zur Verfügung. Letztlich wurde aufgrund der praktikablen, einfachen Versuchsdurchführung die Filmbildungsmethode ausgewählt, welche innerhalb eines Mikroreagenzglases durch Lösen der beiden eingesetzten Lipide in einem Gemisch aus Chloroform und Methanol, Abdestillieren der Lösungsmittel und anschließender Hydratation durchgeführt wurde. Die Partikelgrößen der erhaltenen Liposomen konnten im Anschluss an eine Behandlung im Ultraschall-Bad mittels PCS-Messung bestimmt werden.¹⁶⁷

Die Untersuchungen auf Transfektionseffizienz und Toxizität der synthetisierten Verbindungen wurden an den humanen Hep-G2 Leberkarzinomzellen (aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH des Leibniz Instituts) durchgeführt. Die Liposomenpräparation LipofectamineTM Reagenz (*Invitrogene*), bestehend aus dem Transfektionslipid DOSPA und dem Helferlipid DOPE im Verhältnis 3:1 (m/m), diente als Referenzsubstanz für die Transfektions- und Toxizitätsversuche. Für die Beurteilung möglicher Wechselwirkungen zwischen den Lipoplexen und den im Serum enthaltenen Proteinen erfolgte die Untersuchung der Transfektionseffizienz in serumfreiem und serumhaltigem Medium. Entgegen der Annahme, dass die Transfektionseffizienz durch Wechselwirkung der Lipide mit Serumproteinen verringert wird, zeigten erste Untersuchungen in serumhaltigen und serumfreien Medium vergleichbare Ergebnisse.

Zur Transfektion stand die aus transformierten E.coli-Zellen gewonnene Plasmid-DNA pCMV·sport-β-Gal zur Verfügung. Die Auswertung erfolgte durch die quantitative Bestimmung der Enzymaktivität der β-Galactosidase in transfizierten Zellen.¹⁶⁸

Nach dem Aussäen von 10^5 Zellen je ml und einer 24stündigen Wachstumsphase sollten die eingesetzten Zellen zu 70 % konfluent gewachsen sein, um auswertbare Transfektions-

ergebnisse zu erzielen. Für die Zellversuche wurden daraufhin die Lipoplexe durch Kombination der Liposomendispersion mit der Plasmid-DNA hergestellt und nach 15 Minuten Inkubationszeit zu den Zellen gegeben. Im Anschluss erfolgte die serumfreie Inkubation im Brutschrank über einen Zeitraum von vier Stunden und nachfolgender Zugabe serumhaltigen Mediums, wobei die Serumkonzentration bei 10 % je Well lag. Nach Ablauf eines Gesamtzeitraums von 24 Stunden im Zellkulturschrank wurde ein vollständiger Mediumwechsel durchgeführt.¹⁶⁷

Nach einer Gesamtinkubationsdauer von 48 Stunden und anschließender Zellyse erfolgte die Untersuchung der Transfektionseffizienz mittels ONPG-Assay (ONPG = o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid). Die Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität wurde dabei durch die in transfizierten Zellen ablaufende farbgebende Spaltung des β -Galactosidase-Substrats ONPG und der damit verbundenen Freisetzung des gelbgefärbten o-Nitrophenols durch photometrische Auswertung ermöglicht (siehe *Abb.43*). Die Quantifizierung erfolgte über eine Kalibrierkurve, die letztlich nach Bestimmung der Proteinmenge Rückschlüsse auf die Enzymaktivität und die Transfektionseffizienz gestattete.

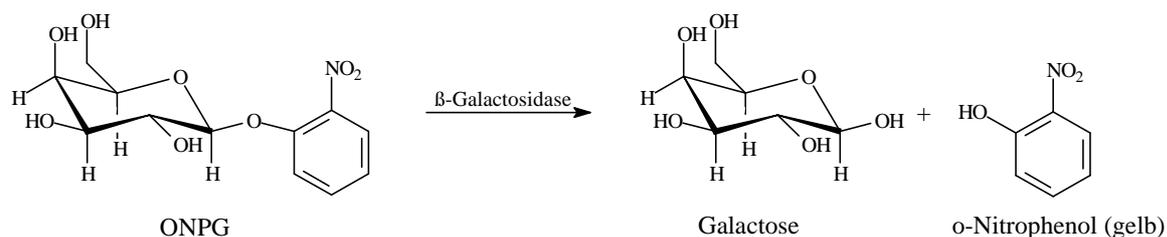


Abb.43: Farbgebendes Reaktionsprinzip des ONPG-Assays

Die im folgenden Diagramm (*Abb.44*) aufgezeigten Ergebnisse der Transfektionsuntersuchungen wurden an der Zelllinie Hep-G2 erhalten. Eingesetzt wurden die Liposomen in der Zusammensetzung Lipid/DOPE 1:2 (n/n) mit dem jeweils optimierten Ladungsverhältnis zwischen positiven und negativen Ladungen (+/-) innerhalb der Lipoplexe. Die Strukturformeln der untersuchten Verbindungen sind in *Abbildung 45* dargestellt.

hydrophoben Molekülteil jedoch um vier Atome verkürzt. Möglicherweise führt diese Verkürzung zu einer verminderten Komplexierung der DNA oder zu veränderten Wechselwirkungen mit der Zell- und Endosomenmembran und daraus folgend einer verringerten Aufnahme des Gentransfersystems in die Zelle bzw. einer erschwerten Freisetzung aus dem Endosom. Bemerkenswert ist dennoch der Vergleich zur Referenzsubstanz Lipofectamine™, dessen Transfektionseffizienz an den Hep-G2-Zellen nur geringfügig höher ist, als bei T₁₆ **50**. Die Auswertung der Transfektionsergebnisse der Verbindungen T₁₆diLys **102**, G₁₆diLys **129**, E₁₆Lys **94** und E₁₄Lys **86** erbrachte ebenfalls unerwartete Erkenntnisse. Die Annahme, dass mit Zunahme der Anzahl freier Aminogruppen im Molekül auch die Transfektionseffizienz gesteigert wird, kann anhand der dargestellten Ergebnisse nicht belegt werden. Die Transfektionslipide G₁₆diLys **129** und T₁₆diLys **102** mit vier freien Aminfunktionen sind vergleichbar effizient wie das E₁₆Lys **94** mit zwei endständigen Aminogruppen. Die Verbindung E₁₄Lys **86** weist trotz der lediglich zwei vorhandenen freien Aminfunktionen dagegen eine höhere Transfektionseffizienz auf. Die Verkürzung der Alkylketten des hydrophoben Molekülteils um zwei C-Atome könnte dabei bedeutsam sein. In zukünftigen Untersuchungen sollte somit der Einfluss der Kettenlänge der Kohlenwasserstoffketten auf die Transfektionseffizienz geklärt werden.

Die notwendige Quantifizierung der durch die Transfektion geschädigten Zellen kann mit Kurzzeitverfahren zur Ermittlung der akuten Toxizität ohne Einbezug möglicher Spätschädigungen oder Reparaturmechanismen in der Zelle aber ebenso durch Langzeittests zur Erfassung der tatsächlichen Überlebensfähigkeit durchgeführt werden.¹⁶⁹ Das zur Charakterisierung der Lipoplexe verwendete MTT-Verfahren ermöglicht schnell und preiswert die Bestimmung der Verträglichkeit der Gentransfersysteme. Die Toxizitätsversuche werden durch photometrische Bestimmung des durch Oxidationsreaktionen aus dem MTT-Reagenz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) entstehenden dunkelblauen Formazan-Produktes (*Abb.46*) ausgewertet.

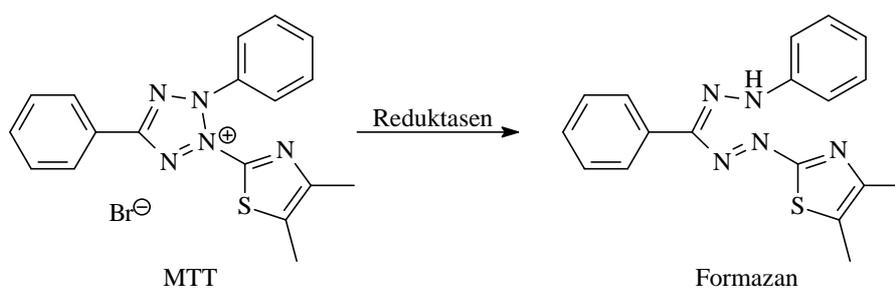


Abb.46: Reduktion des MTT-Reagenz zu Formazan

Diese Oxidationsprozesse erfolgen in lebenden Zellen sowohl durch die pyridinhaltigen Reduktionsäquivalente NADH und NADPH in Abhängigkeit der Aktivität verschiedener Enzyme des Endoplasmatischen Retikulums als auch durch die mitochondrialen Succinat-Dehydrogenasen.^{167,170,171}

Die MTT-Versuche wurden an Hep-G2-Zellen mit den Liposomen der Zusammensetzung Lipid/DOPE 1:2 (n/n) mit dem jeweils optimierten Ladungsverhältnis der Lipoplexe durchgeführt. Aus der graphischen Darstellung der Versuchsergebnisse (Abb.47) wird ersichtlich, dass die Verbindung T₁₆diLys **102** eine gute, mit Lipofectamine™ vergleichbare Verträglichkeit aufweist, während neben T₁₆ **50** vor allem E₁₄Lys **86**, das eine hohe Transfektionseffizienz zeigt, die Viabilität der Zellen wesentlich stärker negativ beeinflusst. Grundsätzlich sind Veränderungen der Zellmembran durch Einbau der Lipide als toxischer Einfluss denkbar.

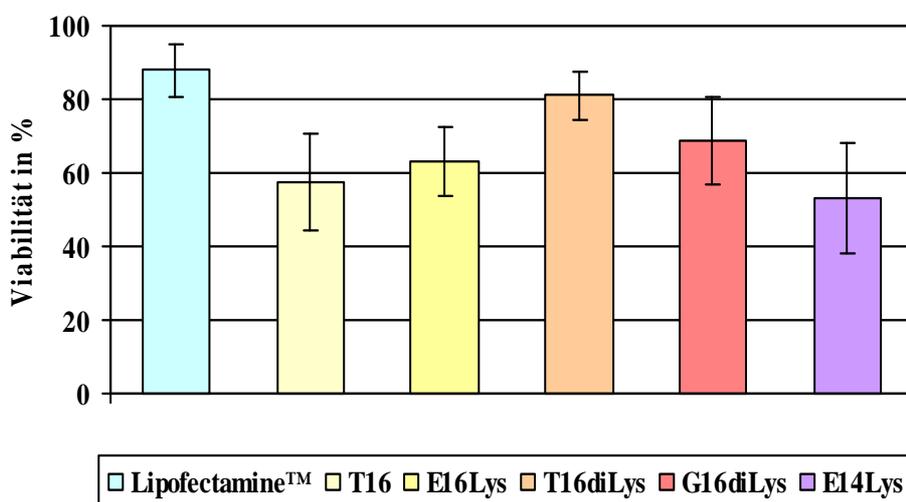


Abb.47: MTT-Ergebnisse der Lipide T₁₆ (2), E₁₆Lys (1,5), T₁₆diLys (3,5), G₁₆diLys (3,5) und E₁₄Lys (2,5) jeweils mit der Zusammensetzung Lipid/DOPE 2:1 (n/n) an Hep-G2-Zellen bei optimierten Ladungsverhältnissen der Lipoplexe (in Klammern +/-) sowie n = 3 Versuchen gegenüber dem Standard Lipofectamine™¹⁶⁷

Die Ursache für die verminderte Verträglichkeit des E₁₄Lys **86** könnte jedoch ebenso die gesteigerte Produktion des Genproduktes sein, welches in höheren Konzentrationen unter Umständen zur Schädigung der Zelle führt.¹⁶⁷ Zusätzliche Untersuchungen mit E₁₄Lys **86** zum Einfluss des Helferlipidanteils der Liposomen und der Ladungsverhältnisse der Lipoplexe an der Hep-G2-Zelllinie untermauern diese Erkenntnis.

Die Verwendung von DOPE als Helferlipid führte dabei zu einer vielfach besseren Transfektionseffizienz im Vergleich zu cholesterolhaltigen Liposomen. Mit der Zusammen-

setzung der Liposomen aus E₁₄Lys **86** und DOPE im Verhältnis 1:2 wurde die höchste, im Vergleich zu Lipofectamine™ dreifach höhere Transfektionsrate erreicht (Abb. 48).

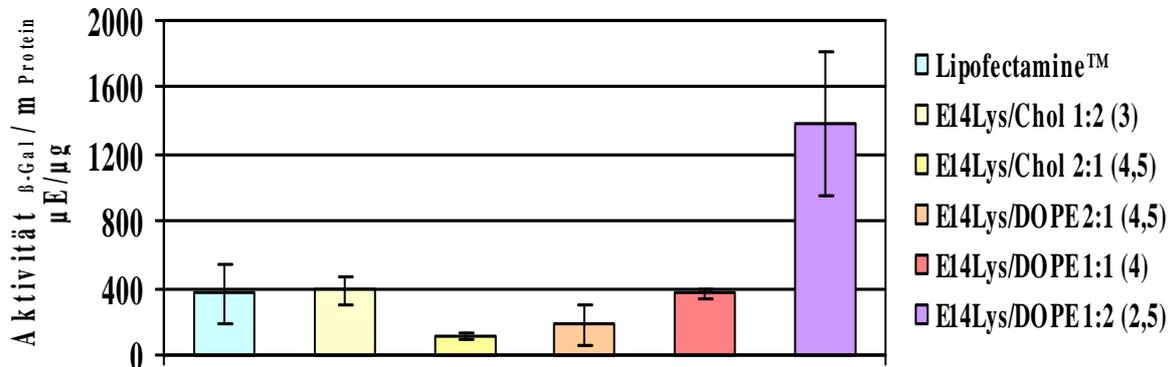


Abb.48: Transfektionseffizienz der Lipoplexe aus E₁₄Lys **86** unter Einsatz von Cholesterol (Chol) und DOPE als Helferlipide in unterschiedlicher Zusammensetzung der Liposomen an Hep-G2-Zellen bei optimierten Ladungsverhältnissen der Lipoplexe (in Klammern +/-) sowie n = 3 Versuchen gegenüber dem Standard Lipofectamine™¹⁶⁷

Die Ergebnisse der Toxizitätstests, dargestellt in *Abbildung 49*, deuten erneut auf einen Zusammenhang zwischen Transfektionseffizienz und Zelltoxizität hin. Die Liposomen aus E₁₄Lys **86** und Cholesterol im Verhältnis 1:2 erreichten eine höhere Transfektionseffizienz als Liposomen der gleichen Komponenten im Verhältnis 2:1. In den Toxizitätsversuchen führte der geringere Cholesterolanteil zu einer verminderten Zellviabilität. Die Auswertung der Transfektions- und Toxizitätsversuche der DOPE-haltigen Liposomen führte zu vergleichbaren Ergebnissen.

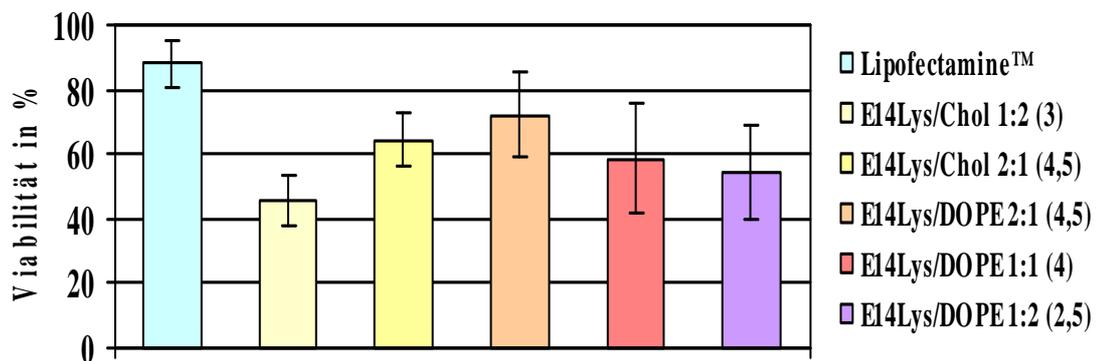


Abb. 49: Toxizität der Lipoplexe aus E₁₄Lys **86** unter Zusatz von Cholesterol (Chol) und DOPE als Helferlipide in unterschiedlicher Zusammensetzung der Liposomen an Hep-G2-Zellen bei optimierten Ladungsverhältnissen der Lipoplexe (in Klammern +/-) sowie n = 3 Versuchen gegenüber dem Standard Lipofectamine™¹⁶⁷

Die Variation des Ladungsverhältnisses zwischen E₁₄Lys und DNA führte in den Transfektionsuntersuchungen zu folgendem Resultat: das Verhältnis positiver zu negativer Ladung von 2,5 erzielte das beste Transfektionsergebnis an den Hep-G2-Zellen (Abb.50).

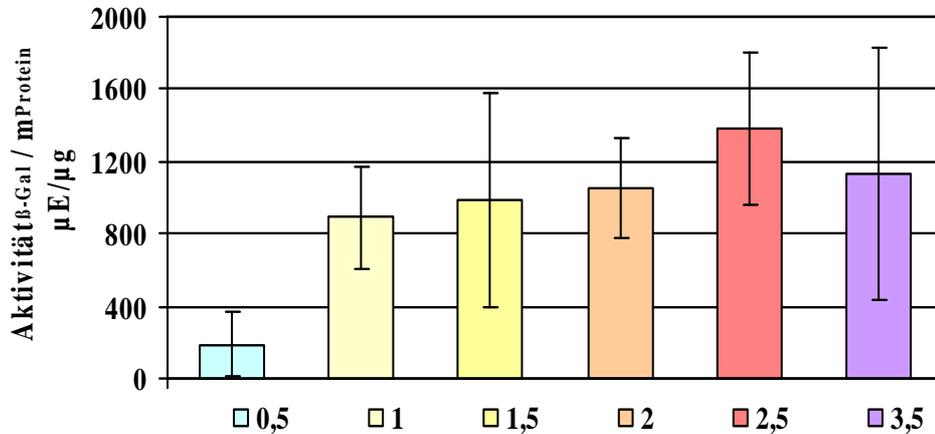


Abb.50: Transfektionseffizienz der Lipoplexe aus E₁₄Lys **86** mit DOPE als Helferlipid im Verhältnis 1:2 (n/n) unter Variation des Ladungsverhältnisses (+/-) zwischen Lipid und DNA an Hep-G2-Zellen bei n = 3 Versuchen¹⁶⁷

Das Ladungsverhältnis von 0,5 führte, vermutlich verursacht durch Abstoßungskräfte an der Zelloberfläche, zur geringsten Transfektionsrate. Mit Zunahme positiver Ladungen konnte die Transfektionseffizienz bis zu einem Optimum bei einem Ladungsverhältnis von 2,5 gesteigert werden. Eine weitere Erhöhung der Anzahl positiver Ladungen im Lipoplex führte letztlich zu einer Verminderung der Transfektionseffizienz.

Die MTT-Versuche unter Variation des Ladungsverhältnisses zwischen E₁₄Lys und der DNA, dargestellt in *Abbildung 51*, deuten erneut auf einen Zusammenhang zwischen Zunahme der Transfektionseffizienz und Erhöhung der Zytotoxizität hin.

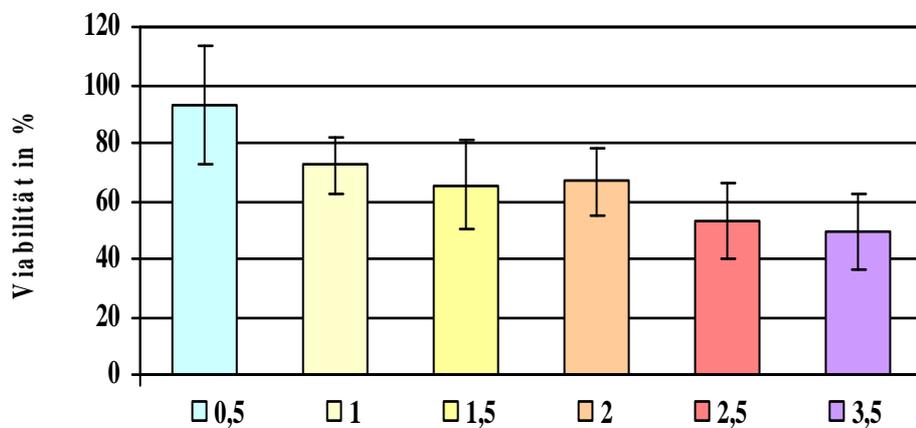


Abb. 51: Zytotoxizität der Lipoplexe aus E₁₄Lys **86** mit DOPE als Helferlipid im Verhältnis 1:2 (n/n) unter Variation des Ladungsverhältnisses (+/-) zwischen Lipid und DNA an Hep-G2-Zellen bei n = 3 Versuchen¹⁶⁷

Lipoplexe mit dem insgesamt negativen Ladungsverhältnis von 0,5 (+/-), die nur eine geringe Transfektionseffizienz aufwiesen, erzielten die höchste Zellviabilität. Mit der Steigerung der Transfektionsraten bei Lipoplexen mit höherem Anteil positiver Ladungen nahm die Überlebensfähigkeit der Zellen ab.

Abschließend können die Ergebnisse der Transfektionsversuche am Zellkulturmodell folgendermaßen zusammengefasst werden:

- an der Hep-G2-Zelllinie übertrafen die Transfektionsraten der untersuchten Verbindungen die Transfektionseffizienz von Lipofectamine™ um ein Vielfaches oder waren zumindest vergleichbar,
- mit Zunahme der Transfektionseffizienz verringerte sich meist die Zellviabilität, T₁₆ **50** und T₁₆diLys **102** zeigten jedoch davon abweichende Untersuchungsergebnisse
- der Aufbau der einzelnen Molekülbausteine der Lipide beeinflusste zum Teil stark die Transfektionseffizienz, so führte die Verkürzung der Kettenlängen des hydrophoben Molekülteils um jeweils zwei C-Atome ebenso wie die Verlängerung des Abstandes zwischen dem hydrophoben Molekülteil und den endständigen Aminogruppen zu einer deutlichen Steigerung der Transfektionseffizienz
- die Verwendung des Helferlipids DOPE wurde aufgrund sehr guter Transfektionsergebnisse, basierend auf der hohen Molekülbeweglichkeit sowie der Variabilität der Lipoplexmorphologie und der daraus resultierenden verbesserten Aufnahme der Lipoplexe in die Zelle durch Destabilisierung der Zellmembran,¹³⁹ favorisiert,
- die Kombination von E₁₄Lys **86**, dessen hydrophober Molekülteil aus starren Alkylketten besteht, mit dem ebenfalls starren Cholesterolemolekül als Helferlipid führte dagegen zu einer deutlich geringeren Transfektionseffizienz,
- das Lipid E₁₄Lys **86**, dessen hydrophober Molekülteil aus zwei Tetradecylkohlenstoffketten besteht und über einen Ethylendiaminspacer mit einem Lysinmolekül verbunden ist, erzielte in Kombination mit DOPE als Helferlipid im Verhältnis 1:2 nach Zugabe der DNA bei einem Ladungsverhältnis von 2,5 (+/-) im Lipoplex die besten hier vorgestellten Transfektionsergebnisse.

4 Physiko-chemische Charakterisierung der Transfektionslipide

Die physiko-chemische Charakterisierung der synthetisierten kationischen Transfektionslipide erfolgte mit der Differentialkalorimetrie und den LANGMUIR'schen Experimenten durch Herrn B.sc. Chris Brauer, Herrn Dr. Matthias Dittrich und weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Gerald Brezesinski des Max-Planck-Instituts für Kolloid- und Grenzflächenforschung Golm. In den nachfolgenden Ausführungen werden die Ergebnisse ausgewählter Verbindungen und die daraus geschlossenen Erkenntnisse dargestellt.

4.1 Ergebnisse der Differentialkalorimetrie

Die dynamische Differentialkalorimetrie (Differential Scanning Calorimetry - DSC) ermöglicht es, durch schrittweise Erhöhung der Temperatur die Lage und den Energiegehalt von Phasenübergängen innerhalb der Lipide darzustellen. Während einer physikalischen Zustandsänderung der Probensubstanz wird Wärme-Energie mit der Umgebung ausgetauscht. Diese Wärmeenergie wird mit dem Differentialkalorimeter gemessen, indem der Zustand der Probe permanent mit dem Zustand einer inerten Referenzprobe verglichen wird. Die Temperatur von Probe und Referenzmaterial wird dabei stufenweise erhöht¹⁷²

Auf diese Weise kann der Übergang von der Gelphase, in der die Kohlenstoffketten der Lipiddoppelschicht parallel angeordnet sind und über eine stark eingeschränkte Beweglichkeit verfügen, in den flüssigkristallinen Zustand mit meist ungeordneten und beweglicheren Alkylketten ausgewertet werden. In der Gelphase liegt die Lipiddoppelschicht in einem ungeneigten (L_{β}) oder geneigten ($L_{\beta'}$) Zustand vor. Die Beweglichkeit der Alkylketten erhöht sich beim Phasenübergang, so dass die Doppelschicht in der flüssigkristallinen Phase L_{α} ungeordnet vorliegt (siehe *Abb.52*)¹⁷³

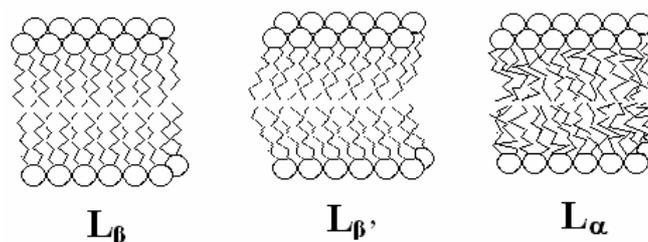


Abb.52: Lipiddoppelschichten im ungeneigten (L_{β}) und geneigten ($L_{\beta'}$) geordneten Zustand der Gelphase und dem ungeordneten Zustand in der flüssig-kristallinen Phase¹⁷³

Mit Hilfe der DSC wurden vier verschiedene Verbindungen als Reinsubstanzen und in Kombination mit den Helferlipiden Cholesterol und DOPE in variierenden Zusammensetzungen untersucht. Die eingesetzten Lipide E_{14/16} (**46**), T_{14/16} (**49**), E_{14/16}Lys (**93**) und T_{14/16}diLys (**101**) unterschieden sich in der Größe der Kopfgruppen und der Anzahl ladungstragender Aminogruppen. In *Abbildung 53* sind die von Herrn Chris Brauer angefertigten DSC-Spektren der einzelnen Verbindungen dargestellt. Die DSC-Untersuchungen erfolgten in wässrigen Suspensionen mit einer Konzentration von 1mg/ml bei pH = 7.¹⁷⁴

Verbindung **46** besitzt eine sehr kleine Kopfgruppe und weist eine hohe Phasenübergangstemperatur von 83 °C auf, während die Transfektionslipide **49** und **93** bei einer Temperatur zwischen 18 und 31 °C einen Phasenübergang aufweisen. Für das Lipid **101** mit der größten polaren Kopfgruppe der vier untersuchten Verbindungen liegt der Phasenübergang vermutlich ausserhalb des Messbereichs. Es wird deutlich, dass die Umwandlungstemperatur mit zunehmender Größe der polaren Kopfgruppe sinkt. Große polare Kopfgruppen behindern anscheinend die Ausbildung einer dreidimensional geordneten Struktur der Lipiddoppelschicht durch die Verminderung der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Alkylketten, so dass sich der Übergang von der L_β-Phase zur L_α-Phase einfacher vollzieht.¹⁷⁴ Dies belegen ebenso die DSC-Spektren der Lipide **49** und **93**, welche eine in Polarität und Größe ähnliche Kopfgruppe aufweisen und deren Übergangstemperatur um 5 K von einander abweicht.

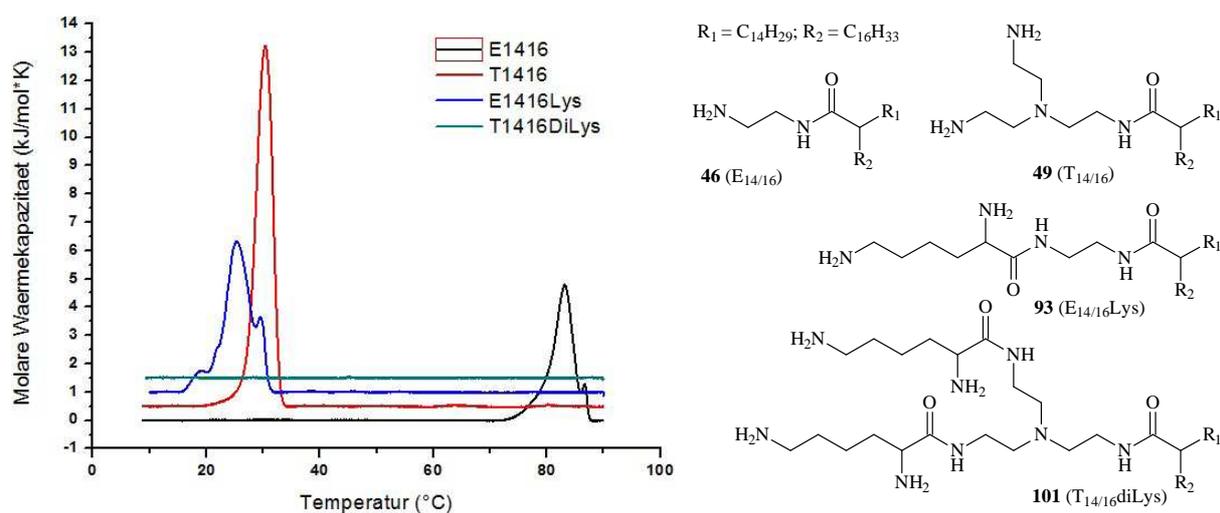


Abb.53: DSC-Spektren der Lipide **46/49/93** und **101** ($c = 1$ mg/ml) bei einer Heizrate von 60 K/h und pH = 7. Die Kurven wurden jeweils um 0,5 kJ/mol·K zueinander verschoben¹⁷⁴

Für die Gentransfektion werden Liposomen eingesetzt, welche vorwiegend aus einem Transfektionslipid und einem Helferlipid hergestellt werden. Mit Hilfe der DSC sollte geklärt werden, welchen Einfluss das verwendete Helferlipid bzw. dessen Anteil am Liposom auf die Phasenübergangstemperatur hat und inwiefern daraus Rückschlüsse auf die Effizienz des Gentransfers gezogen werden können. In *Abbildung 54* wird deutlich, dass die Verwendung von Cholesterol oder DOPE in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis sowohl zu einer Verringerung der Umwandlungstemperatur um etwa 4 K als auch zu einer Verminderung der Enthalpie ΔH_m von 23,4 KJ/mol ($E_{14/16}$) auf 1,9 KJ/mol (2:1 $E_{14/16}$ /Chol) und auf 0,3 KJ/mol (1:1 $E_{14/16}$ /Chol) führte. Bei einem Verhältnis von 1:2 ($E_{14/16}$ /Chol) bzw. 1:1 ($E_{14/16}$ /DOPE) verschwand die Umwandlung vollständig.

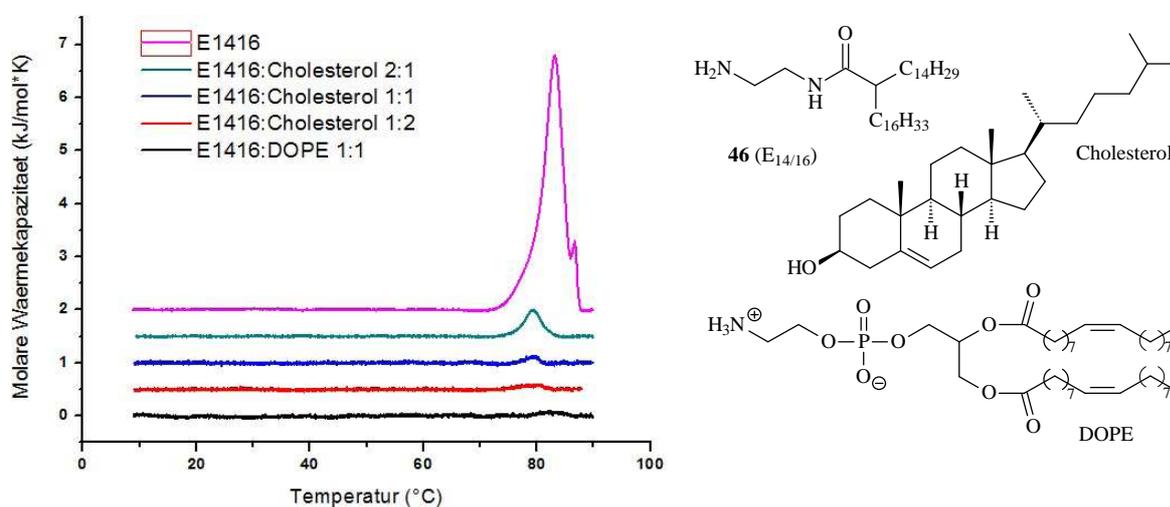


Abb.54: Einfluss der Helferlipide Cholesterol und DOPE auf die Übergangstemperatur des 2-Tetradecyloctadecansäure-(2-aminoethyl)amids **46** ($c_{\text{gesamt}} = 1 \text{ mg/ml}$) bei einer Heizrate von 60 K/h und $\text{pH} = 7$. Die Kurven wurden jeweils um 0,5 kJ/mol*K zueinander verschoben ¹⁷⁴

Der Einfluss der Helferlipide auf das Phasenumwandlungsverhalten der Transfektionslipide kann mit dem gestörten Aufbau der gelartigen Struktur erklärt werden. Mit steigendem Anteil an Helferlipid steigt die Fluidität innerhalb der Seitenketten, wobei die Änderung der Enthalpie sich verringert bis sie letztlich so klein wird, dass das Lipid permanent im flüssigkristallinen Zustand vorliegt. ¹⁷⁴

4.2 Monoschicht-Experimente

Die LANGMUIR'schen Versuche wurden mittels der Filmwaagenmethode einschließlich BREWSTERwinkel-Mikroskopie (Brewster Angle Microscopy = BAM) und Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS) durchgeführt werden. Die Ergebnisse sollten den Zusammenhang zwischen der Transfektionsrate und dem Monoschichtverhalten der Lipide belegen.

Die Filmwaagenmethode stellt eine Möglichkeit dar, unlösliche, monomolekulare Filme auf einer Flüssigkeitsoberfläche, sogenannte LANGMUIR-Monoschichten, zu untersuchen. Die amphiphilen Transfektionslipide halten sich durch ihre hydrophilen und lipophilen Molekülbestandteile zum größten Teil an der Grenzfläche zwischen Wasser und Luft auf, wodurch eine Charakterisierung unter Verwendung der LANGMUIR Filmwaage (siehe *Abb. 55*) möglich ist.

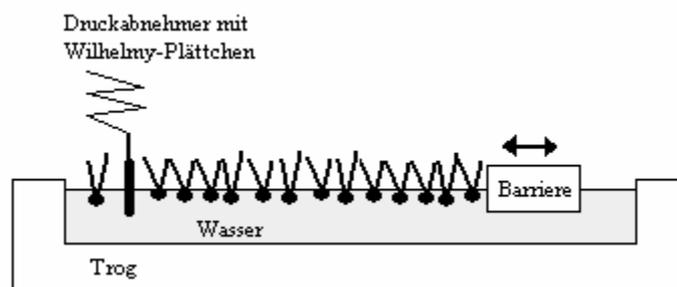


Abb.55: Schematische Darstellung der Filmwaagenmethode¹⁷²

Die Filmwaage besteht aus einem flachen Trog und einer Barriere, welche direkt auf Höhe der Flüssigkeitsoberfläche bewegt wird. Zudem taucht ein Wilhelmy-Plättchen in die wässrige Phase ein, welches durch das Wasser benetzt wird. Die Kraft, die dabei auf das Plättchen wirkt, wird erfasst und dient als Grundlage zur Ermittlung der Oberflächenspannung. Der Oberflächendruck π wird letztlich als Differenz zwischen der Oberflächenspannung des reinen Lösungsmittels γ und des Transfektionslipids γ^* ermittelt ($\pi = \gamma^* - \gamma$).¹⁷² Die Monoschichten der Transfektionslipide gehen vom gasartigen Zustand zum flüssigexpandierten, später zum geneigt kondensierten und letztlich zum ungeneigt kondensierten Zustand über, indem die Barriere auf der Flüssigkeitsoberfläche verschoben wird und damit die zur Verfügung stehende Fläche für die Moleküle verringert wird. In Folge der räumlichen Nähe werden die Wechselwirkungen zwischen den amphiphilen Molekülen verstärkt, wodurch der Oberflächendruck steigt. Dabei ist der Phasenwechsel zwischen flüssigexpandiertem und kondensiertem Zustand meist durch ein Plateau im Diagramm gekennzeichnet (siehe *Abb.56*).¹⁷⁵

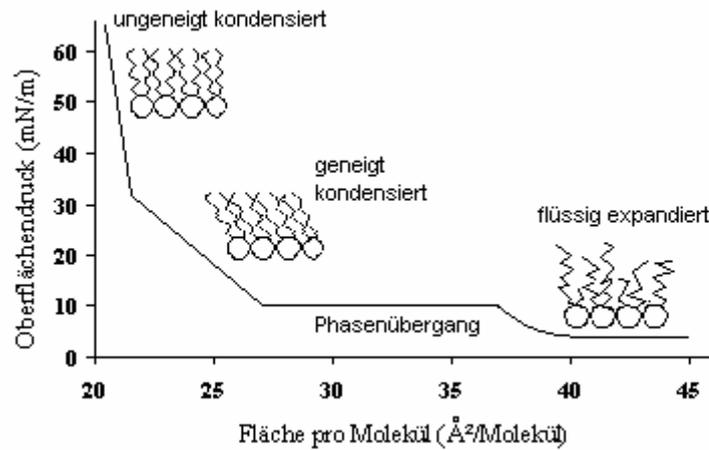


Abb.56: Darstellung einer beispielhaften Isotherme einer Langmuir Monoschicht von der flüssig expandierten zur ungeneigt kondensierten Phase¹⁷⁵

Die Morphologie von Oberflächenfilmen an der Grenzfläche zwischen Wasser und Luft kann durch die BREWSTERwinkel-Mikroskopie sichtbar gemacht werden, indem laterale Unterschiede des Brechungsindex und/oder der Schichtdicke des Films erkennbar werden. Folglich können auch Prozesse wie Phasenübergänge und Wachstum von Domänen innerhalb der Oberflächenfilme untersucht werden.¹⁷⁶ Der als BREWSTERwinkel bezeichnete Einfallswinkel des parallel zur Einfallsebene polarisierten, sichtbaren Lichts, bei dem an der Grenzfläche zwischen wässriger und gasförmiger Phase keine Reflexion erfolgt, wird durch die Brechungsindices dieser beiden Phasen bestimmt.¹⁷⁷

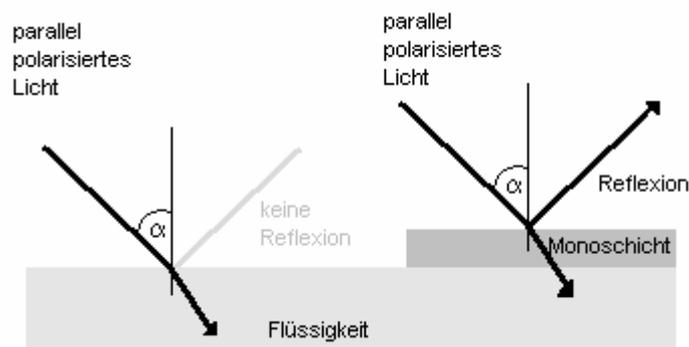


Abb.57: Physikalisches Prinzip der BREWSTERwinkelmikroskopie (BAM) an der Monoschicht¹⁷⁸

Für die Grenzfläche zwischen Wasser und Luft beträgt der Brewsterwinkel der Gleichung $\tan \alpha_B = n_2/n_1$ entsprechend $53,1^\circ$. Wird nun auf die Wasseroberfläche ein Film aufgebracht, ändert sich der Brechungsindex der Oberfläche, womit das Brewster-Gesetz nicht mehr erfüllt ist und der einfallende Lichtstrahl reflektiert wird. Die auftretende Reflexion, welche von den Eigenschaften der Monoschicht abhängig ist, wird von einer Kamera aufgezeichnet.¹⁷⁸⁻¹⁸²

In *Abbildung 58* sind die Isothermen der Verbindungen E_{14/16} und E_{14/16}Lys aufgezeigt, während die BAM-Aufnahmen der Lipide in den *Abbildungen 59* und *60* dargestellt sind.

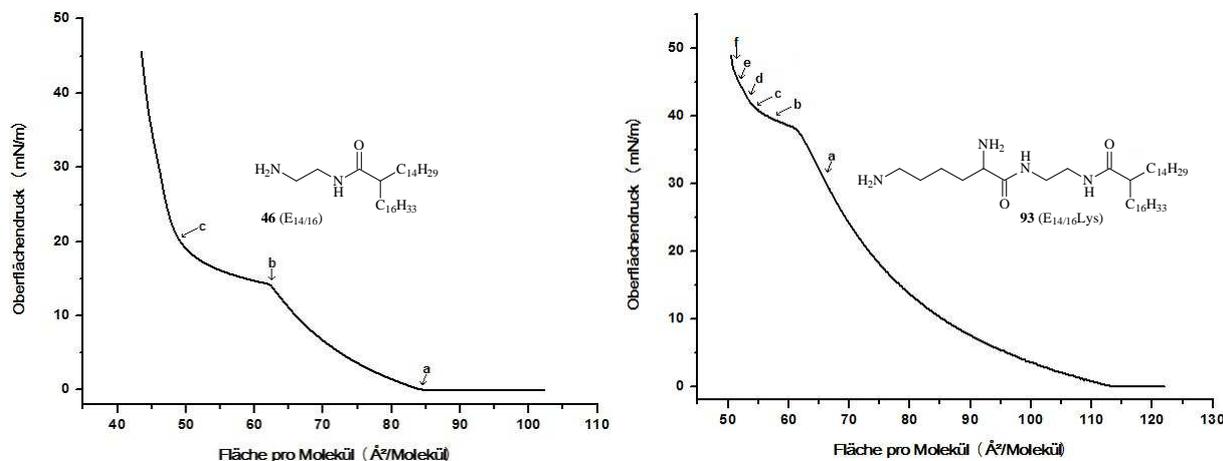


Abb.58: Isothermen der Transfektionslipide E_{14/16} (links) und E_{14/16}Lys (rechts) auf Wasser bei 20 °C und einer Kompressionsgeschwindigkeit von 5 Å²/Molekül min¹⁷⁴

Der Isotherme der Verbindung **46** lässt sich entnehmen, dass sich ab einer Fläche von etwa 62,3 Å²/Molekül und einem Oberflächendruck von 14 mN/m nahezu ein Plateau ausbildet. Dieses stellt den Zustand der Koexistenz zwischen flüssigexpandierter und kondensierter Phase dar (siehe IRRAS-Untersuchung im nachfolgenden Absatz) und endet etwa bei einer Fläche von 50 Å²/Molekül und einem Druck von ca. 20 mN/m. Dort liegt die Monoschicht vollständig kondensiert vor, weshalb der Oberflächendruck bei weiterer Kompression rasch ansteigt. Die BAM-Aufnahmen in *Abbildung 59* deuten auf einen vergleichbaren Ablauf hin. Zunächst beginnt sich bei einem geringen Druck von 0,1 mN/m eine netzartige Lipidstruktur zu bilden. Bei einem Druck von 15 mN/m ist bereits eine dichte Lipidstruktur zu erkennen die letztlich bei einem Druck von etwa 20 mN/m in Form kondensierter Domänen die gesamte Oberfläche nahezu komplett bedeckt.

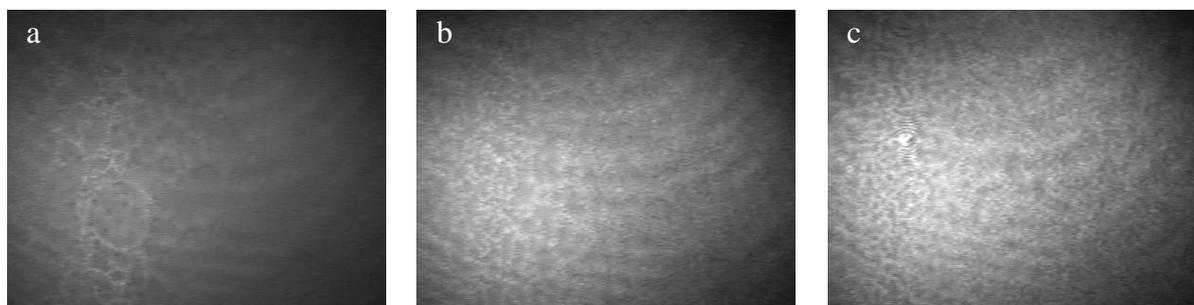


Abb.59: BAM-Ausschnitte mit einer Größe von 586 x 586 µm der Verbindung E_{14/16} (**46**) bei verschiedenen Oberflächendrücken: $\pi = 0,1$ mN/m (a), $\pi = 15$ mN/m (b), $\pi = 20$ mN/m (c)¹⁷⁴

Die Isotherme des 2-Tetradecyloctadecansäure-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]-amids (**93**) zeigt nur annähernd die Bildung eines Plateaus, das im Vergleich zur Isothermen des 2-Tetradecyloctadecansäure-(2-aminoethyl)amids (**46**) bei einer nahezu identischen Fläche von $61,3 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ aber einem deutlich höheren Oberflächendruck von 38 mN/m beginnt. Die BAM-Aufnahmen des $\text{E}_{14/16}\text{Lys}$ (**93**) in *Abbildung 60* zeigen das kontinuierliche Wachstum der Domänen bis letztlich bei einem Oberflächendruck von etwa 43 mN/m die gesamte Oberfläche mit der kondensierten Lipidmonoschicht bedeckt ist. Der rapide Druckanstieg der Isothermen deutet ebenfalls auf das Vorliegen der kondensierten Phase der Monoschicht bei diesem Oberflächendruck hin.

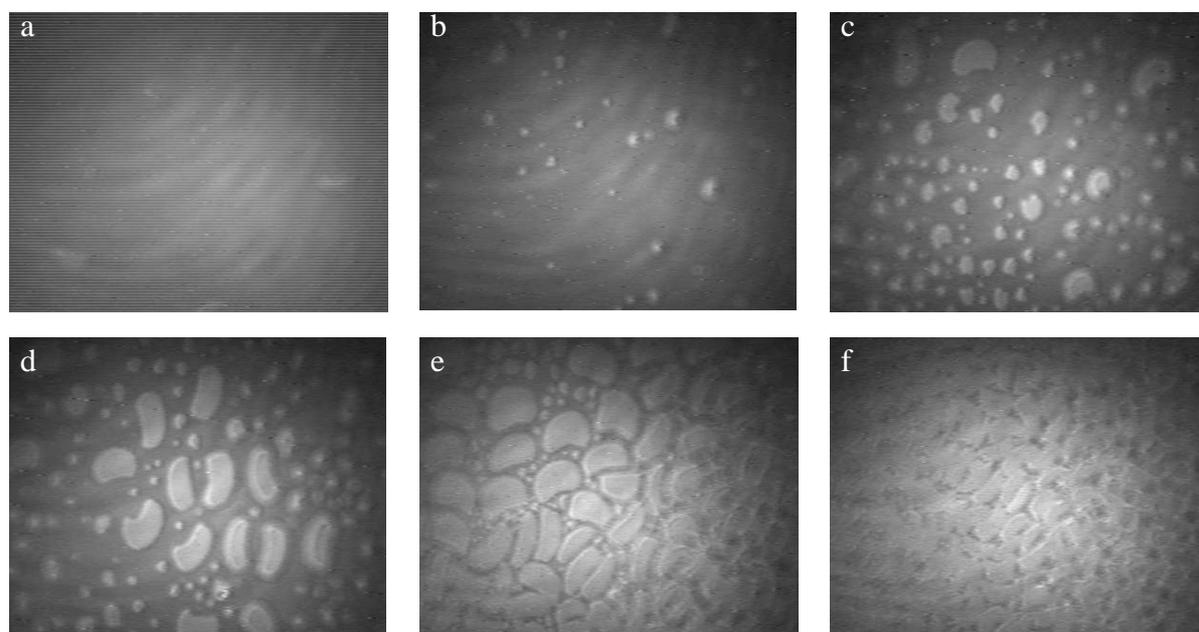


Abb.60: BAM-Ausschnitte mit einer Größe von $586 \times 586 \mu\text{m}$ der Verbindung $\text{E}_{14/16}\text{Lys}$ (**93**) bei verschiedenen Oberflächendrücken: $\pi = 31 \text{ mN/m}$ (a), $\pi = 39 \text{ mN/m}$ (b), $\pi = 41 \text{ mN/m}$ (c), $\pi = 43 \text{ mN/m}$ (d), $\pi = 45 \text{ mN/m}$ (e), $\pi = 48 \text{ mN/m}$ (f)¹⁷⁴

Die IRRA-Spektroskopie kann gleichfalls für die Untersuchung monomolekularer Oberflächenfilme an der Luft-Wasser-Grenzfläche genutzt werden.¹⁸³⁻¹⁸⁵ Mit dieser Methode können Informationen zur Konformation und Orientierung der Alkylketten und zu Wechselwirkungen zwischen den Kopfgruppen der Lipide erhalten werden. Dabei kann die Lage der Schwingungsbanden direkt mit molekularen Strukturen und Konformationen korreliert werden. Durch Verwendung einer LANGMUIR'schen Filmwaage zur Einstellung des Oberflächendrucks der Monoschicht ist die simultane Aufnahme der IRRA-Spektren und der π/A -Isothermen und daraus folgend eine Beobachtung von Phasenübergängen möglich.¹⁸⁶ Die während der Kompression des Lipidfilms gemessene Abnahme der Frequenz der kon-

formationsempfindlichen symmetrischen und antisymmetrischen Methylen-Streckschwingungen korreliert dabei mit der Zunahme der Ordnung der Lipidalkylketten.^{187,188}

Die dargestellten Diagramme in *Abbildung 61* und *62* zeigen die Lage der Wellenzahl der Peaks der IRRA-Spektren von $E_{14/16}$ (**46**) und $E_{14/16}$ Lys (**93**), die nichtlinear nach Gauß gefittet wurden und deren so erhaltenen Maxima gegen den Oberflächendruck aufgetragen wurden.

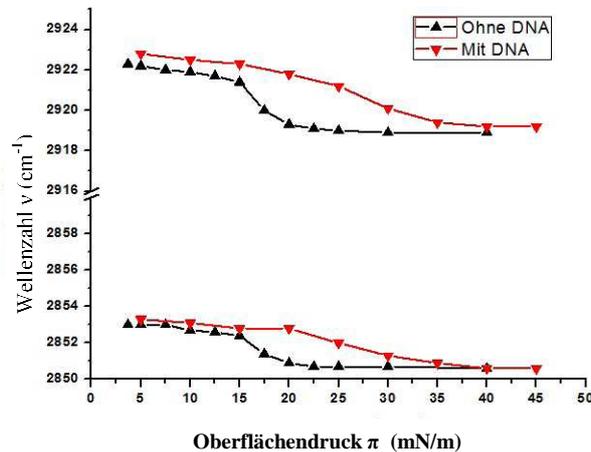


Abb.61: Darstellung der mittleren Wellenzahlen der antisymmetrischen ($\approx 2922 \text{ cm}^{-1}$) und symmetrischen ($\approx 2850 \text{ cm}^{-1}$) CH_2 -Schwingungen von $E_{14/16}$ in Abhängigkeit vom Oberflächendruck mit und ohne DNA¹⁷⁴

Für die Untersuchung des Einflusses der DNA auf den Phasenzustand der Lipide wurden als Subphasen Wasser oder 0,1 mM DNA-Lösung verwendet.¹⁷⁴

Die Methylen-Schwingungsbanden des $E_{14/16}$ -Lipids liegen bereits bei einem sehr geringen Oberflächendruck von 3 mN/m bei 2922 cm^{-1} (antisymmetrisch) und 2853 cm^{-1} (symmetrisch). Im Vergleich dazu werden für das Transfektionslipid $E_{14/16}$ Lys bei gleichem Druck antisymmetrischen Schwingungsbanden bei 2925 cm^{-1} und die symmetrischen bei 2855 cm^{-1} erhalten.

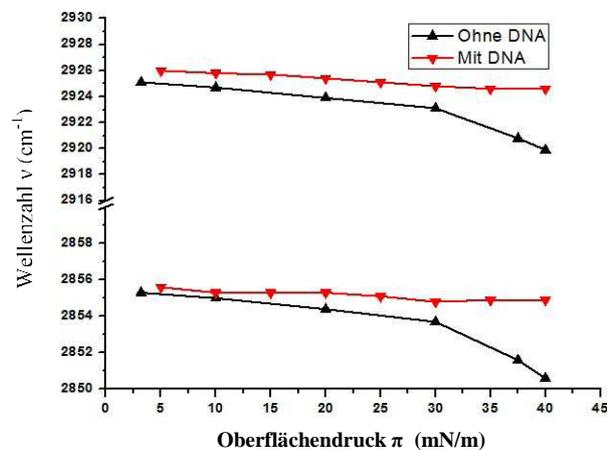


Abb.62: Darstellung der mittleren Wellenzahlen der antisymmetrischen ($\approx 2922 \text{ cm}^{-1}$) und symmetrischen ($\approx 2850 \text{ cm}^{-1}$) CH_2 -Schwingungen von $E_{14/16}$ Lys in Abhängigkeit vom Oberflächendruck mit und ohne DNA¹⁷⁴

Dieser Unterschied lässt sich anhand der Kopfgruppengröße erklären: $E_{14/16}$ besitzt eine sehr kleine polare Kopfgruppe, so dass das Lipid auch bei großer Fläche pro Molekül dicht gepackte Strukturen ausbildet. Der Phasenübergang der Verbindung findet bei einem Oberflächendruck von etwa 15 mN/m bis 23 mN/m statt und führt letztlich zu einer konstanten Lage der Schwingungsbanden bei 2919 cm^{-1} (antisymmetrisch) und 2851 cm^{-1} (symmetrisch). Der Übergang zur kondensierten Phase des Transfektionslipids **93** findet dagegen erst bei einem Oberflächendruck von 30 mN/m statt, wobei bei 40 mN/m die Schwingungsbanden zu Werten von 2919 cm^{-1} und 2851 cm^{-1} verschoben werden. Bei beiden Verbindungen führt die Anwesenheit der DNA zur Verschiebung der Lage der CH_2 -Schwingungsbanden über den gesamten Bereich zu höheren Werten, wobei im Vergleich zum $E_{14/16}$, dessen Phasenübergang in Gegenwart der DNA bei etwa 35 mN/m abgeschlossen ist, bei der Verbindung $E_{14/16}\text{Lys}$ bis zu einem Druck von 40 mN/m scheinbar kein Phasenübergang zur kondensierten Phase mehr stattfindet. Demnach muss die Anordnung der Alkylketten durch einen hohen Anteil gebundener DNA, die die kationischen Lipide möglicherweise auseinander drängt, stark beeinflusst sein.

Anhand der Phosphat-Diester-Valenzschwingungen von 1268 cm^{-1} und 1033 cm^{-1} und der daraus durch Integration ermittelten Peakflächen, die, wie in *Abbildung 63* dargestellt, gegen

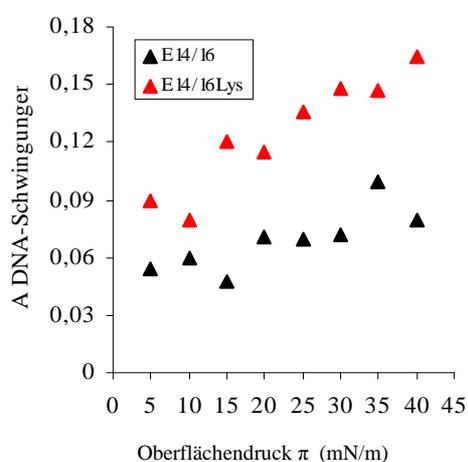


Abb.63: Vergleich der an die Grenzfläche gebundenen DNA von $E_{14/16}$ und $E_{14/16}\text{Lys}$

den Oberflächendruck aufgetragen wurden, sollte die Tendenz zum Einbau der DNA in die jeweilige Monoschicht aufgezeigt werden. Wie erwartet, integriert $E_{14/16}$, vermutlich aufgrund seiner sehr kleinen polaren Kopfgruppe mit einer protonierten Aminogruppe deutlich weniger DNA als $E_{14/16}\text{Lys}$, dessen polare Kopfgruppe größer ist und zwei positive Ladungen trägt. Außerdem weist das Lipid $E_{14/16}$ eine hohe Affinität zum kondensierten Zustand auf, wodurch der Einbau der DNA in die Monoschicht des Lipids **46** begrenzt wird.

Die hier aufgezeigten Verfahren können lediglich Trends aufzeigen. Für genauere Aussagen müssen die Versuche auf weitere, ähnliche Substanzen ausgeweitet werden und die Ergebnisse mit zusätzlichen Methoden, wie der Röntgen-Diffraktometrie zur Untersuchung dünner Schichten (Grazing Incidence X-Ray-Diffraction GIXD) untermauert werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Der heutige Stand der medizinischen Forschung zeigt, dass die kausale Therapie von angeborenen und erworbenen Erkrankungen den Schlüssel zur vollständigen Heilung dieser Krankheiten darstellt. Die Gentherapie nimmt einen stets wachsenden Anteil in der Entwicklung von Behandlungsmethoden ein. Obwohl bisher innerhalb klinischer Studien erst selten eingesetzt, gewinnt die Lipofektion insbesondere durch die zahlreichen Vorteile gegenüber der viralen Gentransfektion zunehmend an Bedeutung. So können die Liposomen nicht nur einfach, robust und preiswert dargestellt werden, sie weisen sich außerdem durch eine hohe Nukleinsäure-Beladungskapazität, Lagerungsstabilität und verminderte Onko- und Immunogenität im Vergleich zu den viralen Genfähern aus. Kationische Lipide eignen sich unter Verwendung geeigneter Helferlipide hervorragend für die Komplexierung der negativ geladenen Nukleinsäuren und ermöglichen aufgrund ihrer positiven Ladung das Annähern und Eindringen in die Zielzelle. Häufig besitzen die kationischen Lipide einen gemeinsamen Grundaufbau, bestehend aus einem hydrophoben Molekülteil, der über einen Spacer mit einer polaren Kopfgruppe verbunden ist. Diese Struktur bildete den Ausgangspunkt für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit synthetisierten Transfektionslipide.

Der Malonsäurediethylester stellt einen idealen Ausgangsstoff sowohl für die Darstellung der verzweigten Verbindungen als auch der Geminilipide dar. Allein die Verwendung unterschiedlicher Alkylhalogenide während der Zweitalkylierungsreaktion ermöglichte die Darstellung der beiden unterschiedlichen Lipidklassen. Wurde im zweiten Alkylierungsschritt ein Alkylmonohalogenid eingesetzt, bildete sich der Grundkörper für die verzweigten Lipide. Der Austausch mit einem kürzerkettigen Alkyldihalogenid führte stattdessen zum Geminigrundgerüst. Nach der Fertigstellung des hydrophoben Molekülteils wurde anschließend mit verschiedenen Kupplungsreagentien, wie BOP, PyBOP, HBTU und T₃P, und über die Säurechloridaktivierung ein Spacer in das Molekül eingeführt. Als ideales Kupplungsreagenz stellte sich das PyBOP heraus, durch dessen Einsatz geringfügig veunreinigte Zwischenprodukte in akzeptablen Ausbeuten erhalten werden konnten. Als Spacer wurden Ethylendiamin, Butylendiamin, Spermin und das verzweigte Tris-(2-aminoethyl)amin eingesetzt. Im anschließenden Reaktionsschritt wurde eine Aminosäure als polare Kopfgruppe in das Molekül eingeführt, wobei sich Lysin als basische Aminosäure für eine gute Transfektionsleistung etabliert hat. Die Umsetzung mit dem bereits aktivierten, BOC-geschützten Lysinhydroxysuccinimid hat sich dabei ebenso bewährt, wie die Durchführung einer DCC-Kupplung der BOC-geschützten Aminosäuren unter Verwendung von 1-Hydroxybenzo-

triazol. Die vorhandenen BOC-Schutzgruppen wurden unter Verwendung von konzentrierter Salzsäure in Essigsäureethylester abgespalten, während die Entfernung der CBZ-Schutzgruppen durch Hydrierung gelang. Die Vergrößerung der polaren Kopfgruppe konnte in weiteren Reaktionsschritten durch den Einbau zusätzlicher Aminosäuren erreicht werden. Die abschließende chromatographische Aufreinigung der synthetisierten Transfektionslipide und deren Vorstufen über das MPLC-Verfahren setzte sich gegenüber der Säulenchromatographie durch, da die MPLC zu einer deutlichen Einsparung von Lösungsmitteln und einer effektiven und schnellen Trennung sehr kleiner Substanzmengen führte. Die systematische Modifikation der einzelnen Molekülbausteine führte zu der Darstellung homologer Reihen. Dies eröffnete die Möglichkeit, innerhalb der biologischen Testung die optimale Zusammensetzung der Lipide für eine hohe Transfektionseffizienz bei guter Verträglichkeit zu identifizieren.

Die bisher durchgeführten Transfektionsuntersuchungen deuten auf folgende erfolgversprechende Lipidzusammensetzung hin: zwei Tetradecyleinheiten innerhalb des hydrophoben Molekülteils, der über einen Ethylendiaminspacer durch eine bioabbaubare Amidbindung mit einem Lysinmolekül verbunden ist. Diese Verbindung zeigte an der Hep-G2-Zelllinie in Kombination mit dem Helferlipid DOPE im Verhältnis 1:2 (n/n) deutlich höhere Transfektionsraten als die Referenzsubstanz Lipofectamine™. Zudem überzeugten weitere α -verzweigte Transfektionslipide und das Geminilipid G₁₆diLys durch sehr gute Testergebnisse an der Hep-G2-Zelllinie. In ersten Untersuchungen führte die zunehmende Verzweigung innerhalb der Kopfgruppe bei den Tris-Lysin-Derivaten nicht zur erhofften Steigerung der Transfektionsrate. Das veränderte Verhältnis der Volumenanteile der einzelnen Molekülbestandteile zueinander kommt dafür als Ursache in Betracht.

Die der Promotionsschrift zugrunde liegenden Erkenntnisse bieten sehr gute Voraussetzungen für eine mannigfaltige Weiterentwicklung nicht-viraler liposomaler Gentransfersysteme. Da bereits geringe Veränderungen im Molekül zu einer wesentlichen Steigerung der Transfektionseffizienz führen können, sollten die synthetisierten Verbindungen als Ausgangspunkt für weitere Synthesen analoger Strukturen gewählt werden. Allein die Einführung einer verkürzten oder ungesättigten Alkylkette im hydrophoben Molekülteil könnte durch die erhöhte Molekülbeweglichkeit in Abhängigkeit vom eingesetzten Helferlipid zu einer verbesserten Transfektion führen. Die Variation der polaren Kopfgruppe mittels eines veränderten Verzweigungsgrades oder durch Einfügen anderer basischer Aminosäuren könnte ebenso wie die Modifikation von Kettenlänge und Verzweigungsgrad des Spacers eine Steigerung der Effizienz des Gentransfersystems bewirken.

6 Experimentelle Arbeiten

6.1 Analysenmethoden

6.1.1 Chromatographie

Dünnschichtchromatographie (DC)

Die DC wurde zur Kontrolle des Reaktionsverlaufs sowie zur Bestimmung der Reinheit isolierter Zwischen- und Endprodukte genutzt. Als Trägermaterial dienten Fertigplatten der Firma *Merck* (Darmstadt, Deutschland), deren stationäre Phase aus Kieselgel 60 F₂₅₄ bestand. Die Verbindungen wurden in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst, mittels einer 10 µl-Kapillare der Firma *Hirschmann* aufgetragen und in einer Chromatographiekammer, die als mobile Phase ein Standardlaufmittel enthielt, unter Kammersättigung entwickelt. Folgende Laufmittel (V/V) fanden dabei Verwendung:

LM 1	Chloroform/Methanol	90/10
LM 2	Chloroform/Methanol/Ammoniak	90/10/1
LM 3	Chloroform/Methanol/Ammoniak	80/20/2
LM 4	Chloroform/Methanol/Ammoniak	70/30/3
LM 5	Chloroform/Methanol/Ammoniak	65/35/5
LM 6	Chloroform/Methanol/Ammoniak	50/50/15
LM 7	Chloroform/Heptan	60/40
LM 8	Heptan/Ether	90/10
LM 9	Chloroform	
LM 10	Chloroform/Ether	80/20

Die Detektion der Chromatogramme erfolgte nach Trocknung mit Bromthymolblau-Lösung oder einer Brom/Methanol-Lösung (5 Tropfen Brom in 10 ml Methanol) zur Detektion ungesättigter Verbindungen, die durch Addition des Broms an die Doppelbindung zur Entfärbung der Bromlösung führen. Das Bromthymolblau-Sprühreagenz, das durch Lösen von 200 mg Bromthymolblau¹⁸⁹ (3'3''-Dibrom-thymolsulfophthalein) in wenig Ethanol und der anschließenden Aufnahme zusammen mit 400 mg KOH in 1000 ml destilliertem Wasser hergestellt wurde, eignete sich durch Bildung von Charge-Transfer-Komplexen für den Nachweis lipophiler Strukturen, deren kleinsten Mengen damit angezeigt werden konnten. Die Bedampfung mit Ammoniak führte zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit. In Abhängigkeit von Charakter und Konzentration der detektierten Verbindung erschienen blassblaue, grüne, lilafarbene oder intensiv blau gefärbte Flecke. Die angegebenen R_f-Werte wurden nicht korrigiert.

Säulenchromatographie (SC)

Die SC diente der Trennung und Reinigung der Zwischenverbindungen und einiger Endprodukte. Als Trennmittel wurde Kieselgel 60 der Firma *Merck* mit einer Korngröße von 0,063 mm – 0,200 mm eingesetzt. Als Elutionsmittel fanden Heptan und Chloroform, sowie Mischungen aus Heptan und Diethylether, Chloroform und Methanol, sowie Chloroform, Methanol und Ammoniak unterschiedlicher Zusammensetzung Verwendung, wobei die Polarität diskontinuierlich erhöht wurde. Der Trennungsprozess wurde durch Detektion mittels DC verfolgt.

Mitteldruckflüssigchromatographie (MPLC)

Aufgrund der teilweise geringen Mengen an Zwischen- und Endprodukten erwies sich die Durchführung einer MPLC am MPLC-Gerät der Firma *Büchi* (Essen, Deutschland) als geeignete Aufreinigungsmethode. Die Probensammlung erfolgte über einen *Fraction Collector C-660 (Büchi)*, das *Pump Module C-601* und der *Pump Manager C-615 (Büchi)* dienten als Pumpsystem.

Zur Probenvorbereitung wurden die erhaltenen Verbindungen zunächst über P_2O_5 im Vakuum über Nacht getrocknet und anschließend in etwa 10 ml Chloroform, Chloroform-Methanol-Gemischen unterschiedlicher Zusammensetzung oder in Heptan nötigenfalls unter Erwärmung gelöst. Zur chromatographischen Trennung wurden entsprechend der vorhandenen Substanzmengen Säulen mit einer Beladungskapazität von 200 mg, 400 mg, 1 g oder 5 g verwendet. Diese wurden unter Stickstoffzufuhr über einen *Cartriger C-670 (Büchi)* mit Kieselgel der Korngröße 0,040 mm-0,063 mm befüllt. Die Konditionierung der gepackten Säulen erfolgte für mindestens 30 min bei einer Flussrate von 20 ml/min mit dem Lösungsmittelgemisch, welches auch zum Lösen der Substanzen eingesetzt wurde.

Nach dem Lösen der Proben erfolgte die Auftragung mittels 2 ml, 5 ml oder 10 ml Einwegspritzen über den Einspritzort. Als Laufmittel wurden Mischungen aus Heptan und Ether, Chloroform und Methanol oder aus Chloroform, Methanol und Ammoniak unter diskontinuierlicher Erhöhung der Polarität verwendet. Die genauen Zusammensetzungen der Elutionsmittelgemische für die einzelnen Verbindungen sind in *Tabelle 1* zusammengestellt.

Die Laufmittelvolumina je Polaritäts-Steigerungsschritt wurden entsprechend der eingesetzten Säulengröße gewählt: 200 ml für die 200 mg und 400 mg Säulen, sowie 400 ml für die 1 g und 5 g Säulen. Die verwendete Flussrate betrug 20 ml/min, das aufgefangene Probenvolumen 20 ml je Fraktion. Lediglich bei den Substanzen mit mehreren Lysingruppen im polaren Kopfteil wurde die Fließmittelgeschwindigkeit auf 30 bis 50 ml/min erhöht.

Verbindungsgruppe	Beispiel	Laufmittel	Startlaufmittel (V/V)	Steigerung Polarität je Erhöhungsschritt	Produkteluerung bei (V/V)
ungesättigter Malonester	Oleyltetradecylmalonsäurediethylester ($C_{18u/14E}$) 15	Heptan/ Ether	100/0	0,25 Anteile Ether	99/1
Vorstufen mit Ethylen- oder Butylendiaminspacer	2-Tetradecylhexadecansäure-(2-aminoethyl)amid (E_{14}) 30	Chloroform/ Methanol	100/0	2,5 Anteile Methanol	90/10
Vorstufen mit Tris(2-aminoethyl)aminspacer	2-Tetradecylhexadecansäure-[2-bis(2-aminoethyl)aminoethyl]-amid (T_{14}) 40	Chloroform/ Methanol/ Ammoniak	90/10/0	90/10/0,5 → 90/10/1 → 80/20/2 → 70/30/3	70/30/3
Monolysinprodukte	2-Tetradecylhexadecansäure-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]-amid (E_{14Lys}) 86	Chloroform/ Methanol/ Ammoniak	100/0/0	90/10/0 → 90/10/0,5 → 90/10/1 → 80/20/2	80/20/2
ungesättigtes Monolysinprodukt	2-Tetradecyleicosa-11-ensäure-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]amid ($E_{18u/14Lys}$) 96	Chloroform/ Methanol/ Ammoniak	100/0/0	90/10/0 → 90/10/0,5 → 90/10/1	90/10/1
Monolysinprodukte mit Dipeptidstruktur	2-Tetradecylhexadecansäure-(2-{[2-(2,6diamino-1-oxohexyl)amino]-1-oxoethyl}amino-ethyl)amid ($E_{14GlyLys}$) 105	Chloroform/ Methanol/ Ammoniak	100/0/0	90/10/0 → 90/10/0,5 → 90/10/1	90/10/1
Dilysinprodukte mit Tris(2-aminoethyl)aminspacer	2-Tetradecylhexadecansäure-{2-bis[(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl] aminoethyl}amid ($T_{14diLys}$) 100	Chloroform/ Methanol/ Ammoniak	90/10/1	80/20/2 → 70/30/3 → 60/40/4 → 50/50/5 → 50/50/7,5 → 50/50/10	50/50/10
Trislysinprodukte	2-Tetradecylhexadecansäure-(2-{2,6-[bis-(2,6-diamino-1-oxohexyl)]diamino-1-oxohexyl} aminoethyl)amid ($E_{14trisLys}$) 112	Chloroform/ Methanol/ Ammoniak	50/50/0	0,5 Anteile Ammoniak	50/50/5
Gemini-Vorstufen	2,7-Ditetradecyloctandisäure-bis-(2-aminoethyl)amid (G_{14}) 126	Chloroform/ Methanol/ Ammoniak	100/0/0	90/10/0,5 → 90/10/1 → 80/20/1	80/20/1
Geminiprodukte	2,7-Ditetradecyloctandi-säure-bis-[2,2'-bis-(2,6-diamino-1-oxohexyl)-aminoethyl]amid ($G_{14diLys}$) 128	Chloroform/ Methanol/ Ammoniak	90/10/0	90/10/0,5 → 90/10/1 → 80/20/2 → 70/30/3	70/30/3
Monolysin-Dimer-Produkt	2,2-Bis-(2-Tetradecylhexadecanoylaminoethyl)-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]amin ($T_{14DimerLys}$) 98	Chloroform/ Methanol/ Ammoniak	90/10/0	90/10/0,5 → 90/10/1 → 80/20/1	80/20/1

Tab.1: Laufmittelzusammensetzung für die chromatographische Substanztrennung mittels MPLC-Verfahren

Während der Durchführung der MPLC wurden fortlaufend DC-Untersuchungen zum Trennverlauf gemacht, womit es möglich war, kurzfristig in den Reinigungsprozess einzugreifen und die Polarität entweder schneller und stärker zu erhöhen oder von einer Steigerung dieser abzusehen. Für die erfolgreiche Aufreinigung der Verbindungen wurden etwa 120 bis 240 Fraktionen gesammelt, mittels DC-Verfahren untersucht, eingengt und anschließend erneut im Vakuum über P_2O_5 getrocknet.

6.1.2 Schmelzpunktbestimmung

Die Bestimmung der Schmelzbereiche erfolgte mit Hilfe eines *Boetius*-Heiztischmikroskops. Die dabei ermittelten Werte wurden nicht korrigiert.

6.1.3 Elementaranalyse (EA)

Die Kohlenstoff-, Wasserstoff-, Stickstoff- und Schwefelanalysen wurden an einem *CHNS-932* Gerät der Firma *Leco-Corporation* (St. Joseph, Michigan, USA) im automatischen Mikroverfahren durchgeführt.

6.1.4 Massenspektrometrie (MS)

ESI-MS

Für die Erstellung eines Massenspektrums unter Verwendung des Elektronen-Spray-Ionisations(ESI)-Verfahrens wurde die Probe in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst, mittels einer Spritzenpumpe (*Havard Apparatus 22*, Massachusetts, USA) über das ESI-Interface in das Ionenfallen-Massenspektrometer *Finnigan MAT SSQ 710 C* eingesprüht (*Thermo Separation Products*, San José, USA bzw. *Thermoquest*, Egelsbach, Deutschland) und vermessen. Die Durchführung der Ionisation erfolgte im Elektronenspray bei 4.5 kV positiv und negativ. Das Gerät verfügt über eine auf 200 °C beheizbare Kapillare und weist eine Flussrate von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ auf. Chloroform, Methanol und Wasser in unterschiedlichen Anteilen wurden als Lösungsmittelgemisch zum Lösen der Probe eingesetzt.

EI-MS

Für die Darstellung einiger Massenspektren wurde das Verfahren der Elektronenstoß-Ionisation (EI) gewählt. Die Durchführung erfolgte an einem *AMD 402* (70 eV) der Firma *AMD Intecta GmbH* (Harpstedt, Deutschland).

HR-ESI-MS

Für ausgewählte Verbindungen wurde die hochauflösende Massenspektrometrie (HR-ESI-MS) an einem Hybridmassenspektrometer vom Typ Q-TOF-2 (*Waters/Micromass*, Manchester, GB) mit einer Lösung aus Natrium- und Caesiumiodid als innerer Standard durchgeführt. Bei Substanzen mit molaren Massen ab 600 g/mol wurden die Massenspektren an einem *LTQ-Orbitrap*-Massenspektrometer der Firma *Thermo Fisher Scientific* (Bremen, Deutschland) nach Aufnahme der Verbindungen in einem geeigneten Lösungsmittel und unter Verwendung einer statischen Nanoelektrospray-Ionisation angefertigt.

6.1.5 NMR-Spektroskopie

Die ^1H -NMR Spektren wurden an einem *Varian Gemini 2000* bzw. an einem *Varian Inova 500* bei einer Temperatur von 27 °C aufgenommen. Als Lösungsmittel wurden deuteriertes Chloroform bzw. Mischungen aus diesem mit deuteriertem Methanol verwendet, wobei diese zugleich als innerer Standard dienten. Bei der Angabe der Daten der einzelnen Verbindungen werden jeweils die eingestrahlte Frequenz in MHz und das verwendete Lösungsmittel aufgezeigt. Die Auflistung der chemischen Verschiebungen δ , angegeben in ppm, beziehen sich für Signale mit definierten Multiplizitäten (s – Singulett, d – Dublett, t – Triplett, q – Quartett) auf die Symmetrieebene der Signale bzw. die Signalmittelpunkte, im Falle eines Multipletts (m) wird der Bereich der Signale angegeben.

6.2 Chemikalien

6.2.1 Vorbehandlung der verwendeten Lösungsmittel

Alle zur Synthese verwendeten Lösungsmittel wurden getrocknet und frisch destilliert. Die Trocknung von Chloroform und Dichlormethan erfolgte durch Erhitzen unter Rückfluss über di-Phosphorpentoxid, während Methanol und Ethanol nach Zusatz von Natrium bzw. Magnesium, bei Toluol, Xylol, und Diethylether nach Zugabe von Natrium und Benzophenon (bis zur beständigen Blaufärbung) unter Rückfluss erhitzt wurden. Anschließend erfolgte die Destillation der Lösungsmittel.

6.2.2 Kommerziell erworbene Chemikalien

Die Substanzen wurden, falls nicht anders angegeben, von der Firma *Sigma-Aldrich* (Seelze, Deutschland) bezogen und unverändert eingesetzt.

Allylbromid	Lithiumdiisopropylamid
Ammoniak (<i>Roth</i>)	Malonsäurediethylester (<i>Merck</i>)
Ammoniumchlorid (<i>Roth</i>)	Methansulfonsäurechlorid
N_{α} -(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)- N_{δ},N_{ω} -di-Carboxybenzyl-L-arginin	Natriumsulfat
<i>N</i> -(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)glycin (<i>Fluka</i>)	Natriumhydrid
<i>N</i> -(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)-L-leucin (<i>Fluka</i>)	Δ^9 -Octadecenol
N_{α},N_{ϵ} -Di-(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)-L-lysinhydroxysuccinimid	Oxalsäurediethylester
<i>N</i> -(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)-L-methionin (<i>Fluka</i>)	Palladiumaktivkohle (10%)
Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat (BOP)	(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrilidino-phosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP)
1,4-Butylendiamin	Pyridiniumchlorochromat
Chlorwasserstoff	Salzsäure 37% (<i>Roth</i>)
<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid	Tetrabutylammoniumiodid (<i>Merck</i>)
1,4-Diiodbutan (<i>Merck</i>)	Tetradecylbromid
Dodecylbromid	Thionylchlorid
1,2-Ethylendiamin	Triethylamin
Ethyloleat	Tris(2-aminoethyl)amin
Grubbs ^{1st Generation} - (PCy ₃) ₂ Cl ₂ Ru=CHCH=CPh ₂	2,4,6-Tripropyl-1,3,5,2,4,6-trioxa-triphosphorinan-2,4,6-trioxid (T ₃ P)
<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU)	
Hexadecylbromid	
1-Hydroxy-1-benzotriazol-Hydrat	Firma Fluka - Buchs, Schweiz
Kaliumhydroxid	Firma Merck - Darmstadt, Deutschland
Lithiumaluminiumhydrid	Firma Roth - Karlsruhe, Deutschland

6.3 Synthesevorschriften

Verbindungen die mit * gekennzeichnet sind, wurden im Rahmen meiner Diplomarbeit synthetisiert.

6.3.1 Synthese der Ausgangsverbindungen

Erstalkylierung

Die Alkylmalonsäurediethylester **5-7** wurden der Literatur^{69,190} entsprechend durch Reaktion von Malonsäurediethylester **1** mit dem jeweiligen Alkylbromid **2-4** synthetisiert und anschließend säulenchromatographisch mit einem Heptan/Diethylether Gradienten steigender Polarität gereinigt. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur

Dodecylmalonsäurediethylester - 5

Der Dodecylmalonester **5** (MF070409) wurde durch Alkylierung von Malonsäurediethylester **1** mit Dodecylbromid **2** hergestellt; EI-MS: m/z 328 [2 %, M]; 283 [11 %, M-C₂H₆O]

Tetradecylmalonsäurediethylester - 6*

Der Tetradecylmalonester **6** (MF231004) wurde durch Alkylierung von Malonsäurediethylester **1** mit Tetradecylbromid **3** hergestellt; ESI-MS: positiv 379,6 g/mol [M+Na]

Hexadecylmalonsäurediethylester - 7*

Der Hexadecylmalonester **7** (MF241004) wurde durch Alkylierung von Malonsäurediethylester **1** mit Hexadecylbromid **4** hergestellt; ESI-MS: positiv 407,4 g/mol [M+Na]

Oleylmalonsäurediethylester - 10

Die Darstellung des Oleylmalonsäurediethylesters **10** erfolgte über Oleylmesylat **9** als Zwischenverbindung, dessen Synthese entsprechend der Literaturvorschrift¹⁹¹ durch Umsetzung von 62,5mmol technischem Oleylalkohol **8** mit 68,8mmol Methansulfonsäurechlorid und 68,8mmol TEA in Chloroform bei 0 °C durchgeführt wurde. Durch Säulenchromatographie wurde das erhaltene Mesylat **9** gereinigt und anschließend der Literatur¹⁹⁰ entsprechend mit Malonsäurediethylester zum Oleylmalonsäurediethylester **10** umgesetzt. Mit einem Elutionsmittelgemisch aus Heptan und Ether steigender Polarität wurde säulenchromatographisch vom ebenfalls entstandenen Dioleylmalonester (m/z 660 [45 %, M], 614 [11 %, M-C₂H₆O]) abgetrennt.

MF130109 C₂₅H₄₆O₄

M = 410,63 g/mol

R_f: 0,30 (LM 8)

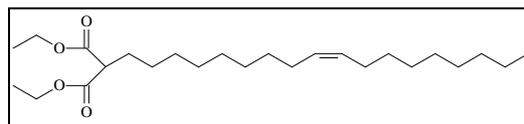
Ausbeute: 67 % (17,16 g)

EI-MS: m/z: 410 [47 %, M]; 364 [27 %, M-C₂H₆O]; 160 [52 %, M-C₁₈H₃₅]

EA: ber.: C = 73,12 % H = 11,29 %

gef.: C = 72,75 % H = 11,21 %

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ = 0,82 (3H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz [**H**₃C-CH₂-CH₂-]); 1,12-1,30 (30H, m, [**H**₃C-(**CH**₂)₆-CH₂-CH=CH-CH₂-(**CH**₂)₆-CH₂-] und 2 [**H**₃C-CH₂-O-]); 1,79-1,86 (2H, m, [-(CO)₂CH-**CH**₂-]); 1,94-1,97 (4H, m [-**CH**₂-CH=CH-**CH**₂-]); 3,26 (1H, t, ³J_{CH/CH₂} = 7,5Hz [-(CO)₂**CH**-CH₂-]); 4,09-4,17 (4H, m, 2 [**H**₃C-**CH**₂-O-]); 5,28-5,33 (2H, m [-CH₂-**CH**=**CH**-CH₂-])



Zweitalkylierung

Die Synthese der Dialkylmalonsäurediethylester erfolgte durch die erneute Alkylierung der Alkylmalonester **5-7**, **10** mit dem jeweiligen Alkylbromid **2-4** in Xylol analog der Vorschriften.^{69,192,193} Die teilweise erfolgte Reinigung wurde mittels Säulenchromatographie mit dem Laufmittelgemisch Heptan/Diethylether steigender Polarität durchgeführt. Die erhaltenen Daten stimmen mit der Literatur überein.

Di-dodecylmalonsäurediethylester - 11

Der Di-dodecylmalonester **11** (MF080409) wurde durch Alkylierung von Dodecylmalonsäurediethylester **5** mit Dodecylbromid **2** hergestellt und als Rohprodukt weiter umgesetzt.

Di-tetradecylmalonsäurediethylester - 12*

Der Di-tetradecylmalonsäurediethylester **12** (MF251004) wurde durch Alkylierung von Tetradecylmalonsäurediethylester **6** mit Tetradecylbromid **3** hergestellt; ESI-MS: positiv 575,6 g/mol [M+Na]

Hexadecyltetradecylmalonsäurediethylester - 13

Der Hexadecyltetradecylmalonsäurediethylester **13** wurde durch Alkylierung von Hexadecylmalonsäurediethylester **7** mit Tetradecylbromid **3** hergestellt.

MF060409 C₃₇H₇₂O₄

M = 580,97 g/mol

R_f: 0,25 (LM 7)

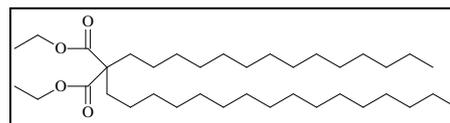
Ausbeute: 87 % (15,28 g)

EI-MS: m/z: 580 [4 %, M]; 535 [6 %, M-C₂H₆O]; 384 [51 %, M-C₁₄H₂₉];
356 [54 %, M-C₁₆H₃₂]

EA: ber.: C = 76,49 % H = 12,49 %

gef.: C = 76,49 % H = 13,02 %

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ = 0,85 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [H₃C-CH₂-CH₂-]); 1,17-1,29 (58H, m, [H₃C-(CH₂)₁₂-CH₂-] und [H₃C-(CH₂)₁₄-CH₂-] sowie 2 [H₃C-CH₂-O-]); 1,81-1,85 (4H, m [-CO)₂C-(CH₂)₂-]); 4,14 (4H, q, ³J_{CH₂/CH₃} = 7,1 Hz, 2 [H₃C-CH₂-O-])



Di-hexadecylmalonsäurediethylester - 14*

Der Di-hexadecylmalonsäurediethylester **14** (MF261004) wurde durch Alkylierung von Hexadecylmalonsäurediethylester **7** mit Hexadecylbromid **4** hergestellt; ESI-MS: positiv 632,1 g/mol [M+Na]

Oleyltetradecylmalonsäurediethylester - 15

Der Oleyltetradecylmalonsäurediethylester **15** wurde durch Alkylierung von Oleylmalonsäurediethylester **10** mit Tetradecylbromid **3** hergestellt und mittels MPLC mit dem Laufmittelgemisch Heptan/Diethylether steigender Polarität gereinigt.

MF060709 C₃₉H₇₄O₄

M = 607,00 g/mol

R_f: 0,29 (LM 7)

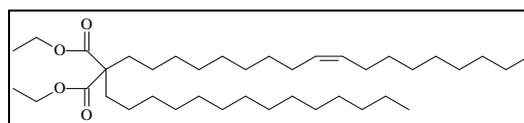
Ausbeute: 51 % (7,47 g)

EI-MS: m/z: 606 [64 %, M]; 560 [14 %, M-C₂H₅O]; 532 [18 %, M-C₃H₅O₂];
514 [7 %, M-2*C₂H₅O]; 486 [28 %, M-C₂H₅O, C₃H₅O₂]

EA: ber.: C = 77,17 % H = 12,29 %

gef.: C = 77,28 % H = 12,52 %

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ = 0,84 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [H₃C-CH₂-CH₂-]); 1,15-1,30 (54H, m, [H₃C-(CH₂)₆-CH₂-CH=CH-CH₂-(CH₂)₆-CH₂-] und [H₃C-(CH₂)₁₂-CH₂-] sowie 2 [H₃C-CH₂-O-]); 1,78-1,84 (4H, m [-CO)₂C-(CH₂)₂-]); 1,93-1,99 (4H, m [-CH₂-CH=CH-CH₂-]); 4,08-4,15 (4H, m, 2 [H₃C-CH₂-O-]); 5,26-5,34 (2H, m [-CH₂-CH=CH-CH₂-])



Verseifung

Die Dialkylmalonsäurediethylester wurde unter Verwendung des fünffachen Überschusses an Kaliumhydroxid in Ethanol verseift. Das ausgefallene Kaliumsalz wurde durch Zugabe von konz. Salzsäure in die Form der freien Dialkylmalonsäuren überführt und als Rohprodukte ohne Reinigung weiter umgesetzt.

Di-dodecylmalonsäure - 16

Die Di-dodecylmalonsäure **16** (MF080709) wurde aus dem Di-dodecylmalonsäurediethylester **11** hergestellt.

Di-tetradecylmalonsäure - 17*

Die Di-tetradecylmalonsäure **17** (MF171004) wurde aus dem Di-tetradecylmalonsäurediethylester **12** hergestellt.

Hexadecyltetradecylmalonsäure - 18

Die Hexadecyltetradecylmalonsäure **18** (MF170609) wurde aus dem Hexadecyltetradecylmalonsäurediethylester **13** hergestellt.

Di-hexadecylmalonsäure - 19*

Die Di-hexadecylmalonsäure **19** (MF181004) wurde aus dem Di-hexadecylmalonsäurediethylester **14** hergestellt.

Oleyltetradecylmalonsäure - 20

Die Oleyltetradecylmalonsäure **20** (MF051009) wurde aus dem Oleyltetradecylmalonsäurediethylester **15** hergestellt.

6.3.2 Synthese der verzweigten Transfektionslipide

6.3.2.1 Decarboxylierung der Dialkylmalonsäuren

Den Literaturangaben^{69,83,194} entsprechend wurden die über P_2O_5 im Vakuum getrockneten Dialkylmalonsäuren zur Decarboxylierung etwa 15-20 min auf 200 °C bis 230 °C im Metallbad erhitzt. Anschließend wurde der jeweils erhaltene Rückstand aus Heptan umkristallisiert.

2-Dodecyltetradecansäure - **21** C₁₂

Aus der Di-dodecylmalonsäure **16** wurde durch Decarboxylierung die 2-Dodecyltetradecansäure **21** hergestellt.

MF170709 C₂₆H₅₂O₂

M = 396,69 g/mol

R_f: 0,26 (LM 2)

mp: 62 °C

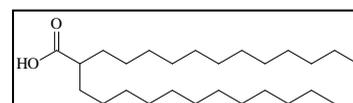
Ausbeute: 30 % (8,91 g) ausgehend vom Diester **11**

EI-MS: m/z: 396 [65 %, M]; 228 [99 %, M-C₁₂H₂₄]; 185 [14 %, M-C₁₂H₂₄,CO₂]

EA: ber.: C = 78,72 % H = 13,21 %

gef.: C = 78,84 % H = 13,48 %

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ = 0,84 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [H₃C-CH₂-CH₂-]); 1,16-1,59 (44H, m, 2 [H₃C-(CH₂)₁₁-]); 2,20-2,28 (1H, m, [-CO-CH-])



2-Tetradecylhexadecansäure - **22*** C₁₄

Aus der Di-tetradecylmalonsäure **17** wurde durch Decarboxylierung die 2-Tetradecylhexadecansäure **22** (MF211004) hergestellt. Die analytischen Daten entsprachen den Literaturangaben;^{69,83} ESI-MS: negativ: 451,8 g/mol [M-H], Ausbeute 78 % (6,37 g ausgehend vom Diester **12**).

2-Tetradecyloctadecansäure - **23** C_{14/16}

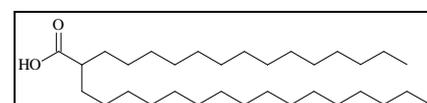
Aus der Hexadecyltetradecylmalonsäure **18** wurde durch Decarboxylierung die 2-Tetradecyloctadecansäure **23** hergestellt.

MF030709 C₃₂H₆₄O₂

M = 480,85 g/mol

R_f: 0,29 (LM 2)

mp: 62 °C



Ausbeute: 46 % (5,62 g) ausgehend vom Diester **13**
 EI-MS: m/z: 480 [100 %, M]; 284 [56 %, M-C₁₄H₂₈]; 256 [59 %, M-C₁₆H₃₂]; 241 [10 %, M-C₁₄H₂₈,CO₂]; 241 [9 %, M-C₁₆H₃₂,CO₂]
 EA: ber.: C = 79,93 % H = 13,42 %
 gef.: C = 79,59 % H = 13,21 %
¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ [ppm] = 0,85 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [H₃C-CH₂-CH₂-]); 1,17-1,60 (56H, m, [H₃C-(CH₂)₁₃-] und [H₃C-(CH₂)₁₅-]); 2,21-2,29 (1H, m, [-CO-CH-])

2-Hexadecyloctadecansäure - **24*** C₁₆

Aus der Di-hexadecylmalonsäure **19** wurde durch Decarboxylierung die 2-Hexadecyloctadecansäure **24** (MF221004) hergestellt. Die analytischen Daten entsprachen den Literaturangaben;^{69,83} ESI-MS: negativ: 1015,6 g/mol [2M-2H], Ausbeute 59 % (5,18 g ausgehend vom Diester **14**).

2-Tetradecylicosa-11-ensäure - **25** C_{18u/14}

Aus der Oleyltetradecylmalonsäure **20** wurde durch Decarboxylierung die 2-Tetradecylicosa-11-ensäure **25** hergestellt.

MF161009 C₃₄H₆₆O₂

M = 506,89 g/mol

R_f: 0,12 (LM 9)

mp: 36 °C

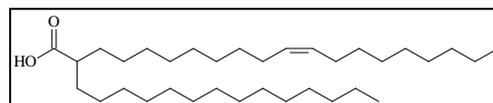
Ausbeute: 34 % (2,14 g) ausgehend vom Diester **15**

ESI-MS: negativ: 1011,2 g/mol [2M-2H]

EA: ber.: C = 80,56 % H = 13,12 %

gef.: C = 80,54 % H = 12,85 %

¹H-NMR: 500 MHz, CDCl₃, δ [ppm] = 0,88 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6Hz, 2 [H₃C-CH₂-CH₂-]); 1,24-1,65 (52H, m, [H₃C-(CH₂)₁₃-] und [H₃C-(CH₂)₆-CH₂-CH=CH-CH₂-(CH₂)₇-]); 1,93-2,04 (4H, m [-CH₂-CH=CH-CH₂-]); 2,30-2,37 (1H, m, [-CH-CO-]); 5,30-5,40 (2H, m, [-CH=CH-])



6.3.2.2 Einführung der Spacermoleküle

Variante A: Aktivierung der α -verzweigten Carbonsäuren durch Überführung in die Carbonsäurechloride und Umsetzung mit einem Amin

Jeweils 5 g der α -verzweigten Carbonsäuren **22** und **24** wurden in einem 100 ml Rundkolben mit 20 ml Thionylchlorid übergossen und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen, wobei eine klare Lösung entstand. Überschüssiges Thionylchlorid wurde am Rotationsverdampfer mittels Wasserstrahlpumpe aus der Lösung entfernt. Die gewonnenen Rückstände wurden über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet. Anschließend wurden die erhaltenen Carbonsäurechloride in einem 100 ml Zweihalskolben unter Rühren in 10 ml abs. Chloroform gelöst und im Eisbad gekühlt. Unter fortwährender Kühlung des Rundkolbens wurde die Lösung tropfenweise mit einem zwanzigfachen Überschuss an Ethylendiamin **28** bzw. Butylendiamin **29** und einigen Tropfen TEA versetzt. Nach Ablauf von zwei Stunden wurde die entstandene Suspension abfiltriert und die organische Phase dreimal mit Wasser gewaschen. Nach erfolgter Trocknung über Natriumsulfat wurde erneut abfiltriert und das Chloroform am Rotationsverdampfer entfernt. Zur Reinigung wurden die Produkte aus Heptan umkristallisiert.

Variante B: Kupplung der Carbonsäuren mit Aminen unter Verwendung des Kupplungsreagenzes BOP

Die 2-Tetradecylhexadecansäure **22** wurde zunächst unter Zugabe von TEA in abs. Dichlormethan gelöst. Diese Lösung wurde nachfolgend mit dem 20 fachen Überschuss des entsprechenden Amins und mit BOP im Verhältnis 1:1 versetzt und 12 h gerührt. Die Verwendung von Ethylendiamin **28** führte zur Darstellung des 2-Tetradecylhexadecansäure-(2-aminoethyl)amids **30** während der Einsatz von Butylendiamin **29** zur Synthese des 2-Tetradecylhexadecansäure-(2-aminobutyl)amids **32** genutzt wurde. Durch Umsetzung der Carbonsäure **22** mit Spermin wurde das 2-Tetradecylhexadecansäure-{3-[4-(3-aminopropyl)aminobutyl]aminopropyl}amid **39** erhalten sowie durch Einsatz von Tris-(aminoethyl)amin als Aminkomponente das 2-Tetradecylhexadecansäure-[2-bis(2-aminoethyl)aminoethyl]amid **40**. Nach Abtrennung des ausgefallenen weißen Niederschlags wurde die organische Phase mit gesättigter Natriumchloridlösung ausgeschüttelt und zweimal mit Wasser gewaschen. Durch Trocknung der Dichlormethanphase über Na_2SO_4 , Filtration und anschließender Entfernung

des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer konnte das Reaktionsgemisch jeweils aufgearbeitet werden. Die gereinigten Endprodukte **30/32/39/40** wurden säulenchromatographisch mit dem Elutionsmittelgemisch Chloroform/Methanol/Ammoniak steigender Polarität erhalten, wobei die SC der Lipide **30** und **32** unter Verzicht auf Ammoniak als dritte Komponente durchgeführt werden konnte.

Variante C: Kupplung der 2-Tetradecylhexadecansäure **22** mit Ethylendiamin unter Verwendung des Kupplungsreagenzes HBTU

55 mmol (2,09 g) HBTU wurden für die Reaktion mit 55 mmol (2,5 g) 2-Tetradecylhexadecansäure **22** und TEA, sowie 50 ml Dichlormethan gemischt und zu 1,1 mol (7,4 ml) vorgelegtem Ethylendiamin unter permanentem Rühren langsam zugefügt. Nach 12 h erfolgte zunächst die Filtration des entstandenen Niederschlags, an die sich drei Waschschriffe mit Wasser anschlossen. Es folgte die Trocknung der Dichlormethan-Phase mit Hilfe von Natriumsulfat mit nachfolgender Filtration und die Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer. Die Reinigung wurde per MPLC mit einer Chloroform/Methanol-Mischung steigender Polarität als Elutionsmittel durchgeführt.

Variante D: Kupplung der 2-Tetradecylhexadecansäure **22** mit Ethylendiamin unter Verwendung des Kupplungsreagenzes T₃P

Die Umsetzung von 0,5 g (11 mmol) der 2-Tetradecylhexadecansäure **22** mit Ethylendiamin **28** erfolgte unter Verwendung von 0,66 ml (11 mmol) einer 50 %igen Lösung des Propanphosphonsäurecycloanhydrids T₃P in Essigsäureethylester. Zunächst wurde das Diamin **28** in zwanzigfachem Überschuss (220 mmol, 1,5 ml) vorgelegt und anschließend langsam eine Mischung aus Kupplungsreagenz, 2-Tetradecylhexadecansäure **22** und TEA in Ethylacetat unter Rühren zugegeben. Im Reaktionsgemisch bildete sich innerhalb von zwölf Stunden ein weißer Niederschlag. Die Aufarbeitung erfolgte durch Entfernen des Lösungsmittels und Aufnahme des Rückstandes in Chloroform sowie nachfolgendem dreimaligen Waschen mit Wasser. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und am Rotationsverdampfer eingedunstet. Die Reinigung der Verbindung **30** erfolgte durch das MPLC-Verfahren mit einem Laufmittelgemisch aus Chloroform/Methanol steigender Polarität.

Variante E: Kupplung der Carbonsäuren mit Aminen unter Verwendung des Kupplungsreagenzes PyBOP

Die Synthese der Carbonsäureamide unter Verwendung von PyBOP **42** wurde in Anlehnung an die zuvor beschriebene BOP-Kupplung durchgeführt. Zur Steigerung der Ausbeuten wurde jedoch das jeweilige Amin vorgelegt und eine Mischung aus Kupplungsreagenz, Carbonsäure und TEA in Dichlormethan unter magnetischem Rühren zugetropft. Ebenso erfolgten die Umsetzungen alle im Verhältnis der Komponenten Carbonsäure/PyBOP/Amin 1:1:20 über einen Reaktionszeitraum von etwa zwölf Stunden unter Rühren. Zur Aufarbeitung der Produktgemische wurde nach Beendigung der Reaktion abfiltriert und die organische Phase dreimal mit Wasser gewaschen. Nachfolgend wurde über Na₂SO₄ getrocknet, erneut filtriert und das Dichlormethan am Rotationsvakuumverdampfer entfernt. Die erhaltenen Verbindungen wurden chromatographisch mit dem MPLC-Trennverfahren mit einem Elutionsmittelgemisch aus Chloroform/Methanol für die Substanzen **30/31/45-47** mit einer freien primären Aminogruppe und mit Chloroform/Methanol/Ammoniak für die Lipide **40/48-50** mit zwei freien primären Aminfunktionen mit steigender Polarität gereinigt.

2-Dodecyltetradecansäure-(2-aminoethyl)amid - 45 E₁₂

Die Synthese des 2-Dodecyltetradecansäure-(2-aminoethyl)amids **45** erfolgte durch Umsetzung von 3,0 g (7,6 mmol) 2-Dodecyltetradecansäure **21** mit 10,1 ml (0,15 mol) Ethylendiamin **28** nach Variante E.

MF210709 C₂₈H₅₈N₂O

M = 438,77 g/mol

R_f: 0,41 (LM 2)

mp: 91 °C

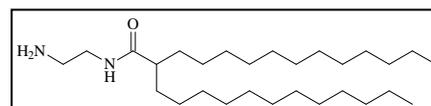
Ausbeute: Variante E: 87 % (2,89 g)

ESI-MS: positiv: 439,6 g/mol [M+H]

EA: ber.: C = 76,65 % H = 13,32 % N = 6,38 %

gef.: C = 75,98 % H = 13,44 % N = 6,30 %

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ [ppm] = 0,85 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [H₃C-(CH₂)₁₁-]); 1,20-1,58 (46H, m, 2 [H₃C-(CH₂)₁₁-] und [H₂N-CH₂-CH₂-NH-CO-]); 2,04-2,13 (1H, m [-CH-CO-]); 2,73 (2H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 6,2 Hz [H₂N-CH₂-]); 3,23 (2H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 6,2 Hz [H₂N-CH₂-CH₂-NH-CO])



2-Tetradecylhexadecansäure-(2-aminoethyl)amid - 30* E₁₄

Die Synthese des 2-Tetradecylhexadecansäure-(2-aminoethyl)amids **30** (MF201004) erfolgte durch Umsetzung der 2-Tetradecylhexadecansäure **22** mit Ethylendiamin **28** nach den Varianten A-E. Die analytischen Daten entsprachen der Literatur;^{69,83} ESI-MS: positiv: 495,6 g/mol [M+H] und 989,6 g/mol [2M] Ausbeute Variante A: 59 % (3,23 g ausgehend von 5,0 g Carbonsäure), Variante B: 67 % (3,64 g ausgehend von 5,0 g Carbonsäure), Variante C: 27 % (0,75 g ausgehend von 2,5 g Carbonsäure), Variante D: 33 % (0,18 g ausgehend von 0,5 g Carbonsäure), Variante E: 66 % (0,36 g ausgehend von 0,5 g Carbonsäure)

2-Tetradecyloctadecansäure-(2-aminoethyl)amid - 46 E_{14/16}

Die Synthese des 2-Tetradecyloctadecansäure-(2-aminoethyl)amids **46** erfolgte durch Umsetzung von 2,5 g (5,2 mmol) 2-Tetradecyloctadecansäure **23** mit 6,9 ml (0,10 mol) Ethylendiamin **28** nach Variante E.

MF280709 C₃₄H₇₀N₂O

M = 522,93 g/mol

R_f: 0,45 (LM 2)

mp: 69 °C

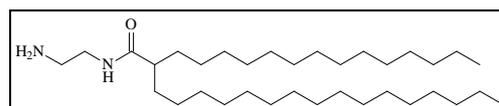
Ausbeute: Variante E: 42 % (1,14 g)

ESI-MS: positiv: 524,2 g/mol [M+H]

EA: ber.: C = 78,09 % H = 13,49 % N = 5,36 %

gef.: C = 78,14 % H = 13,10 % N = 5,11 %

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ [ppm] = 0,84 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [H₃C-CH₂-]); 1,16-1,56 (58H, m, [H₃C-(CH₂)₁₃-] und [H₃C-(CH₂)₁₅-] sowie [H₂N-CH₂-CH₂-NH-CO-]); 2,02-2,10 (1H, m [-CH-CO-]); 2,72 (2H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 6,2 Hz [H₂N-CH₂-]); 3,23 (2H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 6,2 Hz [H₂N-CH₂-CH₂-NH-CO])

**2-Hexadecyloctadecansäure-(2-aminoethyl)amid - 31* E₁₆**

Die Synthese des 2-Hexadecyloctadecansäure-(2-aminoethyl)amids **31** (MF101104) erfolgte durch Umsetzung der 2-Hexadecyloctadecansäure **24** mit Ethylendiamin **28** nach den Varianten A und E. Die analytischen Daten entsprachen der Literatur;^{69,83} ESI-MS: positiv: 551,7 g/mol [M+H], Ausbeute Variante A: 26 % (1,40 g ausgehend von 5,0 g Carbonsäure), Variante E: 60 % (1,63 g ausgehend von 2,5 g Carbonsäure)

2-Tetradecylicosa-11-ensäure-(2-aminoethyl)amid - 47 E_{18u/14}

Die Synthese des 2-Tetradecylicosa-11-ensäure-(2-aminoethyl)amids **47** erfolgte durch Umsetzung von 0,5 g (1,0 mmol) 2-Tetradecylicosa-11-ensäure **25** mit 1,3 ml (19,7 mmol) Ethylendiamin **28** nach Variante E.

MF231109 C₃₆H₇₂N₂O

M = 548,97 g/mol

R_f: 0,40 (LM 2)

mp: 60 °C

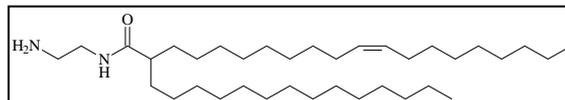
Ausbeute: Variante E: 89 % (0,48 g)

ESI-MS: positiv: 549,5 g/mol [M+H]

EA: ber.: C = 78,76 % H = 13,22 % N = 5,10 %

gef.: C = 78,76 % H = 12,70 % N = 4,44 %

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ [ppm] = 0,88 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [H₃C-CH₂-CH₂-]); 1,19-1,60 (54 H, m, [H₃C-(CH₂)₁₃-] und [H₃C-(CH₂)₆-CH₂-CH=CH-CH₂-(CH₂)₇-] sowie [H₂N-CH₂-]); 1,94-2,06 (5H, m [H₃C-(CH₂)₆-CH₂-CH=CH-CH₂-(CH₂)₇-] und [-CH-CO-]); 2,96 (2H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 6,2 Hz [H₂N-CH₂-]); 3,41 (2H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 6,2 Hz [H₂N-CH₂-CH₂-NH-CO]); 5,32-5,36 (2H, m [-CH=CH-]); 6,24(1H, s, [-NH-CO-])

**2-Tetradecylhexadecansäure-(4-aminobutyl)amid - 32*** P₁₄

Die Synthese des 2-Tetradecylhexadecansäure-(4-aminobutyl)amids **32** (MF091104) erfolgte durch Umsetzung der 2-Tetradecylhexadecansäure **22** mit Butylendiamin **29** nach den Varianten A und B. Die analytischen Daten entsprachen der Literatur,^{69,83} ESI-MS: positiv: 524,1 g/mol [M+H], Ausbeute Variante A: 61 % (1,40 g ausgehend von 2,0 g Carbonsäure) und Variante B: 60 % (1,73 g ausgehend von 2,5 g Carbonsäure)

2-Hexadecyloctadecansäure-(4-aminobutyl)amid - 33* P₁₆

Die Synthese des 2-Hexadecyloctadecansäure-(4-aminobutyl)amids **33** (MF161104) erfolgte durch Umsetzung von 1,0 g (2,0 mmol) 2-Hexadecyloctadecansäure **24** mit 3,9 ml (40,3 mmol) Butylendiamin **29** nach Variante A. Die analytischen Daten entsprachen der Literatur,^{69,83} ESI-MS: positiv: 579,5 g/mol [M+H] und 1157,5 g/mol [2M], Ausbeute 19 % (0,22 g)

2-Tetradecylhexadecansäureamid (34) A₁₄

Die Synthese des 2-Tetradecylhexadecansäureamids **34** erfolgte durch Umsetzung von 1,0 g (2,2 mmol) 2-Tetradecylhexadecansäure **22** zum Säurechlorid und anschließender Reaktion mit 1,2 ml (0,75 mol) Ammoniak nach Variante A.

MF171104 C₃₀H₆₁NO

M = 451,81 g/mol

R_f: 0,55 (LM 3)

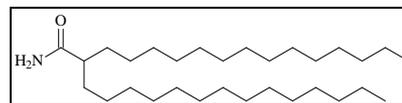
Ausbeute: 30 % (0,30 g)

ESI-MS: positiv: 452,9 g/mol (M+H)

EA: ber.: C = 79,75 % H = 13,61 % N = 3,10 %

gef.: C = 79,09 % H = 13,39 % N = 3,15 %

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ [ppm] = 0,86 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [H₃C-CH₂-CH₂-]); 1,19-1,59 (52H, m, 2 [H₃C-(CH₂)₁₃-]); 2,03-2,11 (1H, m [-CH-CO-]); 5,28 (2H, d, ⁴J_{NH₂/CH} = 33,0 Hz [H₂N-])

**2-Tetradecylhexadecansäure-{3-[4-(3-aminopropyl)aminobutyl]aminopropyl}amid - 39 S₁₄**

Die Synthese des 2-Tetradecylhexadecansäure-{3-[4-(3-aminopropyl)aminobutyl]aminopropyl}amids **39** erfolgte durch Umsetzung von 1,0 g (2,2 mmol) 2-Tetradecylhexadecansäure **22** mit 8,9 g (44,2 mmol) Spermin **37** nach Variante B.

MF210708 C₄₀H₈₄N₄O

M = 637,12 g/mol

R_f: 0,44 (LM 5)

mp: 69 °C

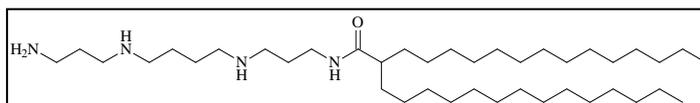
Ausbeute: Variante B: 54 % (0,38 g)

ESI-MS: positiv: 637,8 g/mol [M+H]

EA: ber.: C = 71,37 % H = 13,18 % N = 8,32 % (+2H₂O)

gef.: C = 72,05 % H = 13,25 % N = 8,22 %

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ [ppm] = 0,88 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2[H₃C-CH₂-CH₂-]); 1,10-1,68 (64H, m, 2 [H₃C-(CH₂)₁₃-] und 4 [-NH-CH₂-CH₂-] sowie [H₂N-CH₂-] und 2 [-CH₂-NH-CH₂-]); 1,92-1,98 (1H, m [-CH-CO-]); 2,58-2,73 (8H, m, 2 [-CH₂-NH-CH₂-]); 2,78 (2H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 6,2 Hz [H₂N-CH₂-]); 3,32-3,38 (2H, m [-CH₂-NH-CO-]); 6,59 (1H, s, [-NH-CO-])



2-Dodecyltetradecansäure-[2-bis(2-aminoethyl)aminoethyl]amid - 48 **T₁₂**

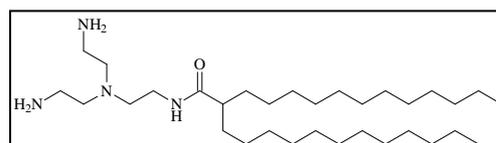
Die Synthese des 2-Dodecyltetradecansäure-[2-bis(2-aminoethyl)aminoethyl]amids **48** erfolgte durch Umsetzung von 1,0 g (2,5 mmol) 2-Dodecyltetradecansäure **21** mit 7,5 ml (50,4 mmol) Tris(aminoethyl)amin **38** nach Variante E. Die Verbindung konnte trotz mehrfacher Durchführung der MPLC nicht rein gewonnen werden und wurde als Rohprodukt weiter umgesetzt.

MF110809 C₃₂H₆₈N₄O

M = 524,91 g/mol

R_f: 0,50 (LM 5)

ESI-MS: positiv: 526,0 g/mol [M+H]

**2-Tetradecylhexadecansäure-[2-bis(2-aminoethyl)aminoethyl]amid - 40** **T₁₄**

Die Synthese des 2-Tetradecylhexadecansäure-[2-bis(2-aminoethyl)aminoethyl]amids **40** (MF020708) erfolgte durch Umsetzung der 2-Tetradecylhexadecansäure **22** mit Tris(aminoethyl)amin **38** nach den Varianten B und E. Die analytischen Daten entsprachen der Literatur,^{69,83} ESI-MS: positiv: 581,7 g/mol [M+H], Ausbeute Variante B: 42 % (0,27 g ausgehend von 0,5 g Carbonsäure) und Variante E: 22 % (0,56 g ausgehend von 2,0 g Carbonsäure)

2-Tetradecyloctadecansäure-[2-bis(2-aminoethyl)aminoethyl]amid - 49 **T_{14/16}**

Die Synthese des 2-Tetradecyloctadecansäure-[2-bis(2-aminoethyl)aminoethyl]amids **49** erfolgte durch Umsetzung von 1,0 g (2,1 mmol) 2-Tetradecyloctadecansäure **23** mit 6,2 ml (41,6 mmol) Tris(aminoethyl)amin **38** nach Variante E.

MF040809 C₃₈H₈₀N₄O

M = 609,07 g/mol

R_f: 0,54 (LM 5)

mp: 59 °C

Ausbeute: Variante E: 34 % (0,43 g)

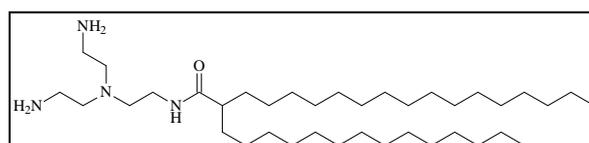
ESI-MS: positiv: 610,0 g/mol [M+H]

HR-ESI-MS: ber.: 609,6397 g/mol gef.: 609,6405 g/mol

EA: ber.: C = 74,94 % H = 13,24 % N = 9,20 %

gef.: C = 74,84 % H = 13,15 % N = 8,97 %

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ [ppm] = 0,85 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [H₃C-CH₂-CH₂-]); 1,17-1,56 (60H, m, [H₃C-(CH₂)₁₃-] und [H₃C-(CH₂)₁₅-] sowie 2 [H₂N-CH₂-]); 2,03-2,12 (1H, m [-CH-CO-]); 2,53 (6H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 6,2 Hz,



2 [H₂N-CH₂-CH₂-N-] und [-CH₂-CH₂-NH-CO]; 2,71 (4H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 6,2Hz, 2[H₂N-CH₂-]); 3,24 (2H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 6,6Hz [-CH₂-NH-CO])

2-Hexadecyloctadecansäure-[2-bis(2-aminoethyl)aminoethyl]amid - 50 T₁₆

Die Synthese des 2-Hexadecyloctadecansäure-[2-bis(2-aminoethyl)aminoethyl]amids **50** erfolgte durch Umsetzung von 1,0 g (2,0 mmol) 2-Hexadecyloctadecansäure **24** mit 5,9 ml (39,3 mmol) Tris(aminoethyl)amin **38** nach Variante E.

MF111108 C₄₀H₈₄N₄O

M = 637,12 g/mol

R_f: 0,50 (LM 5)

mp: 75 °C

Ausbeute: Variante E: 50 % (0,62 g)

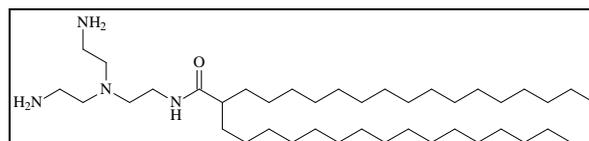
ESI-MS: positiv: 637,8 g/mol [M+H]

HR-ESI-MS: ber.: 637,6706 g/mol gef.: 637,6718 g/mol

EA: ber.: C = 73,33 % H = 13,23 % N = 8,55 % (+1H₂O)

gef.: C = 73,83 % H = 12,65 % N = 8,45 %

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ [ppm] = 0,87 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [H₃C-CH₂-CH₂-]); 1,20-1,60 (64H, m, 2 [H₃C-(CH₂)₁₅-] und 2 [H₂N-CH₂-]); 1,98-2,04 (1H, m [-CH-CO-]); 2,56 (6H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 6,2 Hz 2 [H₂N-CH₂-CH₂-N-] und [-N-CH₂-CH₂-NH-CO]); 2,78 (4H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 6,2 Hz, 2 [H₂N-CH₂-]); 3,31 (2H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 6,6 Hz [H₂N-CH₂-CH₂-NH-CO])



2-Dodecyltetradecansäure-[2-(2-aminoethyl-2-dodecyltetradecanoylaminoethyl)aminoethyl]amid - 52 T₁₂Dimer

Das 2-Dodecyltetradecansäure-[2-(2-aminoethyl-2-dodecyltetradecanoylaminoethyl)aminoethyl]amid **52** entstand bei der Synthese des 2-Dodecyltetradecansäure-[2-bis(2-aminoethyl)aminoethyl]amids **48** durch Umsetzung von 1,0 g (2,5 mmol) 2-Dodecyltetradecansäure **21** mit 7,5 ml (50,4 mmol) Tris(aminoethyl)amin **38** nach Variante E als Nebenprodukt. Die Verbindung konnte nicht isoliert werden und wurde als Rohprodukt weiter umgesetzt.

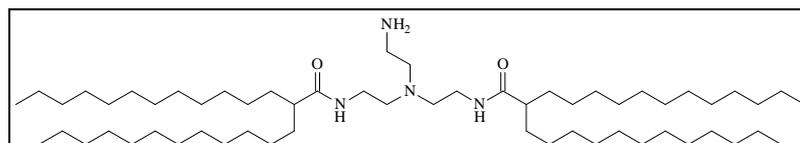
MF190809

C₅₈H₁₁₈N₄O₂

M = 903,58 g/mol

R_f: 0,48 (LM 2)

ESI-MS: positiv: 904,7 g/mol [M+H]



2-Tetradecylhexadecansäure-[2-(2-aminoethyl-2-tetradecylhexadecanoylaminoethyl)-aminoethyl]amid - 53 **T₁₄Dimer**

Das 2-Tetradecylhexadecansäure-[2-(2-aminoethyl-2-tetradecylhexadecanoylaminoethyl)aminoethyl]amid **53** entstand als Nebenprodukt bei der Synthese des 2-Tetradecylhexadecansäure-[2-bis(2-aminoethyl)aminoethyl]amids **40** durch Reaktion von 2,0 g (4,4 mmol) 2-Tetradecylhexadecansäure **22** mit 13,2 ml (88,3 mmol) Tris(aminoethyl)amin **38** nach Variante E.

MF260808

C₆₆H₁₃₄N₄O₂

M = 1015,50 g/mol

R_f: 0,36 (LM 1)

mp: 70 °C

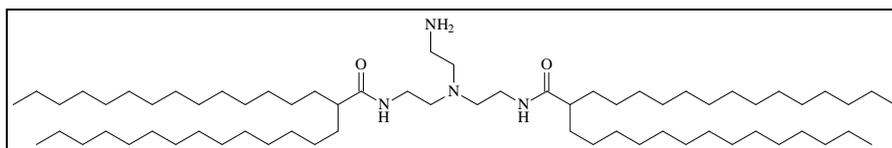
Ausbeute: Variante E: Nebenprodukt (0,19 g)

ESI-MS: positiv: 1016,0 g/mol [M+H]

EA: ber.: C = 76,68 % H = 13,26 % N = 5,42 % (+1H₂O)

gef.: C = 76,47 % H = 13,06 % N = 5,43 %

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ [ppm] = 0,80 (12H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 4 [H₃C-CH₂-CH₂-]); 1,10-1,52 (106H, m, 4 [H₃C-(CH₂)₁₃-] und [H₂N-CH₂-]); 2,00-2,11 (2H, m [-CH-CO-]); 2,51 (4H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 6,2 Hz, 2 [-CO-NH-CH₂-CH₂-N-]); 2,61 (2H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 6,2 Hz [H₂N-CH₂-CH₂-]); 2,79 (2H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 5,8 Hz [H₂N-CH₂-CH₂-]); 3,13-3,22 (4H, m, 2 [H₂N-CH₂-CH₂-NH-CO])



2-Hexadecyloctadecansäure-[2-(2-aminoethyl-2-hexadecyloctadecanoylaminoethyl)-aminoethyl]amid - 54 **T₁₆Dimer**

Das 2-Hexadecyloctadecansäure-[2-(2-aminoethyl-2-hexadecyloctadecanoylaminoethyl)aminoethyl]amid **54** entstand als Nebenprodukt bei der Synthese des 2-Hexadecyloctadecansäure-[2-bis(2-aminoethyl)aminoethyl]amids **50** durch Umsetzung von 1,0 g (2,0 mmol) 2-Hexadecyloctadecansäure **24** mit 5,9 ml (39,3 mmol) Tris(aminoethyl)amin **38** nach Variante E.

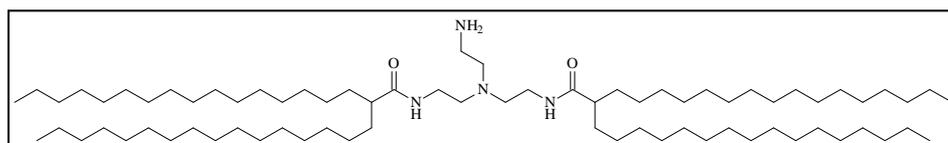
MF030409

C₇₄H₁₅₀N₄O₂

M = 1128,01 g/mol

R_f: 0,32 (LM 1)

ESI-MS: positiv: 1128,0 g/mol [M]



6.3.2.3 Einführung der polaren Kopfgruppe

Kupplungsreaktion mit BOC-geschütztem Glycin

Die Verbindungen **30-33** wurden jeweils im Verhältnis 1:1:1 mit BOC-geschütztem Glycin und HOBT in 10ml Dichlormethan suspendiert und mit der 1,5fachen molaren Menge DCC versetzt. Der Reaktionsansatz wurde zunächst klar, kurz darauf bildete sich ein weißer Niederschlag. Dieser wurde abfiltriert und aus Heptan sowie aus Methanol umkristallisiert.

2-Tetradecylhexadecansäure-{2-[2-(*tert.*butoxycarbonyl)amino-1-oxoethyl]aminoethyl}-amid - 67* E₁₄BOCGly

Durch Umsetzung von 0,5 g (1,0 mmol) 2-Tetradecylhexadecansäure-(2-aminoethyl)amid **30** mit 0,18 g (1,0 mmol) BOC-Glycin wurde die Verbindung **67** (MF 191004) hergestellt. Die analytischen Daten entsprachen der Literatur;^{69,83} ESI-MS: positiv: 674,6 g/mol [M+Na], Ausbeute 90 % (0,58 g)

2-Hexadecyloctadecansäure-{2-[2-(*tert.*butoxycarbonyl)amino-1-oxoethyl]aminoethyl}-amid - 68* E₁₆BOCGly

Durch Umsetzung von 0,50 g (1,8 mmol) 2-Hexadecyloctadecansäure-(2-aminoethyl)amid **31** mit 0,32 g (1,8 mmol) BOC-Glycin wurde die Verbindung **68** (MF 301104) hergestellt. Die analytischen Daten entsprachen der Literatur;^{69,83} ESI-MS: positiv: 730,9 g/mol [M+Na], Ausbeute 73 % (0,47 g)

2-Tetradecylhexadecansäure-{4-[2-(*tert.*butoxycarbonyl)amino-1-oxoethyl]aminobutyl}-amid - 69* P₁₄BOCGly

Durch Umsetzung von 0,50 g (1,0 mmol) 2-Tetradecylhexadecansäure-(4-aminobutyl)amid **32** mit 0,17 g (1,0 mmol) BOC-Glycin wurde die Verbindung **69** (MF 291104) hergestellt. Die analytischen Daten entsprachen der Literatur;^{69,83} ESI-MS: positiv: 702,6 g/mol [M+Na], Ausbeute 78 % (0,51 g)

2-Hexadecyloctadecansäure-{4-[2-(*tert.*butoxycarbonyl)amino-1-oxoethyl]aminobutyl}-amid - 70* P₁₆BOCGly

Durch Umsetzung von 0,50 g (0,9 mmol) 2-Hexadecyloctadecansäure-(4-aminobutyl)amid **33** mit 0,15 g (0,9 mmol) BOC-Glycin wurde die Verbindung **70** (MF 080305) hergestellt. Die

analytischen Daten entsprachen der Literatur;^{69,83} ESI-MS: positiv: 758,7 g/mol [M+Na], Ausbeute 72 % (0,46 g)

Kupplungsreaktionen mit BOC-Leucin, BOC-Methionin, BOC-Prolin und BOC-Threonin

Das 2-Tetradecylhexadecansäure-(2-aminoethyl)amid **30** wurde mit BOC-geschütztem Leucin bzw. BOC-geschütztem Methionin sowie HOBt im Verhältnis 1:1:1 in 10 ml Dichlormethan suspendiert und mit der 1,5fachen molaren Menge DCC versetzt. Auf gleiche Art und Weise wurde die Verbindung **31** mit BOC-Prolin und das Lipid **32** mit BOC-Threonin umgesetzt. Der weiße Niederschlag, der sich nach wenigen Minuten bildete, wurde abfiltriert und aus Heptan sowie aus Methanol umkristallisiert.

2-Tetradecylhexadecansäure-{2-[2-(*tert.*butoxycarbonyl)amino-4-methyl-1-oxopentyl]-aminoethyl}amid - 71* E₁₄BOCLEu

Die Darstellung der Verbindung **71** (MF271004) erfolgte durch Reaktion von 0,50 g (1,0 mmol) 2-Tetradecylhexadecansäure-(2-aminoethyl)amid **30** mit 0,23 g (1,0 mmol) BOC-Leucin. Die analytischen Daten entsprachen der Literatur;^{69,83} ESI-MS: positiv: 731,0 g/mol [M+Na], Ausbeute 67 % (0,48 g)

2-Tetradecylhexadecansäure-{2-[2-(*tert.*butoxycarbonyl)amino-4-methylthio-1-oxobutyl]aminoethyl}amid - 72* E₁₄BOCMet

Die Darstellung der Verbindung **72** (MF031104) erfolgte durch Reaktion von 0,50 g (1,0 mmol) 2-Tetradecylhexadecansäure-(2-aminoethyl)amid **30** mit 0,25 g (1,0 mmol) BOC-Methionin. Die analytischen Daten entsprachen der Literatur;^{69,83} ESI-MS: positiv: 749,0 g/mol [M+Na], Ausbeute 57 % (0,42 g)

2-Tetradecylhexadecansäure-{4-[2-(*tert.*butoxycarbonyl)amino-3-hydroxy-1-oxobutyl]-aminobutyl}amid - 73* P₁₄BOCThr

Die Darstellung der Verbindung **73** (MF281104) erfolgte durch Reaktion von 0,50 g (1,0 mmol) 2-Tetradecylhexadecansäure-(4-aminobutyl)amid **32** mit 0,21 g (1,0 mmol) BOC-Threonin. Die analytischen Daten entsprachen der Literatur;^{69,83} ESI-MS: positiv: 749,0 g/mol [M+Na], Ausbeute 66 % (0,46 g)

2-Hexadecyloctadecansäure-{2-[N-(*tert.*butoxycarbonyl)pyrrolidin-2-yl-carbonyl]-aminoethyl}amid - 74* E₁₆BOCPro

Die Darstellung der Verbindung **74** (MF011204) erfolgte durch Reaktion von 0,50 g (0,9 mmol) 2-Hexadecyloctadecansäure-(2-aminoethyl)amid **31** mit 0,20 g (0,9 mmol) BOC-Prolin. Die analytischen Daten entsprachen der Literatur;^{69,83} ESI-MS: positiv: 770,9 g/mol [M+Na], Ausbeute 63 % (0,43 g)

Kupplungsreaktionen mit CBZ-Glycin und CBZ-geschütztem Lysin

2-Tetradecylhexadecansäure-(2-aminoethyl)amid **30** wurde jeweils im Verhältnis 1:1:1 mit CBZ-geschütztem Glycin bzw. CBZ-geschütztem Lysin und HOBt in 10 ml Dichlormethan suspendiert und mit der 1,5fachen molaren Menge DCC versetzt. Der Reaktionsansatz wurde zunächst klar. Der im Anschluss daran gebildete weiße Niederschlag wurde abfiltriert und aus Heptan sowie aus Methanol umkristallisiert.

2-Tetradecylhexadecansäure-{2-[2-(carboxybenzyl)amino-1-oxoethyl]aminoethyl}amid 75* E₁₄CBZGly

Verbindung **75** (MF021104) wurde durch Umsetzung von 0,50 g (1,0 mmol) 2-Tetradecylhexadecansäure-(2-aminoethyl)amids **30** mit 0,21 g (1,0 mmol) CBZ-Glycin hergestellt. Die analytischen Daten entsprachen den Angaben der Literatur;^{69,83} ESI-MS: positiv: 686,9 g/mol [M+H], Ausbeute 69 % (0,48 g)

2-Tetradecylhexadecansäure-{2-[2,6-(dicarboxybenzyl)diamino-1-oxohexyl]aminoethyl}-amid - 76* E₁₄diCBZLys

Verbindung **76** (MF100305) wurde durch Umsetzung von 0,50 g (1,0 mmol) 2-Tetradecylhexadecansäure-(2-aminoethyl)amids **30** mit 0,42 g (1,0 mmol) CBZ-geschütztem Lysin hergestellt. Die analytischen Daten entsprachen den Angaben der Literatur;^{69,83} ESI-MS: positiv: 914,9 g/mol [M+Na], Ausbeute 54 % (0,49 g)

Kupplungsreaktion mit aktiviertem, BOC-geschütztem Lysin

Die Carbonsäureamide mit einem Ethylendiamin- bzw. Butylendiamin-Spacer **30-33/45-47** (E₁₄, E₁₆, P₁₄, P₁₆ und E₁₂, E_{14/16}, E_{18u14}) wurden jeweils in einem 50 ml Rundkolben in 10 ml abs. Dichlormethan gelöst und unter Rühren mit DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid im

Verhältnis 1:1 und wenigen Tropfen Triethylamin versetzt. Die Substanzen mit einem Tris(aminoethyl)amin-Spacer **40/48-50** (T₁₄, T₁₂, T_{14/16} und T₁₆) wurden aufgrund der zwei vorhandenen freien Aminogruppen mit DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid im Verhältnis 1:2 umgesetzt. Der Reaktionsansatz wurde zwölf Stunden gerührt und darauf folgend am Rotationsverdampfer eingengt. Die Abspaltung der Schutzgruppe erfolgte unter Verzicht der Aufreinigung der BOC-geschützten Zwischenprodukte.

Variante A: Entfernen der BOC-Schutzgruppen durch Zugabe von konz. Salzsäure

Die BOC-Schutzgruppen der Verbindungen **86/91-116** wurden ohne vorherige Produktreinigung direkt nach der Kupplung mit DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid durch Zugabe weniger Tropfen konz. Salzsäure zu einer Suspension der Substanzen in 10 ml Ethylacetat unter Rühren über zwei Stunden entfernt. Das Lösungsmittel wurde anschließend am Rotationsverdampfer entfernt. Im Vakuum über P₂O₅ getrocknet konnten die Produkte chromatographisch mit einem Elutionsgemisch aus Chloroform/Methanol/Ammoniak steigender Polarität unter Verwendung des MPLC-Verfahrens gereinigt werden.

Variante B: Entfernen der BOC-Schutzgruppen durch Einleiten von HCl-Gas

Die Verbindungen **67-74** (E₁₄BOCGly, E₁₆BOCGly, P₁₄BOCGly, P₁₆BOCGly, E₁₄BOCLEu, E₁₄BOCMet, P₁₄BOCThr und E₁₄BOCPro) wurden in einem 50ml Zweihalskolben in 10ml Ethylacetat unter Rühren suspendiert. Diesen Suspensionen wurde für 15 Minuten HCl-Gas zugeführt. Die Kolben wurden daraufhin fest verschlossen und solange gerührt, bis sich eine klare Lösung bildete. Nach dem Entfernen des Ethylacetats am Rotationsverdampfer wurden die Verbindungen säulenchromatographisch mit einem Elutionsgemisch aus Chloroform/-Methanol/Ammoniak steigender Polarität gereinigt.

Variante C: Entfernen der CBZ-Schutzgruppen durch Hydrierung

Die Verbindungen **75** (E₁₄CBZGly) und **76** (E₁₄diCBZLys) wurden in einem Gemisch aus jeweils 10ml Isopropanol und Ethylacetat suspendiert und in ein Hydriergefäß überführt. Dem Reaktionsansatz wurden zwei Spatelspitzen Palladiumaktivkohle 10 % als Katalysator zugefügt. Nach erfolgter Evakuierung des Hydriergefäßes wurde dieses in die Hydrierapparatur eingesetzt und mit H₂ befüllt. Die Hydrierung erfolgte unter

Wasserstoffatmosphäre innerhalb von 24 Stunden. Im Anschluß wurde die Aktivkohle sorgfältig abfiltriert und das Lösungsmittelgemisch am Rotationsverdampfer entfernt. Die Reinigung der Produkte erfolgte säulenchromatographisch mit einem Elutionsgemisch aus Chloroform/Methanol/Ammoniak steigender Polarität.

Die Abspaltung der verschiedenen Schutzgruppen des Lipids **77** sollte ebenfalls durch das Hydrierungsverfahren erfolgen. Das erhaltene Rohprodukt wurde zunächst in einem Gemisch aus abs. Ethanol und Ethylacetat suspendiert und nachfolgend in der Hydrierapparatur bei 30°C und einem Druck von 3bar über mehrere Tage gerührt. Anschließend wurde filtriert und das Lösungsmittelgemisch am Rotationsverdampfer entfernt. Durch Zugabe konz. Salzsäure zur Suspension des Zwischenproduktes in Ethylacetat konnte letztlich entsprechend Variante A auch die BOC-Schutzgruppe aus der Verbindung unter Erhalt des Lipids **88** entfernt werden. Die Reinigung des Produktes erfolgte mittels MPLC mit einem Elutionsgemisch aus Chloroform/Methanol/-Ammoniak steigender Polarität.

2-Tetradecylhexadecansäure-[2-(2-amino-1-oxoethyl)aminoethyl]amid - 78* **E₁₄Gly**

Das 2-Tetradecylhexadecansäure-[2-(2-amino-1-oxoethyl)aminoethyl]amid **78** (MF191004II) wurde sowohl nach Variante B aus 0,58 g (0,9 mmol) E₁₄BOCGly **67**, Ausbeute: 43 % (0,21 g), als auch nach Variante C aus 0,48 g (0,7 mmol) E₁₄CBZGly **75**, Ausbeute: 37,5 % (0,14 g), hergestellt. Die analytischen Daten entsprachen der Literatur;^{69,83} ESI-MS: positiv: 552,6 g/mol [M+H] und 1104,4 g [2M+H]

2-Hexadecyloctadecansäure-[2-(2-amino-1-oxoethyl)aminoethyl]amid - 79* **E₁₆Gly**

Das 2-Hexadecyloctadecansäure-[2-(2-amino-1-oxoethyl)aminoethyl]amid **79** (MF301104II) wurde nach Variante B aus 0,47 g (0,7 mmol) E₁₆BOCGly **68** hergestellt. Die analytischen Daten entsprachen der Literatur;^{69,83} Ausbeute: 64 % (0,26 g) ESI-MS: positiv: 608,6 g/mol [M+H]

2-Tetradecylhexadecansäure-[4-(2-amino-1-oxoethyl)aminobutyl]amid - 80* **P₁₄Gly**

Das 2-Tetradecylhexadecansäure-[4-(2-amino-1-oxoethyl)aminobutyl]amid **80** (MF291104II) wurde nach Variante B aus 0,51 g (0,7 mmol) P₁₄BOCGly **69** hergestellt. Die analytischen Daten entsprachen der Literatur;^{69,83} Ausbeute: 74 % (0,32 g) ESI-MS: positiv: 581,7 g/mol [M+H] und 1160,2 g/mol [2M]

2-Hexadecyloctadecansäure-[4-(2-amino-1-oxoethyl)aminobutyl]amid - 81* P₁₆Gly

Das 2-Hexadecyloctadecansäure-[4-(2-amino-1-oxoethyl)aminobutyl]amid **81** (MF080305II) wurde nach Variante B aus 0,46 g (0,6 mmol) P₁₆BOCGly **70** hergestellt. Die analytischen Daten entsprachen der Literatur;^{69,83} Ausbeute: 43 % (0,17 g) ESI-MS: positiv: 637,2 g/mol [M+H]

2-Tetradecylhexadecansäure-[2-(2-amino-4-methyl-1-oxopentyl)aminoethyl]amid - 82* E₁₄Leu

Das 2-Tetradecylhexadecansäure-[2-(2-amino-4-methyl-1-oxopentyl)aminoethyl]amid **82** (MF271004II) wurde nach Variante B aus 0,48 g (0,7 mmol) E₁₄BOCLEu **71** hergestellt. Die analytischen Daten entsprachen der Literatur;^{69,83} Ausbeute: 41 % (0,17 g) ESI-MS: positiv: 609,8 g/mol [M+H]

2-Tetradecylhexadecansäure-[2-(2-amino-4-methylthio-1-oxobutyl)aminoethyl]amid 83* E₁₄Met

Das 2-Tetradecylhexadecansäure-[2-(2-amino-4-methylthio-1-oxobutyl)aminoethyl]amid **83** (MF031104II) wurde nach Variante B aus 0,42 g (0,6 mmol) E₁₄BOCMet **72** hergestellt. Die analytischen Daten entsprachen der Literatur;^{69,83} Ausbeute: 77 % (0,28 g) ESI-MS: positiv: 627,5 g/mol [M+H]

2-Tetradecylhexadecansäure-[4-(2-amino-3-hydroxy-1-oxobutyl)aminobutyl]amid - 84* P₁₄Thr

Das 2-Tetradecylhexadecansäure-[4-(2-amino-3-hydroxy-1-oxobutyl)aminobutyl]amid **84** (MF281104II) wurde nach Variante B aus 0,46 g (0,6 mmol) P₁₄BOCThr **73** hergestellt. Die analytischen Daten entsprachen der Literatur;^{69,83} Ausbeute: 66 % (0,26 g) ESI-MS: positiv: 625,8 g/mol [M+2H]

2-Hexadecyloctadecansäure-[2-(pyrrolidin-2-yl-carbonylamino)aminoethyl]amid - 85* E₁₆Pro

Das 2-Hexadecyloctadecansäure-[2-(pyrrolidin-2-yl-carbonylamino)aminoethyl]amid **85** (MF011204II) wurde nach Variante B aus 0,43 g (0,6 mmol) E₁₆BOCPro **74** hergestellt. Die analytischen Daten entsprachen der Literatur;^{69,83} Ausbeute: 75 % (0,28 g) ESI-MS: positiv: 649,9 g/mol [M+2H]

2-Tetradecylhexadecansäure-{2-[2-(*tert.*butoxycarbonyl)amino-5-guanidino-1-oxopentyl]aminoethyl}amid - **87** E₁₄BOCArg

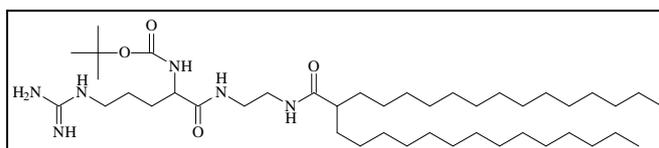
Durch Umsetzung von 0,23g (0,5 mmol) 2-Tetradecylhexadecansäure-(2-aminoethyl)amid **30** mit 0,25 g (0,5 mmol) *N*_α-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*_δ,*N*_ω-di-Carboxybenzyl-L-arginin unter Verwendung von 0,24 g (0,5 mmol) PyBOP als Kupplungsreagenz wurde zunächst Verbindung **77** hergestellt. Dazu wurden die einzelnen Komponenten in 10 ml Dichlormethan aufgenommen und mit einigen Tropfen TEA versetzt. Nach einem Reaktionszeitraum von zwölf Stunden erfolgte die Aufarbeitung durch Filtration und dreimaligem Waschen der organischen Phase. Nachfolgend wurde über Na₂SO₄ getrocknet, erneut filtriert und das Dichlormethan am Rotationsvakuumverdampfer entfernt. Die CBZ-Schutzgruppen der erhaltenen Verbindung wurden entsprechend Variante C aus dem Molekül entfernt und somit das 2-Tetradecylhexadecansäure-{2-[2-(*tert.*butoxycarbonyl)amino-5-guanidino-1-oxopentyl]-aminoethyl}amid **87** erhalten. Die Verbindung wurde als Rohprodukt weiter umgesetzt.

MF090809 C₄₃H₈₆N₆O₄

M = 751,18 g/mol

R_f: 0,52 (LM 5)

ESI-MS: positiv: 751,9 g/mol [M+H]



2-Tetradecylhexadecansäure-[2-(2-amino-5-guanidino-1-oxopentyl)aminoethyl]amid **88** E₁₄Arg

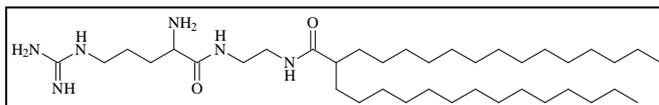
Das 2-Tetradecylhexadecansäure-[2-(2-amino-5-guanidino-1-oxopentyl)aminoethyl]amid **88** wurde nach Variante A aus 2-Tetradecylhexadecansäure-{2-[2-(*tert.*butoxycarbonyl)amino-5-guanidino-1-oxopentyl]aminoethyl}amid **87** hergestellt. Die Durchführung der MPLC führte nicht zu der erzielten Reinigung der Verbindung.

MF100809 C₃₈H₇₈N₆O₂

M = 651,07 g/mol

R_f: 0,33 (LM 5)

ESI-MS: positiv: 651,6 g/mol [M+H]



2-Dodecyltetradecansäure-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]amid - **91** E₁₂Lys

Das 2-Dodecyltetradecansäure-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]amid **91** wurde durch Umsetzung von 1,00 g (3,0 mmol) 2-Dodecyltetradecansäure-(2-aminoethyl)amid **45** mit 1,01 g (3,0 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid hergestellt. Die BOC-Schutzgruppen wurden entsprechend Variante A aus dem Molekül entfernt. Die Verbindung **91** konnte DC-

rein erhalten werden, enthielt jedoch große Mengen an Lösungsmittel und Wasser, welche nicht durch Trocknungsprozesse im Vakuum über P_2O_5 oder am Rotationsvakuumverdampfer über mehrere Stunden bis Tage entfernt werden konnten. Folglich war eine exakte Auswertung des 1H NMR-Spektrums nicht möglich.

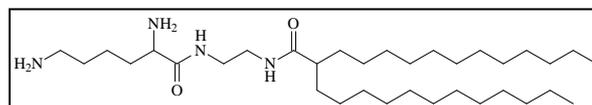
MF200809 $C_{34}H_{70}N_4O_2$

M = 566,95 g/mol

R_f: 0,48 (LM 5)

ESI-MS: positiv: 568,0 g/mol [M+H]

HR-ESI-MS: ber.: 567,5572 g/mol gef.: 567,5587 g/mol



2-Tetradecylhexadecansäure-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]amid - **86*** E₁₄Lys

Verbindung **86** (MF100305II) wurde zum einen durch Umsetzung von 0,75 g (1,5 mmol) 2-Tetradecylhexadecansäure-(2-aminoethyl)amid **30** mit 0,67 g (1,5 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid hergestellt. Die BOC-Schutzgruppen wurden entsprechend Variante A aus dem Molekül entfernt. Zum anderen konnte das Transfektionslipid durch Abspaltung der Schutzgruppen nach Variante C aus 0,49 g (0,5 mmol) der Verbindung E14diCBZLys **76** erhalten werden. Die analytischen Daten entsprachen den Angaben der Literatur;^{69,83} ESI-MS: positiv: 623,9 g/mol [M+H] und 1246,8 g/mol [2M+H] Ausbeute: Variante A: 66 % (0,62 g), Variante C: 38 % (0,13 g)

2-Tetradecyloctadecansäure-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]amid - **93** E_{14/16}Lys

Das 2-Tetradecyloctadecansäure-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]amid **93** wurde durch Umsetzung von 1,10 g (2,1 mmol) 2-Tetradecyloctadecansäure-(2-aminoethyl)amid **46** mit 0,93 g (2,1 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid hergestellt. Die BOC-Schutzgruppen wurden entsprechend Variante A aus dem Molekül entfernt.

MF231009 $C_{40}H_{82}N_4O_2$

M = 651,10 g/mol

R_f: 0,48 (LM 5)

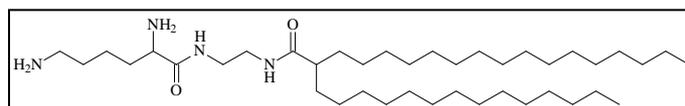
Ausbeute: 56,95 % (0,78 g)

ESI-MS: positiv: 651,6 g/mol [M+H]

HR-ESI-MS: ber.: 651,6511 g/mol gef.: 651,6504 g/mol

EA: ber.: C = 68,09 % H = 12,14 % N = 7,94 % (+1H₂O,1HCl)

gef.: C = 67,95 % H = 12,06 % N = 7,93 %



$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ [ppm] = 0,85 (6H, t, $^3J_{\text{CH}_3/\text{CH}_2} = 6,6$ Hz, 2 [$\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$]); 1,17-1,55 (62H, m, [$\text{H}_3\text{C-(CH}_2\text{)}_{13}\text{-}$] und [$\text{H}_3\text{C-(CH}_2\text{)}_{15}\text{-}$] sowie 2 [$\text{H}_2\text{N-}$] und [$\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$]); 1,58-1,68 (2H, m, [$\text{H}_2\text{N-(CH}_2\text{)}_2\text{-CH}_2\text{-}$]); 1,68-1,78 (2H, m, [$\text{H}_2\text{N-(CH}_2\text{)}_3\text{-CH}_2\text{-CH-}$]); 2,05-2,15 (1H, m, [$\text{-CO-CH(CH}_2\text{)}_2\text{-}$]); 2,89 (2H, t, $^3J_{\text{CH}_2/\text{CH}_2} = 7,1$ Hz [$\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-}$]); 3,23-3,27 (4H, m, [$\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-}$]); 3,41-3,46 (1H, t, $^3J_{\text{CH}/\text{CH}_2} = 6,6$ Hz [$\text{NH}_2\text{-CH-CO-}$])

2-Hexadecyloctadecansäure-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]amid - **94** E_{16}Lys

Das 2-Hexadecyloctadecansäure-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]amid **94** wurde durch Umsetzung von 1,00 g (1,8 mmol) 2-Hexadecyloctadecansäure-(2-aminoethyl)amid **31** mit 0,80 g (1,8 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid hergestellt. Die BOC-Schutzgruppen wurden entsprechend Variante A aus dem Molekül entfernt.

MF240209 $\text{C}_{42}\text{H}_{86}\text{N}_4\text{O}_2$

M = 679,16 g/mol

R_f: 0,58 (LM 5)

Ausbeute: 40 % (0,49 g)

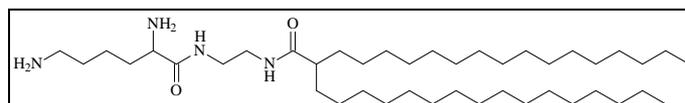
ESI-MS: positiv: 680,0 g/mol [M+H]

HR-ESI-MS: ber.: 679,6824 g/mol gef.: 679,6824 g/mol

EA: ber.: C = 74,28 % H = 12,76 % N = 8,25 %

gef.: C = 73,81 % H = 12,44 % N = 7,99 %

$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ [ppm] = 0,84 (6H, t, $^3J_{\text{CH}_3/\text{CH}_2} = 6,6$ Hz, 2 [$\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-}$]); 1,15-1,54 (68H, m, 2 [$\text{H}_3\text{C-(CH}_2\text{)}_{15}\text{-}$] und 2 [$\text{H}_2\text{N-}$] sowie [$\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-}$]); 1,62-1,70 (2H, m, [$\text{H}_2\text{N-(CH}_2\text{)}_3\text{-CH}_2\text{-CH-}$]); 2,02-2,10 (1H, m [$\text{-CO-CH(CH}_2\text{)}_2\text{-}$]); 2,69 (2H, t, $^3J_{\text{CH}_2/\text{CH}_2} = 7,1$ Hz [$\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-}$]); 3,19-3,24 (4H, m, [$\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-}$]); 3,26(1H, t, $^3J_{\text{CH}/\text{CH}_2} = 6,6$ Hz [$\text{NH}_2\text{-CH-CO-}$])



2-Tetradecylicosa-11-ensäure-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]amid - **96**

$\text{E}_{18u/14}\text{Lys}$

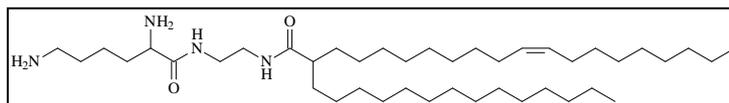
Das 2-Tetradecylicosa-11-ensäure-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]amid **96** wurde durch Umsetzung von 0,48 g (0,9 mmol) 2-Tetradecylicosa-11-ensäure-(2-aminoethyl)amid **47** mit 0,39 g (0,9 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid hergestellt. Die BOC-Schutzgruppen wurden entsprechend Variante A aus dem Molekül entfernt.

MF080110 $\text{C}_{42}\text{H}_{84}\text{N}_4\text{O}_2$

M = 677,14 g/mol

R_f: 0,70 (LM 5)

Ausbeute: 66 % (0,39 g)



ESI-MS: positiv: 678,1 g/mol [M+H]

HR-ESI-MS: ber.: 677,6667 g/mol gef.: 677,6663 g/mol

EA: ber.: C = 67,25 % H = 11,56 % N = 7,47 % (+2HCl)

gef.: C = 67,58 % H = 11,89 % N = 7,57 %

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ [ppm] = 0,83 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [H₃C-CH₂-]); 1,15-1,54 (58H, m, [H₃C-(CH₂)₁₃-] und [H₃C-(CH₂)₆-CH₂-CH=CH-CH₂-(CH₂)₇-] sowie 2 [H₂N-]) und [H₂N-CH₂-CH₂-]); 1,60-1,71 (2H, m, [H₂N-(CH₂)₂-CH₂-]); 1,73-1,82 (2H, m, [H₂N-(CH₂)₃-CH₂-CH-]); 1,87-2,00 (4H, m [-CH₂-CH=CH-CH₂-]); 2,05-2,14 (1H, m, [-CO-CH(CH₂)₂-]); 2,89 (2H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 7,1 Hz [H₂N-CH₂-]); 3,18-3,32 (4H, m, [-HN-CH₂-CH₂-NH-CO-]); 3,56 (1H, t, ³J_{CH/CH₂} = 6,6 Hz [NH₂-CH-CO-]); 5,26-5,34 (2H, m, [-CH=CH-])

2-Tetradecylhexadecansäure-[4-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminobutyl]amid - 92 P₁₄Lys

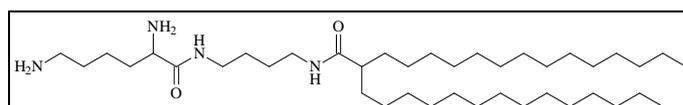
Das 2-Tetradecylhexadecansäure-[4-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminobutyl]amid **92** wurde durch Umsetzung von 1,10 g (2,1 mmol) 2-Tetradecylhexadecansäure-(4-aminobutyl)amid **32** mit 0,93 g (2,1 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid hergestellt. Die BOC-Schutzgruppen wurden entsprechend Variante A aus dem Molekül entfernt.

MF180809 C₄₀H₈₂N₄O₂

M = 651,11 g/mol

R_f: 0,55 (LM 5)

Ausbeute: 61 % (0,83 g)



ESI-MS: positiv: 652,5 g/mol [M+H]

EA: ber.: C = 68,09 % H = 12,14 % N = 7,94 % (+1H₂O, 1HCl)

gef.: C = 68,65 % H = 11,71 % N = 8,00 %

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ [ppm] = 0,85 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [H₃C-CH₂-]); 1,16-1,59 (62H, m, 2 [H₃C-(CH₂)₁₃-] und [-NH-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-NH-] sowie 2 [H₂N-] und [H₂N-CH₂-CH₂-]); 1,60-1,77 (4H, m, [H₂N-(CH₂)₂-(CH₂)₂-CH-]); 2,01-2,10 (1H, m [-CO-CH(CH₂)₂-]); 2,88 (2H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 7,1 Hz [H₂N-CH₂-]); 3,13-3,23 (4H, m, [-HN-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-NH-]); 3,38 (1H, t, ³J_{CH/CH₂} = 6,6 Hz [H₂N-CH-CO-])

2-Hexadecyloctadecansäure-[4-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminobutyl]amid - 95 P₁₆Lys

Das 2-Hexadecyloctadecansäure-[4-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminobutyl]amid **95** wurde durch Umsetzung von 0,19 g (0,3 mmol) 2-Hexadecyloctadecansäure-(4-aminobutyl)amid **33** mit 0,15 g (0,3 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid hergestellt. Die BOC-Schutzgruppen wurden entsprechend Variante A aus dem Molekül entfernt.

MF041208 C₄₄H₉₀N₄O₂

M = 707,21 g/mol

R_f: 0,58 (LM 5)

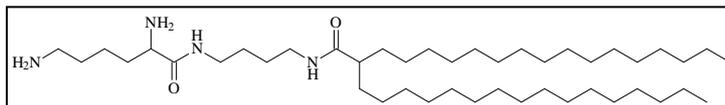
Ausbeute: 69 % (0,16 g)

ESI-MS: positiv: 708,1 g/mol [M+H]

EA: ber.: C = 64,75 % H = 11,86 % N = 6,86 % (+2HCl, 2H₂O)

gef.: C = 64,98 % H = 11,89 % N = 7,07 %

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ [ppm] = 0,81 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [H₃C-CH₂-]); 1,12-1,55 (70H, m, 2 [H₃C-(CH₂)₁₅-] und [-NH-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-NH-] sowie 2 [H₂N-] und [H₂N-CH₂-CH₂-]; 1,61-1,74 (2H, m, [H₂N-(CH₂)₂-CH₂-]); 1,74-1,86 (2H, m, [H₂N-(CH₂)₃-CH₂-]); 1,98-2,07 (1H, m [-CO-CH(CH₂)₂-]); 2,88 (2H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 7,1 Hz [H₂N-CH₂-]); 3,09-3,24 (4H, m, 2 [-HN-CH₂-]); 3,73 (1H, t, ³J_{CH/CH₂} = 6,6 Hz [NH₂-CH-CO-])

**2-Dodecyltetradecansäure-{2-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl-2-dodecyltetradecanoylaminoethyl]aminoethyl}amid - 97** T₁₂DimerLys

Das Transfektionslipid **97** wurde durch Umsetzung von 0,50 g (0,6 mmol) 2-Dodecyltetradecansäure-[2-(2-aminoethyl-2-dodecyltetradecanoylaminoethyl)amino-ethyl]amid **52** mit 0,50 g (1,2 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid hergestellt. Die BOC-Schutzgruppen wurden entsprechend Variante A aus dem Molekül entfernt. Die Verbindung konnte DC-rein erhalten werden, enthielt jedoch große Mengen an Lösungsmittel und Wasser, welche nicht durch Trocknungsprozesse im Vakuum über P₂O₅ oder am Rotationsvakuumverdampfer über mehrere Stunden bis Tage entfernt werden konnten.

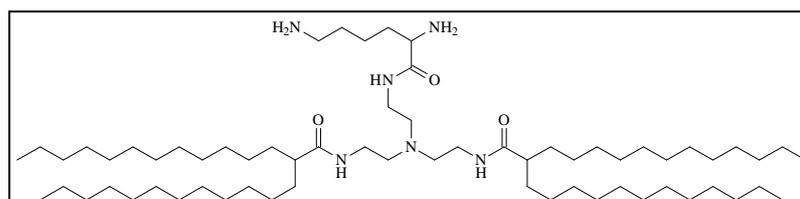
MF201009

C₆₄H₁₃₀N₆O₃

M = 1031,76 g/mol

R_f: 0,11 (LM 2)

ESI-MS: positiv: 1031,7 g/mol [M]



2-Tetradecylhexadecansäure-{2-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]-2-tetradecylhexadecanoylaminoethyl]aminoethyl}amid - **98** T₁₄DimerLys

Die Verbindung **98** wurde durch Umsetzung von 0,14g (0,1mmol) 2-Tetradecylhexadecansäure-[2-(2-aminoethyl-2-tetradecylhexadecanoylaminoethyl)aminoethyl]amid **53** mit 0,12 g (0,2 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid synthetisiert. Die BOC-Schutzgruppen wurden entsprechend Variante A aus dem Molekül entfernt. Das Transfektionslipid wurde DC-rein erhalten. Größere Mengen Wasser und Lösungsmittel konnten jedoch nicht durch Trocknungsprozesse im Vakuum über P₂O₅ oder am Rotationsvakuumverdampfer über mehrere Stunden bis Tage entfernt werden und verhinderten folglich die Auswertung analytischer Daten.

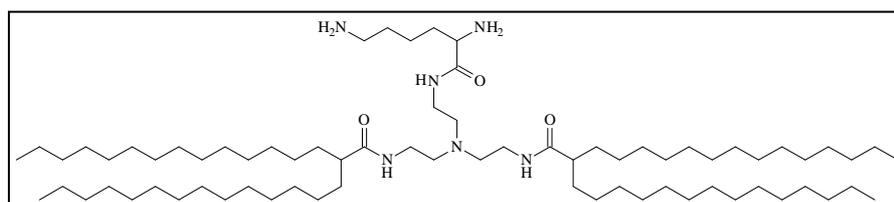
MF290908

C₇₂H₁₄₆N₆O₃

M = 1143,97 g/mol

R_f: 0,18 (LM 2)

ESI-MS: positiv: 1144,9 g/mol [M+H]



2-Dodecyltetradecansäure-{2-bis[(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]aminoethyl}amid (**99**) T₁₂diLys

Die Darstellung von T₁₂diLys **99** erfolgte durch Umsetzung von 0,49 g (0,9 mmol) 2-Dodecyltetradecansäure-[2-bis(2-aminoethyl)aminoethyl]amid **48** mit 0,83 g (1,8 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid und anschließender Abspaltung der Schutzgruppen nach Variante A.

MF281009 C₄₄H₉₂N₈O₃

M = 781,25 g/mol

R_f: 0,54 (LM 6)

Ausbeute: 0,31 g (aus Rohprodukt)

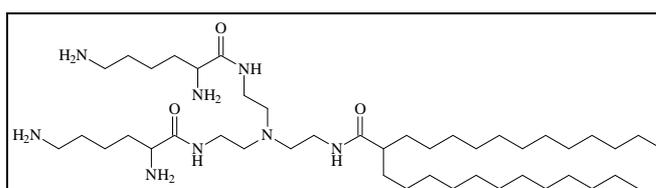
ESI-MS: positiv: 781,6 g/mol [M+H]

HR-ESI-MS: ber.: 781,7361 g/mol gef.: 781,7365 g/mol

EA: ber.: C = 64,66 % H = 11,84 % N = 13,71 % (+2H₂O)

gef.: C = 65,05 % H = 12,04 % N = 13,50 %

¹H-NMR: 500 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ [ppm] = 0,85 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,7 Hz, 2 [H₃C-CH₂-]); 1,20-1,55 (60H, m, 2 [H₃C-(CH₂)₁₁-] und 2 [H₂N-CH₂-(CH₂)₂-] sowie 4 [H₂N-]); 1,66-1,74 (4H, m, 2 [H₂N-(CH₂)₃-CH₂-CH-]); 2,09-2,17 (1H, m [-CO-CH(CH₂)₂-]); 2,55-2,64 (6H, m [-N(CH₂)₃-]); 2,68 (4H, t, ³J_{CH₂/CH₂} =



7,1Hz, 2 [H₂N-CH₂-]); 3,20-3,27 (6H, m, 3 [-CH₂-NH-CO]); 3,28-3,32 (2H, m, 2 [H₂N-CH-CO-]);

2-Tetradecylhexadecansäure-{2-bis[(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]aminoethyl}-amid - 100 T₁₄diLys

Die Darstellung des Lipids T₁₄diLys **100** erfolgte durch Umsetzung von 0,09 g (0,2 mmol) 2-Tetradecylhexadecansäure-[2-bis(2-aminoethyl)aminoethyl]amid **40** mit 0,07 g (0,4 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid und anschließender Abspaltung der BOC-Schutzgruppen nach Variante A.

MF040209 C₄₈H₁₀₀N₈O₃

M = 837,36 g/mol

R_f: 0,48 (LM 6)

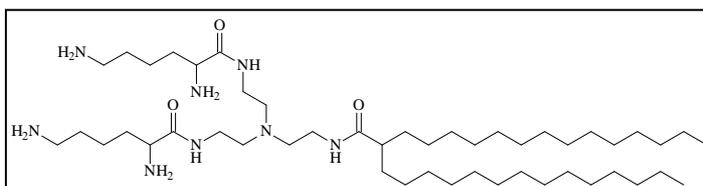
Ausbeute: 46 % (0,06 g)

ESI-MS: positiv: 837,8 g/mol [M+H]

EA: ber.: C = 63,33 % H = 11,29 % N = 12,31 % (+2HCl)

gef.: C = 63,30 % H = 11,02 % N = 11,62 %

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ [ppm] = 0,83 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [H₃C-CH₂-]); 1,16-1,56 (68H, m, 2 [H₃C-(CH₂)₁₃-] und 2 [H₂N-CH₂-(CH₂)₂-] sowie 4 [H₂N-]); 1,60-1,70 (4H, m, 2 [H₂N-(CH₂)₃-CH₂-]); 1,98-2,07 (1H, m [-CO-CH(CH₂)₂-]); 2,51-2,61 (6H, m [-N(CH₂)₃-]); 2,70 (4H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 7,1 Hz, 2 [H₂N-CH₂-]); 3,17-3,25 (6H, m, 3 [-CH₂-NH-CO]); 3,27-3,30 (2H, m, 2 [H₂N-CH-CO-])



2-Tetradecyloctadecansäure-{2-bis[(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]aminoethyl}-amid - 101 T_{14/16}diLys

Die Darstellung der Verbindung T_{14/16}diLys **101** erfolgte durch Umsetzung von 0,26 g (0,4 mmol) 2-Tetradecyloctadecansäure-[2-bis(2-aminoethyl)aminoethyl]amid **49** mit 0,38 g (0,9 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid und anschließender Abspaltung der BOC-Schutzgruppen nach Variante A.

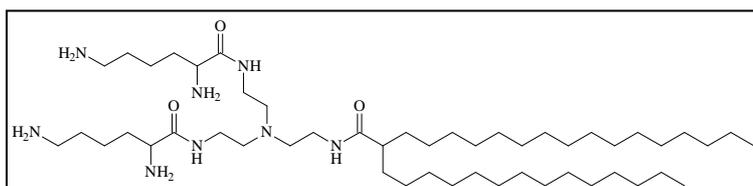
MF211009 C₅₀H₁₀₄N₈O₃

M = 865,41 g/mol

R_f: 0,58 (LM 6)

Ausbeute: 35 % (0,13 g)

ESI-MS: positiv: 865,6 g/mol [M]



HR-ESI-MS: ber.: 865,8305 g/mol gef.: 865,8304 g/mol

EA: ber.: C = 67,98 % H = 12,09 % N = 12,68 % (+ 1H₂O)

gef.: C = 68,04 % H = 11,59 % N = 13,20 %

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ [ppm] = 0,85 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [**H**₃C-CH₂-]); 1,15-1,55 (72H, m, [**H**₃C-(**CH**₂)₁₅-] und [**H**₃C-(**CH**₂)₁₃-] sowie 2 [**H**₂N-CH₂-(**CH**₂)₂-] und 4 [**H**₂N-]); 1,63-1,74 (4H, m, 2 [**H**₂N-(CH₂)₃-**CH**₂-]); 2,04-2,13 (1H, m [-CO-**CH**(CH₂)₂-]); 2,50-2,61 (6H, m [-N(**CH**₂)₃-]); 2,66 (4H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [**H**₂N-**CH**₂-]); 3,17-3,24 (6H, m, 3 [-**CH**₂-NH-CO]); 3,24-3,29 (2H, m, 2 [**H**₂N-**CH**-CO-])

2-Hexadecyloctadecansäure-{2-bis[(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]aminoethyl}-amid - **102** T₁₆diLys

Die Darstellung von T₁₆diLys **102** erfolgte durch Umsetzung von 0,50 g (0,8 mmol) 2-Hexadecyloctadecansäure-[2-bis(2-aminoethyl)aminoethyl]amid **50** mit 0,70 g (1,6 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid und anschließender Abspaltung der BOC-Schutzgruppen nach Variante A.

MF300309 C₅₂H₁₀₈N₈O₃

M = 893,47 g/mol

R_f: 0,53 (LM 6)

Ausbeute: 85 % (0,61 g)

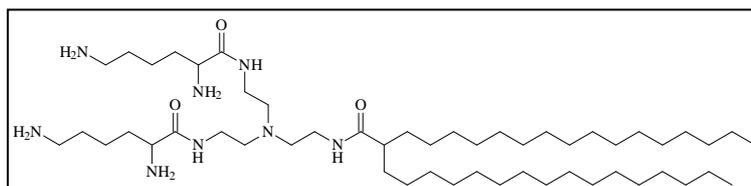
ESI-MS: positiv: 893,8 g/mol [M+H]

HR-ESI-MS: ber.: 893,8632 g/mol gef.: 893,8617 g/mol

EA: ber.: C = 68,52 % H = 12,16 % N = 12,29 % (+1H₂O)

gef.: C = 68,52 % H = 11,88 % N = 12,08 %

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ [ppm] = 0,87 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [**H**₃C-CH₂-]); 1,19-1,56 (80H, m, 2 [**H**₃C-(**CH**₂)₁₅-] und 2 [**H**₂N-CH₂-(**CH**₂)₂-] sowie 4 [**H**₂N-]); 1,64-1,74 (4H, m, 2 [**H**₂N-(CH₂)₃-**CH**₂-]); 2,10-2,19 (1H, m [-CO-**CH**(CH₂)₂-]); 2,55-2,63 (6H, m [-N(**CH**₂)₃-]); 2,67 (4H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [**H**₂N-**CH**₂-]); 3,20-3,28 (8H, m, 3 [-**CH**₂-NH-CO] und 2 [**H**₂N-**CH**-CO-])



2-Dodecyltetradecansäure-{2-(2-aminoethyl)-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]-aminoethyl}amid - 103 **T₁₂monoLys**

Das 2-Dodecyltetradecansäure-{2-(2-aminoethyl)-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]-aminoethyl}amid wurde als Nebenprodukt bei der Umsetzung von 0,49 g (0,9 mmol) 2-Dodecyltetradecansäure-[2-bis(2-aminoethyl)aminoethyl]amid **48** mit 0,83 g (1,8 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid und anschließender Abspaltung der BOC-Schutzgruppen entsprechend Variante A erhalten. Das Nebenprodukt wurde DC-rein erhalten. Größere Mengen Wasser und Lösungsmittel, die nicht durch Trocknungsprozesse im Vakuum über P₂O₅ oder am Rotationsvakuumverdampfer über mehrere Stunden bis Tage entfernt werden konnten, verhinderten jedoch die Auswertung analytischer Daten.

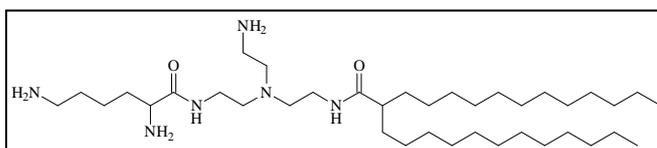
MF271009 C₃₈H₈₀N₆O₂

M = 653,08 g/mol

R_f: 0,27 (LM 5)

Ausbeute: 0,05 g (Nebenprodukt)

ESI-MS: positiv: 653,6 g/mol [M+H]



2-Tetradecylhexadecansäure-{2-(2-aminoethyl)-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]-aminoethyl}amid - 104 **T₁₄monoLys**

Das Transfektionslipid 2-Tetradecylhexadecansäure-{2-(2-aminoethyl)-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]aminoethyl}amid entstand als Nebenprodukt bei der Umsetzung von 0,09 g (0,2 mmol) 2-Tetradecylhexadecansäure-[2-bis(2-aminoethyl)aminoethyl]amid **40** mit 0,07 g (0,4 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid und anschließender Abspaltung der BOC-Schutzgruppen nach Variante A.

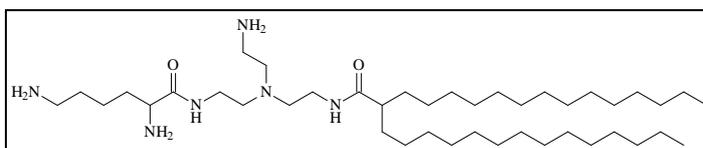
MF221009 C₄₂H₈₈N₆O₂

M = 709,6 g/mol

R_f: 0,23 (LM 5)

Ausbeute: 0,04 g (Nebenprodukt)

ESI-MS: positiv: 709,6 g/mol [M+H]



¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ [ppm] = 0,88 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,7 Hz, 2 [H₃C-CH₂-]); 1,20-1,56 (62H, m, 2 [H₃C-(CH₂)₁₃-] und [H₂N-CH₂-(CH₂)₂-] sowie 3 [H₂N-]); 1,71-1,78 (2H, m, [H₂N-(CH₂)₃-CH₂-]); 2,20-2,28 (1H, m [-CO-CH(CH₂)₂-]); 2,58-2,70 (4H, m [-NH-CH₂-CH₂-N-CH₂-CH₂-NH-]); 2,76-2,82 (2H, m, [H₂N-CH₂-CH₂-N-]); 2,92-3,04 (4H, m, 2 [H₂N-CH₂-]); 3,20-3,34 (4H, m, 2 [-CH₂-NH-CO-]); 3,41-3,45 (1H, m, [H₂N-CH-CO-])

2-Tetradecylhexadecansäure-(2-([2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)amino]-1-oxoethyl)aminoethyl)amid - 105 E₁₄GlyLys

Die Darstellung von 2-Tetradecylhexadecansäure-(2-([2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)amino]-1-oxoethyl)aminoethyl)amid **105** erfolgte durch Reaktion von 0,13 g (0,2 mmol) 2-Tetradecylhexadecansäure-[2-(2-amino-1-oxoethyl)aminoethyl]amid **78** mit 0,10 g (0,2 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid und anschließender Abspaltung der BOC-Schutzgruppen nach Variante A.

MF190609 C₄₀H₈₁N₅O₃

M = 680,10 g/mol

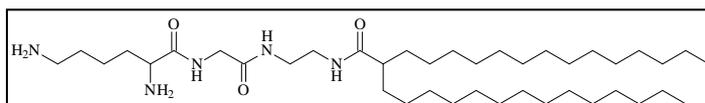
R_f: 0,35 (LM 5)

Ausbeute: 69 % (0,11 g)

ESI-MS: positiv: 680,4 g/mol [M+H]

HR-ESI-MS: ber.: 680,6512 g/mol gef.: 680,6404 g/mol

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ [ppm] = 0,83 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [H₃C-CH₂-]); 1,12-1,54 (58 H, m, 2 [H₃C-(CH₂)₁₃-] und [H₂N-CH₂-CH₂-] und 2 [H₂N-]); 1,62-1,72 (2H, m, [H₂N-(CH₂)₂-CH₂-]); 1,78-1,88 (2H, m, [H₂N-(CH₂)₃-CH₂-]); 2,00-2,10 (1H, m [-CO-CH(CH₂)₂-]); 2,89 (2H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 7,1 Hz [H₂N-CH₂-]); 3,18-3,24 (4H, m [-HN-(CH₂)₂-NH-]); 3,38-3,42 (1H, m [H₂N-CH-CO-]); 3,70-3,96 (2H, m [-NH-CH₂-CO-])



2-Hexadecyloctadecansäure-(2-([2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)amino]-1-oxoethyl)aminoethyl)amid - 106 E₁₆GlyLys

Die Darstellung des Transfektionslipids E₁₆GlyLys **106** erfolgte durch Umsetzung von 0,15 g (0,2 mmol) 2-Hexadecyloctadecansäure-[2-(2-amino-1-oxoethyl)aminoethyl]amid **79** mit 0,11 g (0,2 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid und anschließender Abspaltung der BOC-Schutzgruppen nach Variante A.

MF200709 C₄₄H₈₉N₅O₃

M = 736,21 g/mol

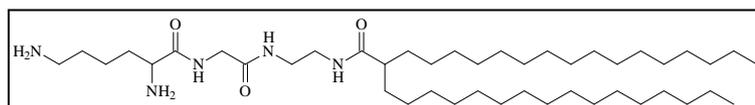
R_f: 0,32 (LM 5)

Ausbeute: 39 % (0,07 g)

ESI-MS: positiv: 737,2 g/mol [M+H]

EA: ber.: C = 63,89 % H = 11,33 % N = 8,47 % (+2HCl, H₂O)

gef.: C = 63,37 % H = 11,20 % N = 8,78 %



$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ [ppm] = 0,86 (6H, t, $^3J_{\text{CH}_3/\text{CH}_2} = 6,6$ Hz, 2 [$\text{H}_3\text{C-CH}_2$ -]); 1,17-1,58 (66H, m, 2 [$\text{H}_3\text{C-(CH}_2)_{15}$ -] und [$\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ -] und 2 [$\text{H}_2\text{N-}$]); 1,64-1,77 (2H, m, [$\text{H}_2\text{N-(CH}_2)_2\text{-CH}_2$ -]); 1,82-1,94 (2H, m, [$\text{H}_2\text{N-(CH}_2)_3\text{-CH}_2$ -]); 2,07-2,15 (1H, m, [$-\text{CO-CH(CH}_2)_2$ -]); 2,95 (2H, t, $^3J_{\text{CH}_2/\text{CH}_2} = 7,1$ Hz [$\text{H}_2\text{N-CH}_2$ -]); 3,22-3,28 (4H, m, [$-\text{HN-(CH}_2)_2\text{-NH-}$]); 3,40-3,45 (1H, m [$\text{H}_2\text{N-CH-CO-}$]); 3,80-3,95 (2H, m, [$-\text{NH-CH}_2\text{-CO-}$])

2-Tetradecylhexadecansäure-(4-{[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)amino]-1-oxoethyl}amino-butyl)amid - 107 P₁₄GlyLys

Die Verbindung P₁₄GlyLys **107** konnte durch Umsetzung von 0,10 g (0,2 mmol) 2-Tetradecylhexadecansäure-[4-(2-amino-1-oxoethyl)aminobutyl]amid **80** mit 0,08 g (0,2 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid und anschließender Abspaltung der BOC-Schutzgruppen entsprechend Variante A erhalten werden. Für die Durchführung weiterer Untersuchungen war die erhaltene Produktausbeute jedoch nicht ausreichend.

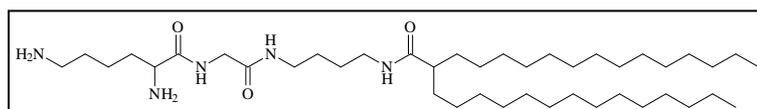
MF031208 C₄₂H₈₅N₅O₃

M = 708,16 g/mol

R_f: 0,26 (LM 5)

ESI-MS: positiv: 708,5 g/mol [M+H]

HR-ESI-MS: ber.: 708,6725 g/mol gef.: 708,6721 g/mol



2-Hexadecyloctadecansäure-(4-{[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)amino]-1-oxoethyl}amino-butyl)amid - 108 P₁₆GlyLys

Das Transfektionslipid P₁₆GlyLys **108** wurde durch Umsetzung von 0,11 g (0,2 mmol) 2-Hexadecyloctadecansäure-[4-(2-amino-1-oxoethyl)aminobutyl]amid **81** mit 0,08 g (0,2 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid und anschließender Abspaltung der BOC-Schutzgruppen entsprechend Variante A dargestellt.

MF091009 C₄₆H₉₃N₅O₃

M = 764,26 g/mol

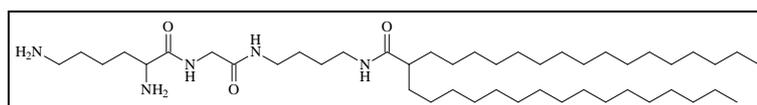
R_f: 0,65 (LM 5)

Ausbeute: 83 % (0,11 g)

ESI-MS: positiv: 765,3 g/mol [M+H]

HR-ESI-MS: ber.: 764,7351 g/mol gef.: 764,7346 g/mol

$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ [ppm] = 0,86 (6H, t, $^3J_{\text{CH}_3/\text{CH}_2} = 6,6$ Hz, 2 [$\text{H}_3\text{C-CH}_2$ -]); 1,17-1,57 (70H, m, 2 [$\text{H}_3\text{C-(CH}_2)_{15}$ -] und [$-\text{NH-CH}_2\text{-(CH}_2)_2$ -]) sowie



[H₂N-CH₂-CH₂-] und 2[H₂N-]); 1,67-1,77 (2H, m, [H₂N-(CH₂)₂-CH₂-]); 1,85-1,94 (2H,m,[H₂N-(CH₂)₃-CH₂-]); 2,06-2,12 (1H, m [-CO-CH(CH₂)₂-]); 2,92-2,97 (2H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 6,6 Hz [H₂N-CH₂-]); 3,14-3,25 (4H, m [-HN-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-NH-]); 3,37-3,43 (1H, m [H₂N-CH-CO-]); 3,88-3,95 (2H, m [-NH-CH₂-CO-])

2-Tetradecylhexadecansäure-(2-{[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)amino]-4-methyl-1-oxopentyl}aminoethyl)amid - 109 E₁₄LeuLys

Die Darstellung des Transfektionslipids E₁₄LeuLys **109** erfolgte durch die Umsetzung von 0,10 g (0,2 mmol) 2-Tetradecylhexadecansäure-[2-(2-amino-4-methyl-1-oxopentyl)aminoethyl]amid **82** mit 0,07 g (0,2 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid und anschließender Abspaltung der BOC-Schutzgruppen nach Variante A.

MF220909 C₄₄H₈₉N₅O₃

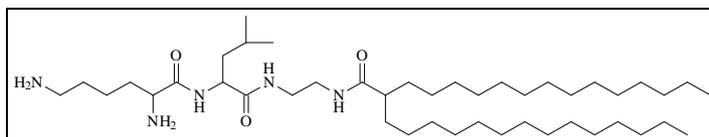
M = 736,21 g/mol

R_f: 0,78 (LM 5)

Ausbeute: 45 % (0,05 g)

ESI-MS: positiv: 737,7 g/mol [M+H]

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ [ppm] = 0,83 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [H₃C-CH₂-]); 0,87-0,95 (6H, q, [(H₃C)₂CH-]); 1,15-1,55 (58H, m, 2 [H₃C-(CH₂)₁₃-] und [H₂N-CH-]) sowie [H₂N-CH₂-CH₂-]; 1,60-1,75 (4H, m, [H₂N-(CH₂)₂-CH₂-] und [(H₃C)₂CH-CH₂-]); 1,79-1,92 (2H, m, [H₂N-(CH₂)₃-CH₂-]); 1,95-2,00 (1H, m [(H₃C)₂CH-]); 2,03-2,12 (1H, m [-CO-CH(CH₂)₂-]); 2,93 (2H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 6,6 Hz [H₂N-CH₂-]); 3,20-3,25 (4H, m [-HN-(CH₂)₂-]); 3,93 (1H, t, ³J_{CH/CH₂} = 6,6 Hz [NH₂-CH-CO-]); 4,25-4,32 (1H, m, [(H₃C)₂CH-CH₂-CH-])



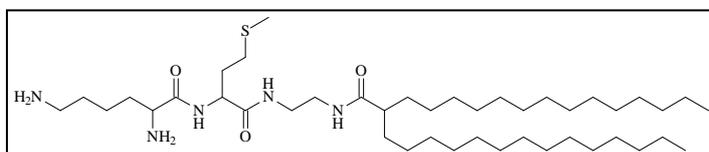
2-Tetradecylhexadecansäure-(2-{[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)amino]-4-methylthio-1-oxobutyl}aminoethyl)amid - 110 E₁₄MetLys

Die Verbindung E₁₄MetLys **110** konnte durch Umsetzung von 0,20 g (0,3 mmol) 2-Tetradecylhexadecansäure-[2-(2-amino-4-methylthio-1-oxobutyl)aminoethyl]amid **83** mit 0,14 g (0,3 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid und anschließender Abspaltung der BOC-Schutzgruppen nach Variante A dargestellt werden.

MF210409 C₄₃H₈₇N₅O₃S

M = 754,25 g/mol

R_f: 0,59 (LM 5)



Ausbeute: 54 % (0,13 g)
 ESI-MS: positiv: 755,1 g/mol [M+H]
¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ [ppm] = 0,79 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [H₃C-CH₂-]); 1,10-1,48 (58H, m, 2 [H₃C-(CH₂)₁₃-] und [H₂N-CH-]) sowie [H₂N-CH₂-CH₂-]; 1,60-1,75 (2H, m, [H₂N-(CH₂)₂-CH₂-]; 1,60-1,70 (2H, m, [-S-CH₂-CH₂-]); 1,79-1,86 (2H, m, [H₂N-(CH₂)₃-CH₂-]); 1,94-2,00 (1H, m [-CO-CH(CH₂)₂-]); 2,03 (3H, s, [H₃C-S-]); 2,46-2,53 (2H, m, [-S-CH₂-]); 2,90 (2H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 6,6 Hz [H₂N-CH₂-]); 3,16-3,22 (4H, m [-HN-(CH₂)₂-NH-]); 3,89 (1H, t, ³J_{CH/CH₂} = 6,6 Hz [NH₂-CH-CO-]); 3,96-4,06 (1H, m, [-S-(CH₂)₂-CH-])

2-Dodecyltetradecansäure-(2-{6-[(2,6-diamino-1-oxohexyl)amino]-2-amino-1-oxohexyl}aminoethyl)amid - 115 **E₁₂diLys**

E₁₂diLys **115** wurde als Nebenprodukt bei der Umsetzung von 0,17 g (0,3 mmol) 2-Dodecyltetradecansäure-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]amid **91** mit 0,27 g (0,6 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid und anschließender Abspaltung der BOC-Schutzgruppen nach Variante A erhalten. Das Nebenprodukt wurde DC-rein erhalten. Größere Mengen Wasser und Lösungsmittel, welche nicht durch Trocknungsprozesse im Vakuum über P₂O₅ oder am Rotationsvakuumverdampfer über mehrere Stunden bis Tage entfernt werden konnten, verhinderten jedoch die Auswertung analytischer Daten. Zudem deutet das ¹H-NMR-Spektrum darauf hin, dass das Lysinmolekül nicht nur an die endständige Aminogruppe gebunden wurde. Möglicherweise liegt ebenso die Verbindung mit einem Lysinrest an der in α-Stellung befindlichen Aminfunktion vor.

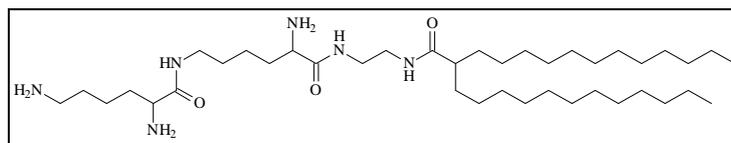
MF141009 C₄₀H₈₂N₆O₃

M = 695,12 g/mol

R_f: 0,27 (LM 5)

Ausbeute: Nebenprodukt (0,05 g)

ESI-MS: positiv: 696,1 g/mol [M+H]



2-Dodecyltetradecansäure-(2-{2,6-[bis(2,6-diamino-1-oxohexyl)]diamino-1-oxohexyl}-aminoethyl)amid - 111 **E₁₂trisLys**

Die Darstellung von 2-Dodecyltetradecansäure-(2-{2,6-[bis(2,6-diamino-1-oxohexyl)]diamino-1-oxohexyl}aminoethyl)amid **111** erfolgte durch Umsetzung von 0,17 g (0,3 mmol) 2-Dodecyltetradecansäure-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]amid **91** mit 0,27 g (0,6 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid und anschließender Abspaltung der BOC-

Schutzgruppen entsprechend Variante A. Das Produkt konnte nachgewiesen, jedoch nicht isoliert werden.

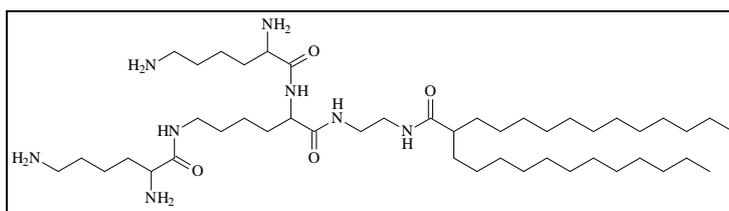
MF131009

$C_{46}H_{94}N_8O_4$

$M = 823,29 \text{ g/mol}$

R_f : 0,08 (LM 5)

ESI-MS: positiv: 823,6 g/mol [M+H]



2-Tetradecylhexadecansäure-(2-{2,6-[bis-(2,6-diamino-1-oxohexyl)]diamino-1-oxohexyl}aminoethyl)amid - 112 E_{14} trisLys

Das Transfektionslipid E_{14} trisLys **112** wurde durch Umsetzung von 0,47 g (0,8 mmol) 2-Tetradecylhexadecansäure-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]amid **86** mit 0,08 g (1,5 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid und anschließender Abspaltung der BOC-Schutzgruppen entsprechend Variante A dargestellt.

MF030708 $C_{50}H_{102}N_8O_4$

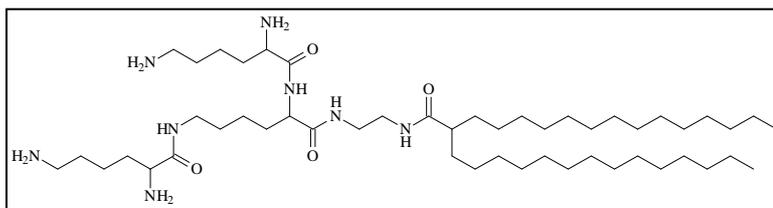
$M = 879,40 \text{ g/mol}$

R_f : 0,52 (LM 6)

Ausbeute: 50 % (0,33 g)

ESI-MS: positiv: 880,0 g/mol [M+H]

$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ [ppm] = 0,83 (6H, t, $^3J_{\text{CH}_3/\text{CH}_2} = 6,6 \text{ Hz}$, 2 [$\text{H}_3\text{C-CH}_2$ -]); 1,15-1,76 (78H, m, 2 [$\text{H}_3\text{C-(CH}_2)_{13}$ -] und 2 [$\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-(CH}_2)_{3}$ -] sowie 2 [$\text{H}_2\text{N-CH-}$] und [$\text{-NH-CH}_2\text{-(CH}_2)_{3}$ -]); 2,00-2,10 (1H, m [$\text{-CO-CH(CH}_2)_2$ -]); 2,88 (4H, t, $^3J_{\text{CH}_2/\text{CH}_2} = 7,5 \text{ Hz}$, 2 [$\text{H}_2\text{N-CH}_2$ -]); 3,15-3,27 (6H, m, [$\text{CO-NH-(CH}_2)_2\text{-NH-}$] und [$\text{-NH-CH}_2\text{-(CH}_2)_{3}$ -]); 3,48 (2H, t, $^3J_{\text{CH}/\text{CH}_2} = 7,1 \text{ Hz}$, 2 [$\text{H}_2\text{N-CH-}$]); 4,18-4,24 (1H, m, [-NH-CH-CO-])



2-Hexadecyloctadecansäure-(2-{2,6-[bis-(2,6-diamino-1-oxohexyl)]diamino-1-oxohexyl}aminoethyl)amid - 114 E_{16} trisLys

E_{16} trisLys **114** konnte durch Umsetzung von 0,33 g (0,5 mmol) 2-Hexadecyloctadecansäure-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]amid **94** mit 0,43 g (1,0 mmol) Di-BOC-Lysinhydroxysuccinimid und anschließender Abspaltung der BOC-Schutzgruppen nach Variante A dargestellt werden.

MF170809 C₅₄H₁₁₀N₈O₄

M = 935,50 g/mol

R_f: 0,56 (LM 6)

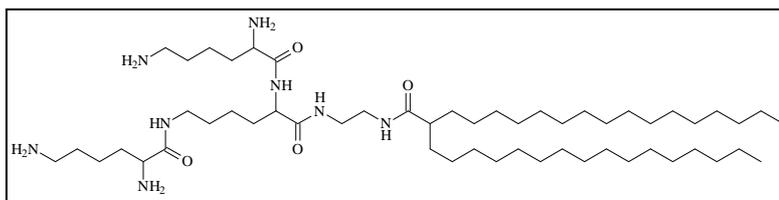
Ausbeute: 75 % (0,34 g)

ESI-MS: positiv: 935,8 g/mol [M+H]

EA: ber.: C = 66,76 % H = 11,83 % N = 11,53 % (+2H₂O)

gef.: C = 66,40 % H = 11,40 % N = 11,53 %

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ [ppm] = 0,85 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [H₃C-CH₂-]); 1,15-1,80 (86H, m, 2 [H₃C-(CH₂)₁₅-] und 2 [H₂N-CH₂-(CH₂)₃-CH₂-CH-] sowie 2 [H₂N-CH-] und [-NH-CH₂-(CH₂)₃-]); 2,02-2,11 (1H, m [-CO-CH(CH₂)₂-]); 2,68 (4H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [H₂N-CH₂-]); 3,13-3,27 (6H, m, [CO-NH-(CH₂)₂-NH-] und [-NH-CH₂-(CH₂)₃-]); 3,35 (2H, t, ³J_{CH/CH₂} = 7,1 Hz, 2 [H₂N-CH-]); 4,17-4,23 (1H, m, [-NH-CH-CO-])



2-Tetradecylhexadecansäure-(4-{6-[(2,6-diamino-1-oxohexyl)amino]-2-amino-1-oxohexyl}aminobutyl)amid - 116 P₁₄diLys

Die Verbindung P₁₄diLys **116** entstand als Nebenprodukt bei der Umsetzung von 0,50 g (0,8 mmol) 2-Tetradecylhexadecansäure-[4-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminobutyl]amid **92** mit 0,68 g (1,5 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid und anschließender Abspaltung der BOC-Schutzgruppen entsprechend Variante A. Das Nebenprodukt wurde DC-rein erhalten. Das ¹H-NMR-Spektrum belegt jedoch die Anknüpfung des zweiten Lysinmoleküls an den Amino-gruppen in α- bzw. in ε-Position.

MF081009 C₄₆H₉₄N₆O₃

M = 779,28 g/mol

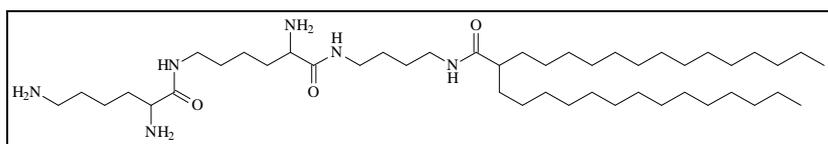
R_f: 0,42 (LM 5)

Ausbeute: Nebenprodukt (0,06 g)

ESI-MS: positiv: 780,8 g/mol [M+H]

EA: ber.: C = 63,49 % H = 11,35 % N = 9,66 % (+2HCl, 1H₂O)

gef.: C = 63,31 % H = 11,02 % N = 9,45 %



2-Tetradecylhexadecansäure-(4-{2,6-[bis-(2,6-diamino-1-oxohexyl)]diamino-1-oxohexyl}aminobutyl)amid - 113 P₁₄trisLys

Die Darstellung des Transfektionslipids P₁₄trisLys **113** erfolgte durch Umsetzung von 0,50 g (0,8 mmol) 2-Tetradecylhexadecansäure-[4-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminobutyl]amid **92**

mit 0,68 g (1,5 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid und anschließender Abspaltung der BOC-Schutzgruppen nach Variante A. Die Verbindung konnte DC-rein erhalten werden. Die Auswertung analytischer Daten war jedoch durch hohe, nicht entfernbare Lösungsmittelmengen nicht möglich.

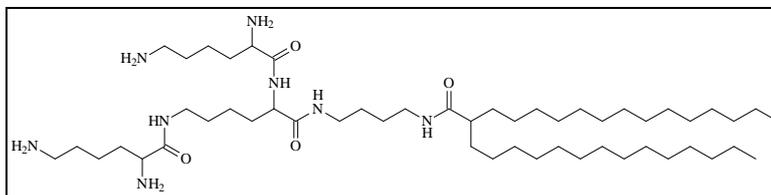
MF071009

$C_{52}H_{106}N_8O_4$

$M = 907,45 \text{ g/mol}$

R_f : 0,55 (LM 6)

ESI-MS: positiv: 907,6 g/mol [M+H]



6.3.3 Darstellung der Geminitransfektionslipide

6.3.3.1 Zweitalkylierung

Die Darstellung der Geminigrundstruktur durch einen Zweitalkylierungsschritt ausgehend vom Tetradecyl- bzw. Hexadecylmalonsäurediethylester **6** und **7** erfolgte zunächst durch Suspendieren von 60 %igem Natriumhydrid in abs. Toluol in einem trockenen, mit Argon gespülten Dreihalskolben mit Rückflusskühler, Trockenrohr, Tropftrichter und Rührwerk. Der langsamen Zugabe des Monoalkylmalonesters zur Suspension folgte nach etwa einer Stunde das Hinzufügen von in Toluol gelöstem Diiodbutan, welches durch Einsatz im Verhältnis 0,4:1 zum Alkylmalonester zur Ausbildung des Geminigrundgerüsts führen sollte. TBAI wurde als Katalysator zugesetzt und der Reaktionsansatz fünf Stunden bei 120 °C unter Rückfluss gerührt. Erschien der Überstand klar, konnte die Suspension zur Aufarbeitung mit gesättigter Ammoniumchloridlösung ausgeschüttelt werden. Es schlossen sich zwei Waschschritte mit Wasser und die nachfolgende Trocknung der Toluolphase über Na_2SO_4 an. Nach erfolgter Filtration wurde Toluol am Rotationsvakuumverdampfer entfernt und die Rohprodukte säulenchromatographisch mit dem Elutionsmittelgemisch Heptan/Ether mit steigender Polarität gereinigt.

2,7-Bis(ethoxycarbonyl)-2,7-ditetradecyloctandisäurediethylester - **118*** **G₁₄E**

Die Verbindung **118** wurde durch Umsetzung von 10,00 g (28,1 mmol) Tetradecylmalonsäurediethylester **6** mit 1,12 g (28,1 mmol) 60 %igem NaH und Zugabe von 3,48 g (11,2 mmol) 1,4-Diiodbutan hergestellt.

MF231104 C₄₆H₈₆O₈

M = 767,17 g/mol

R_f: 0,19 (LM 7)

mp: 42 °C

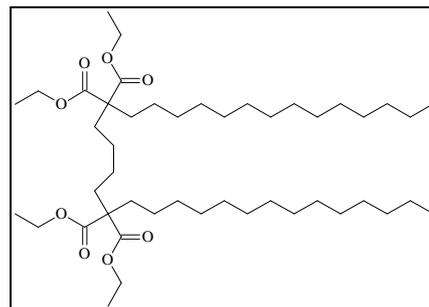
Ausbeute: 44 % (3,80 g)

ESI-MS: positiv: 789,7 g/mol [M+Na]

EA: ber.: C = 72,02 % H = 11,30 %

gef.: C = 72,39 % H = 11,30 %

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ [ppm] = 0,84 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [H₃C-CH₂-CH₂-]); 1,07-1,61 (68H, m, 2 [H₃C-(CH₂)₁₃-] und 4 [H₃C-CH₂-O-] sowie [-C-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-C-]); 1,79-1,82 (4H, m, [-C-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-C-]); 4,14 (8H, q, ³J_{CH₂/CH₃} = 5,4 Hz, 4 [CH₃-CH₂-O-])



2,7-Bis(ethoxycarbonyl)-2,7-dihexadecyloctandisäurediethylester - 119* G₁₆E

Durch Umsetzung von 10,00 g (26,0 mmol) Hexadecylmalonsäurediethylester **7** (MF241104) mit 1,04 g (26,0 mmol) 60 %igem Natriumhydrid und Zugabe von 3,23 g (10,4 mmol) 1,4-Diodbutan wurde der 2,2'-Diethoxycarbonyl-2,2'-dihexadecyloctandisäurediethylester **119** erhalten. Die analytischen Daten entsprachen der Literatur^{69,83} Ausbeute: 43 % (3,70 g) ESI-MS: positiv: 845,5 g/mol [M+Na]

6.3.3.2 Verseifung

Die Verseifung der Gemini-Ester **118** und **119** erfolgte durch die Umsetzung mit dem zwanzigfachen Überschuss an Kaliumhydroxid in abs. Ethanol. Nach einem Reaktionszeitraum von zwölf Stunden wurden die Kaliumsalze der Verbindungen mittels Zugabe konzentrierter Salzsäure in die freien Säuren überführt, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und die Reaktionsprodukte über P₂O₅ im Vakuum getrocknet.

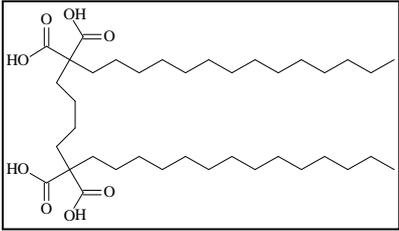
2,7-Dicarboxy-2,7-ditetradecyloctandisäure - 120* G₁₄TS

Durch Verseifung von 2,40 g (3,1 mmol) 2,7-Bis(ethoxycarbonyl)-2,7-ditetradecyloctandisäurediethylester **118** mit 3,51 g (62,6 mmol) Kaliumhydroxid wurde die Verbindung **120** erhalten.

MF221204 C₃₈H₇₀O₈

M = 654,96 g/mol

R_f: 0,05 (LM 10)

mp:	172 °C	
Ausbeute:	49 % (1,58 g)	
ESI-MS:	positiv: 677,7 g/mol [M+Na]	
EA:	ber.: C = 69,68 % H = 10,77 % gef.: C = 69,67 % H = 10,42 %	
¹ H-NMR:	400 MHz, CDCl ₃ , δ [ppm] = 0,85 (6H, t, ³ J _{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [H ₃ C-CH ₂ -CH ₂ -]); 1,18-1,47 (52H, m, 2 [H ₃ C-(CH ₂) ₁₂ -CH ₂ -] und [-C-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH ₂ -C-]); 1,80-1,85 (8H,m,[-CH ₂ -C-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH ₂ -C-CH ₂ -])	

2,7-Dicarboxy-2,7-dihexadecyloctandisäure - 121* G₁₆TS

Durch Verseifung von 3,10 g (3,8 mmol) 2,7-Bis(ethoxycarbonyl)-2,7-dihexadecyloctandisäurediethylester **119** mit 4,32 g (75,3 mmol) Kaliumhydroxid wurde die Verbindung **121** erhalten.

MF211204 C₄₂H₇₈O₈

M = 711,06 g/mol

R_f: 0,05 (LM 10)

mp: 178 °C

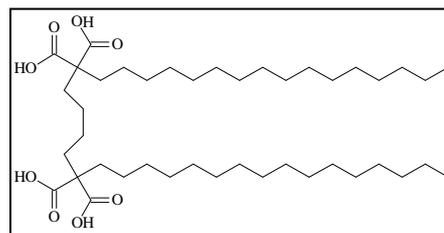
Ausbeute: 52 % (1,67 g)

ESI-MS: positiv: 733,9 g/mol [M+Na]

EA: ber.: C = 70,94 % H = 11,06 %

gef.: C = 70,53 % H = 10,74 %

¹H-NMR: 400MHz, CDCl₃, δ [ppm] = 0,85 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [**H**₃C-CH₂-CH₂-]); 1,19-1,47 (60H, m, 2 [**H**₃C-(CH₂)₁₄-CH₂-] und [-C-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-C-]); 1,80-1,85 (8H, m, [-CH₂-C-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-C-CH₂-])



6.3.3.3 Decarboxylierung

Die Gemini-Tetrasäuren **120** und **121** wurden den Literaturangaben¹⁹⁴ entsprechend etwa 15-20 min auf 200 °C bis 230 °C im Metallbad erhitzt. Anschließend wurde der jeweils erhaltene Rückstand aus Heptan umkristallisiert.

2,7-Ditetradecyloctandisäure - 122* G₁₄DS

Die 2,7-Ditetradecyloctandisäure **122** entstand durch Decarboxylierung von 1,58 g (2,4 mmol) 2,2'-Dicarboxy-2,2'-ditetradecyloctandisäure **120**.

MF130105 C₃₆H₇₀O₄

M = 566,94 g/mol

R_f: 0,15 (LM 5)

mp: 90 °C

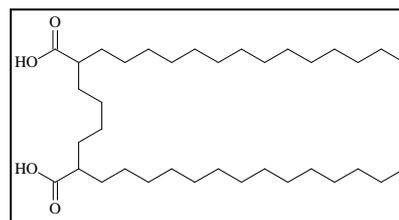
Ausbeute: 46 % (0,63 g)

ESI-MS: negativ: 565,9 g/mol [M-H]

EA: ber.: C = 76,27 % H = 12,45 %

gef.: C = 76,14 % H = 12,32 %

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ [ppm] = 0,84 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [H₃C-CH₂-]); 1,17-1,43 (52H, m, 2 [H₃C-(CH₂)₁₂-CH₂-] und [-CH-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-]); 1,53-1,54 (8H, m, [-CH₂-CH-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-CH-CH₂-]); 2,21-2,28 (2H, m, [-CH₂-CH-(CH₂)₄-CH-CH₂-])



2,7-Dihexadecyloctandisäure - 123* G₁₆DS

Die 2,7-Ditetradecyloctandisäure **123** (MF120105) wurde durch Decarboxylierung von 1,67 g (2,3 mmol) 2,2'-Dicarboxy-2,2'-dihexadecyloctandisäure **121** hergestellt. Die analytischen Daten entsprachen den Angaben der Literatur.^{69,83} Ausbeute: 65 % (0,95 g) ESI-MS: positiv: 645,8 g/mol [M+Na]

6.3.3.4 Einführung der Spacermoleküle

Variante A: Aktivierung der Geminidensäuren durch Überführung in die Carbonsäurechloride mit anschließender Umsetzung mit Ethylendiamin

Zur Aktivierung der Ausgangsstoffe wurde die 2,7-Ditetradecyloctandisäure **122** bzw. die 2,7-Dihexadecyloctandisäure **123** in einem 50 ml Rundkolben mit Thionylchlorid übergossen und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Die entstandene klare Lösung wurde am Rotationsverdampfer mittels Wasserstrahlpumpe eingengt und die gewonnenen Rückstände über P₂O₅ im Vakuum getrocknet. Für die Kupplungsreaktion mit dem Amin wurden die erhaltenen Säurechloride in einem 50 ml Zweihalskolben unter Rühren in 10 ml abs. Chloroform gelöst und im Eisbad gekühlt. Den Lösungen wurden unter fortwährender Kühlung des Kolbens tropfenweise der vierzigfache Überschuss an Ethylendiamin sowie TEA hinzugefügt und der Reaktionsansatz weitere 24 Stunden gerührt. Die Aufarbeitung der Suspensionen erfolgte durch Filtration und dreifachem Waschen der organischen Phase mit Wasser. Nach

der Trocknung über Na_2SO_4 wurde erneut abfiltriert, das Chloroform am Rotationsverdampfer entfernt und die Produkte säulenchromatographisch mit einem Lösungsmittelgemisch aus Chloroform/Methanol/Ammoniak mit steigender Polarität gereinigt.

Variante B: Kupplung der Geminidensäuren mit Ethylendiamin unter Verwendung des Kupplungsreagenzes BOP

Die Darstellung der Geminidamide erfolgte analog der Umsetzung von Tetracycloctandisäure **22** mit Aminen unter Verwendung von BOP (siehe Kapitel 6.3.2.2 Variante B). Um eine hohe Ausbeute zu erzielen wurde der 40fache Überschuss an Ethylendiamin in abs. Dichlormethan vorgelegt und diese Lösung mit der jeweiligen Gemini-Disäure **122** bzw. **123**, sowie BOP und TEA versetzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz über Nacht gerührt. Die Abtrennung des ausgefallenen weißen Niederschlags erfolgte mittels Filtration mit darauffolgender Aufarbeitung der organischen Phase durch Ausschütteln mit gesättigter Natriumchloridlösung und zwei weiteren Waschschritten mit Wasser. Nach Trocknung über Na_2SO_4 , Filtration und anschließender Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurden die Produkte unter Verwendung des MPLC-Trennverfahrens mit Chloroform/Methanol/Ammoniak als Elutionsgemisch mit steigender Polarität gereinigt.

2,7-Ditetradecyloctandisäure-bis-(2-aminoethyl)amid - 126* G₁₄

Die Darstellung von 2,7-Ditetradecyloctandisäure-bis-(2-aminoethyl)amid **126** erfolgte einerseits durch Übergießen von 0,50 g (0,9 mmol) der 2,7-Ditetradecyloctandisäure **122** mit 2,50 ml Thionylchlorid und anschließender Umsetzung mit 2,36 ml (35,3 mmol) Ethylendiamin **28** nach Variante A. Andererseits konnte das Produkt entsprechend Variante B durch die Reaktion von 2,00 g (3,5 mmol) der Verbindung **122** mit 3,12 g (7,6 mmol) BOP und 9,42 ml (141,1 mmol) Ethylendiamin **28** hergestellt werden.

MF020908 $\text{C}_{40}\text{H}_{82}\text{N}_4\text{O}_2$

M = 651,10 g/mol

R_f: 0,25 (LM 3)

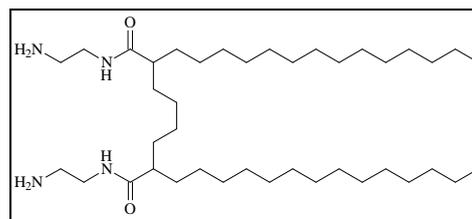
mp: 109 °C

Ausbeute: Variante A: 33 % (0,19 g)

Variante B: 27 % (0,63 g)

ESI-MS: positiv: 651,6 g/mol [M+H]

¹H-NMR: 400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ [ppm] = 0,77-0,82 (6H, t, $^3J_{\text{CH}_3/\text{CH}_2} = 6,6$ Hz, 2 [$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-$]); 1,12-1,51 (64H, m, 2 [$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{13}-$] und [$-\text{HC}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}-$])



sowie 2 [H_2N -]); 1,98-2,06 (2H, m, 2 [- CH -CO-]); 2,67-2,72 (4H, t, $^3J_{CH_3/CH_2} = 6,2\text{Hz}$, 2 [H_2N - CH_2 -]); 3,17-3,22 (4H, m, 2 [H_2N - CH_2 - CH_2 -])

2,7-Dihexadecyloctandisäure-bis-(2-aminoethyl)amid - 127* G_{16}

2,7-Dihexadecyloctandisäure-bis-(2-aminoethyl)amid **127** (MF080108) wurde sowohl durch Übergießen von 1,00 g (1,6 mmol) 2,7-Dihexadecyloctandisäure **123** mit 5,00 ml Thionylchlorid und anschließender Umsetzung mit 4,29 ml (64,2 mmol) Ethylendiamin **28** nach Variante A hergestellt als auch entsprechend Variante B durch die Reaktion von 0,40 g (0,6 mmol) der Verbindung **123** mit 0,57 g (1,3 mmol) BOP und 1,71 ml (25,7 mmol) Ethylendiamin **28**. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^{69,83} Ausbeute: Variante A: 32 % (0,34 g), Variante B: 42 % (0,19 g), ESI-MS: positiv: 707,6 g/mol [M+H]

6.3.3.5 Umsetzung mit der geschützten Aminosäure

Kupplungsreaktion mit aktiviertem, BOC-geschütztem Lysin

Die Umsetzungen der Verbindungen **126** und **127** erfolgte analog der bereits beschriebenen Kupplungsreaktion mit diBOC-Lysinhydroxysuccinimid in einem 50 ml Rundkolben unter Lösen der Ausgangssubstanzen in 15 ml abs. Dichlormethan und Zugabe der geschützten, aktivierten Aminosäure im Verhältnis 1:2 und zehn Tropfen TEA. Nach zwölfstündigem Rühren wurden die Reaktionsansätze am Rotationsverdampfer eingengt. Abschließend erfolgte die Abspaltung der Schutzgruppen unter Verzicht der Aufreinigung der Zwischenprodukte durch Hinzufügen weniger Tropfen konz. Salzsäure zu einer Suspension der Substanzen in Ethylacetat. Nach zwei Stunden wurde das Lösungsmittel schließlich am Rotationsverdampfer entfernt und die Rohprodukte über P_2O_5 im Vakuum getrocknet. Die Reinigung gelang durch chromatographische Trennung mittels MPLC-Verfahrens mit einem Elutionsgemisch aus Chloroform/Methanol/Ammoniak steigender Polarität.

2,7-Ditetradecyloctandisäure-bis-[2,2'-bis-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]amid - 128 $G_{14}diLys$

Die Darstellung des Lipids $G_{14}diLys$ **128** erfolgte durch Umsetzung von 0,23 g (0,4 mmol) 2,7-Ditetradecyloctandisäure-bis-(2-aminoethyl)amid **126** mit 0,31 g (0,8 mmol) DiBOC-Lysin-hydroxysuccinimid und anschließender Abspaltung der Schutzgruppen gemäß Variante A.

MF200409 C₅₂H₁₀₆N₈O₄

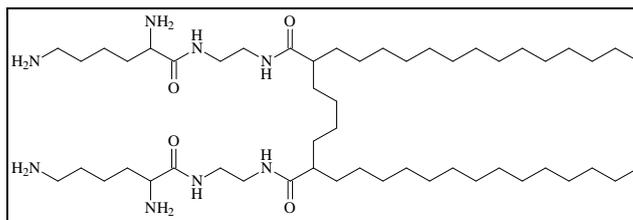
M = 907,45 g/mol

R_f: 0,52 (LM 6)

Ausbeute: 69 % (0,21 g)

ESI-MS: positiv: 907,8 g/mol [M+H]

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ [ppm] = 0,83(6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [**H**₃C-CH₂-]); 1,14-1,54 (80H, m, 2 [**H**₃C-(**CH**₂)₁₃-] und [-CH-(**CH**₂)₄-CH-] sowie 2 [**H**₂N-CH₂-(**CH**₂)₃-CH-] und 4 [**H**₂N-]); 2,00-2,10 (2H, m, 2 [-CO-**CH**(CH₂)₂-]); 2,71 (4H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 7,1 Hz, 2 [**H**₂N-**CH**₂-]); 3,20-3,27 (10H, m, 2 [-HN-**CH**₂-**CH**₂-NH-CO] und 2 [**H**₂N-**CH**-CO-])



2,7-Dihexadecyloctandisäure-bis-[2,2'-bis-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]amid - 129 G₁₆diLys

Die Verbindung G₁₆diLys **129** wurde durch Umsetzung von 0,19 g (0,3 mmol) 2,7-Dihexadecyloctandisäure-bis-(2-aminoethyl)amid **127** mit 0,24 g (0,5 mmol) DiBOC-Lysinhydroxysuccinimid und anschließender Abspaltung der BOC-Schutzgruppen entsprechend Variante A hergestellt.

MF141008 C₅₆H₁₁₄N₈O₄

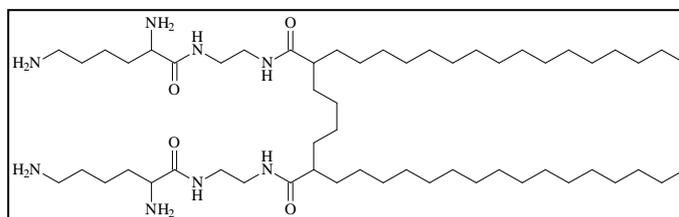
M = 963,02 g/mol

R_f: 0,55 (LM 6)

Ausbeute: 22 % (0,06 g)

ESI-MS: positiv: 985,0 g/mol [M+Na]

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ [ppm] = 0,80 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [**H**₃C-CH₂-]); 1,12-1,53 (88H, m, 2 [**H**₃C-(**CH**₂)₁₅-] und [-CH-(**CH**₂)₄-CH-] sowie 2 [**H**₂N-CH₂-(**CH**₂)₃-CH-] und 4 [**H**₂N-]); 1,97-2,06 (2H, m [-CO-**CH**(CH₂)₂-]); 2,68 (4H, t, ³J_{CH₂/CH₂} = 7,1 Hz 2 [**H**₂N-**CH**₂-]); 3,17-3,25 (10H, m, 2 [-HN-**CH**₂-**CH**₂-NH-CO] und 2 [**H**₂N-**CH**-CO-])



6.3.4 Darstellung des Transfektionslipids mit Azomethinstruktur

6.3.4.1 Esterbildung

Der Ester **136** wurde durch Umsetzung von 5,00 g 2-Tetradecylhexadecansäure **22** mit 20 ml Methanol und 1 ml konz. Schwefelsäure dargestellt. Der Ansatz wurde drei Stunden unter Rühren zum Rückfluss erhitzt und anschließend der Kolben mit der noch warmen Flüssigkeit zur Vakuumbildung durch einen Stopfen verschlossen. Nachdem das Reaktionsgemisch über Nacht stehen gelassen wurde, erfolgte die Zugabe von 100 ml Wasser. Im Anschluss wurde der Syntheseansatz mit Ether ausgeschüttelt, mit Natriumacetat neutralgewaschen, die Etherphase über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt.

2-Tetradecylhexadecansäuremethylester - **136*** C₁₄ME

MF280105 C₃₁H₆₂O₂

M = 466,82 g/mol

R_f: 0,65 (LM 9)

mp: 40 °C

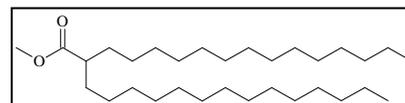
Ausbeute: 83 % (4,30 g)

EI-MS: m/z: 466 [1,4 %, M]; 452 [99 %, M-CH₂]; 269 [11 %, M-C₁₄H₂₉]

EA: ber.: C = 79,76 % H = 13,39 %

gef.: C = 79,44 % H = 13,40 %

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ = 0,87 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [H₃C-CH₂-]); 1,23-1,56 (52H, m, 2 [H₃C-(CH₂)₁₃-]); 2,25-2,35 (1H, m, [-CO-CH-]); 3,65 (3H, s, [H₃C-O-CO-])



6.4.4.2 Reduktion des 2-Tetradecylhexadecansäuremethylesters

Für die Reduktion des 2-Tetradecylhexadecansäuremethylesters **136** wurden zunächst unter Ausschluss von Feuchtigkeit 0,35 g (9,2 mmol) LiAlH₄ in etwa 50 ml abs. Diethylether gelöst. Anschließend wurde unter permanentem Rühren eine Lösung von 4,30 g (9,2 mmol) Methylester **136** in 20 ml abs. Ether so langsam zugetropft, dass der Ether nur mäßig siedete. Nach erfolgter Zugabe der gesamten Estermenge wurde der Reaktionsansatz zwölf Stunden unter Rückfluss erhitzt, darauf folgend im Eisbad gekühlt und im weiteren Verlauf tropfenweise mit Eiswasser bis zur Beendigung der Wasserstoffentwicklung versetzt. Entstandenes Aluminiumhydroxid wurde durch Zugabe 10 %iger H₂SO₄ gelöst, die wässrige

Phase wurde von der organischen Phase abgetrennt und wiederholt mit Ether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, abfiltriert, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt.⁷⁴

2-Tetradecylhexadecanol - 138* C₁₄ol

MF100205 C₃₀H₆₂O

M = 438,81 g/mol

R_f: 0,42 (LM 9)

mp: 38 °C

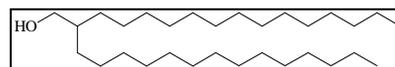
Ausbeute: 94 % (3,80 g)

EI-MS: m/z: 420 [21 %, M-H₂O]; 223 [7 %, M-C₁₄H₂₉, H₂O]

EA: ber.: C = 78,87 % H = 14,12 % (+1H₂O)

gef.: C = 79,03 % H = 13,96 %

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ = 0,87 (6H, t, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,6 Hz, 2 [H₃C-CH₂-]); 1,19-1,59 (53H, m, 2 [H₃C-(CH₂)₁₃-] und [HO-CH₂-CH-]); 3,51 (2H, d, ³J_{CH₂/CH} = 5,6 Hz [HO-CH₂-CH-])



6.4.4.3 Oxidation des 2-Tetradecylhexadecanols

Zur Darstellung des 2-Tetradecylhexadecanals **140** wurden 2,80 g (13,0 mmol) Pyridiniumchlorochromat in 50 ml abs. Dichlormethan suspendiert und anschließend der entstandenen orangefarbenen Suspension 8,7 mmol in 20 ml Dichlormethan gelöster 2-Tetradecylhexadecanol **138** zugefügt. Nachdem 75 min gerührt wurde, erfolgte die Zugabe von 200 ml abs. Ether und die Dekantierung des Überstandes oberhalb des entstandenen Harzes. Nach mehrfachem Waschen des unlöslichen Rückstands mit abs. Ether verblieb ein schwarzes Granulat, welches verworfen wurde. Im darauf folgenden Arbeitsschritt wurden die vereinigten organischen Phasen über Kieselgel filtriert und am Rotationsverdampfer eingengt.¹³¹ Die Reinigung des Produktes erfolgte mittels Säulenchromatographie mit einem Elutionsmittelgemisch aus Heptan und Chloroform steigender Polarität. Die Oxidation des Aldehyds zur Carbonsäure konnte durch zügiges Arbeiten weitgehend verhindert werden.

2-Tetradecylhexadecanal - 140* C₁₄alMF130305 C₃₀H₆₀O

M = 436,80 g/mol

R_f: 0,64 (LM 9)

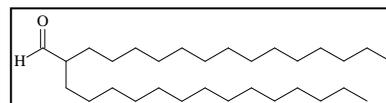
Ausbeute: 24 % (0,9 g)

EI-MS: m/z: 436 [2,4 %, M]; 418 [0,6 %, M-H₂O]; 222 [39 %, M-C₁₄H₂₉, H₂O]

EA: ber.: C = 82,49 % H = 13,85 %

gef.: C = 82,16 % H = 14,00 %

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ = 0,87 (6H, t, ³J_{CH₂/CH} = 6,6 Hz 2 [H₃C-CH₂-]); 1,19-1,62 (52H, m, 2 [H₃C-(CH₂)₁₃-]); 2,01-2,22 (1H, m, [OHC-CH-]); 9,53 (1H, d, ³J_{CH/CH} = 3,1 Hz [OHC-CH-])



7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb.1: Erkrankungen und angewandte Gentyen innerhalb klinischer Studien zur Gentransfektion ¹¹	1
Abb.2: Vektorsysteme innerhalb klinischer Studien zur Gentransfektion, ¹¹	2
Abb.3: Ausgewählte Polymere für die Gentransfektion ⁵²	5
Abb.4: Schematischer Aufbau eines kationischen Transfektionslipids	5
Abb.5: Auswahl kationischer Lipide für die liposomale Gentransfektion ⁵⁹	6
Abb.6: Übersicht ausgewählter Gentransfer-Verfahren	8
Abb.7: Malonesteralkylierung unter Verwendung von Alkylbromiden zu den Monoalkylmalonestern 5-7	11
Abb.8: Synthese des Oleylmesylats 9 und anschließende Umsetzung zum Oleylmalonsäurediethylester 10	12
Abb.9: Synthese der Dialkylmalonsäurediethylester durch Zweitalkylierung in Xylol	13
Abb.10: Verseifungsreaktion der Dialkylmalonester	14
Abb.11: Abschließender Reaktionsschritt zur Darstellung der α -verzweigten Fettsäuren 21-25 durch Decarboxylierung der Dialkylmalonsäuren 16-20	15
Abb.12: Spacerkupplung über Säurechloridaktivierung zur Synthese der Carbonsäureamide 30-33 ⁷⁴	18
Abb.13: Darstellung des 2-Tetradecylhexadecansäureamids	18
Abb.14: Synthese der Amide 30/32/39/40 durch Kupplungsreaktion mit BOP ⁹⁶	19
Abb.15: Übersicht der eingesetzten Kupplungsreagenzien BOP 35 und PyBOP 42, HBTU 43 und T ₃ P 44 zur Darstellung der Carbonsäureamide	20
Abb.16: Darstellung des 2-Tetradecylhexadecansäure(2-aminoethyl)amids 30 durch Einsatz von HBTU 43 ⁹⁶	20
Abb.17: Synthese des Carbonsäureamids 30 unter Verwendung von T ₃ P	22
Abb.18: Einführung der Spacermoleküle mittels PyBOP-Kupplung zur Darstellung der Carbonsäureamide	23
Abb.19: Nebenreaktion der PyBOP-Kupplung unter Dimerisierung	23
Abb.20: Synthese der Transfektionslipide 67-77 via Carbodiimidmethode	25
Abb.21: Abspaltung der BOC-Schutzgruppen der Verbindungen 67-74	26
Abb.22: Hydrierung zur Abspaltung der CBZ-Schutzgruppen der Verbindungen 75 und 76	26
Abb.23: Zweistufige Schutzgruppenabspaltung der Verbindung 77	27

Abb.24: Kupplungsreaktion der Carbonsäureamide 30-33/45-47 mit aktiviertem, BOC-geschütztem Lysin.....	28
Abb.25 Anknüpfung der Lysinkopfgruppe an die Dimere 52 und 53.....	29
Abb.26 Umsetzung der Tris(2-aminoethyl)amin-Derivate 40/48-50 mit DiBOCLysOSu	29
Abb.27: Variation der Kopfgruppe durch Anbindung von ein (105-110/115/116) bzw. zwei zusätzlichen Lysinmolekülen (111-114)	30
Abb.28: Prinzipieller Aufbau der Gemini-Tenside	31
Abb.29: Zweitalkylierung unter Verwendung von 1,4-Diodbutan 117 zur Darstellung der Gemini-Grundstruktur	33
Abb.30: Synthese der Gemini-Lipide 122/123 durch Verseifung und Decarboxylierung.....	33
Abb.31: Darstellung der Gemini-Amide 126 und 127 mittels Säurechlorid-Methode	34
Abb.32: Synthese der Gemini-Dicarbonsäureamide 126 und 127 durch das BOP-Kupplungsverfahren.....	35
Abb.33: Einführung der Lysinkopfgruppen in die Gemini-Moleküle	36
Abb.34: Darstellung der Alkylallylmalonsäurediethylester 131 und 132.....	37
Abb.35: Syntheseversuch zur Darstellung der Gemini-Lipide mit ungesättigtem Linker unter Verwendung eines Grubbs-Katalysators	38
Abb.36: Veresterung der Tetradecylhexadecansäure 22 mit Methanol	40
Abb.37: Reduktion des Tetradecylhexadecansäuremethylesters 136 zum korrespondierenden Alkohol 138.....	41
Abb.38: Oxidation des Tetradecylhexadecanols 138 zum korrespondierenden Aldehyd 140 nach COREY ^{131,133}	42
Abb.39: Syntheseversuch zur Darstellung des Azomethins.....	43
Abb.40: Biologische Barrieren des Gentransfers ⁴	44
Abb.41: Möglicher Ablauf der Gentransfektion von der Aufnahme der Genfahre in die Zelle bis zum Eindringen der Nukleinsäure in den Zellkern ¹³⁸	45
Abb.42: Lamellare und invers-hexagonale Struktur der Lipoplexe ¹⁴⁵	46
Abb.43: Farbgebendes Reaktionsprinzip des ONPG-Assays	49
Abb.44: Transfektionseffizienz der Lipide T ₁₆ (2), E ₁₆ Lys (1,5), T ₁₆ diLys (3,5), G ₁₆ diLys (3,5) und E ₁₄ Lys (2,5) jeweils mit der Zusammensetzung Lipid/DOPE 2:1 (n/n) an Hep-G2-Zellen bei optimierten Ladungsverhältnissen der Lipoplexe (in Klammern +/-) sowie n = 3 Versuchen gegenüber dem Standard Lipofectamine TM ¹⁶⁷	50
Abb.45: Strukturformeln der Verbindungen T ₁₆ (50), E ₁₆ Lys (94), T ₁₆ diLys (102), G ₁₆ diLys (129) und E ₁₄ Lys (86)	50

Abb.46: Reduktion des MTT-Reagenz zu Formazan.....	51
Abb.47: MTT-Ergebnisse der Lipide T ₁₆ (2), E ₁₆ Lys (1,5), T ₁₆ diLys (3,5), G ₁₆ diLys (3,5) und E ₁₄ Lys (2,5) jeweils mit der Zusammensetzung Lipid/DOPE 2:1 (n/n) an Hep-G2-Zellen bei optimierten Ladungsverhältnissen der Lipoplexe (in Klammern +/-) sowie n = 3 Versuchen gegenüber dem Standard Lipofectamine™ ¹⁶⁷	52
Abb.48: Transfektionseffizienz der Lipoplexe aus E ₁₄ Lys 86 unter Einsatz von Cholesterol (Chol) und DOPE als Helferlipide in unterschiedlicher Zusammensetzung der Liposomen an Hep-G2-Zellen bei optimierten Ladungsverhältnissen der Lipoplexe (in Klammern +/-) sowie n = 3 Versuchen gegenüber dem Standard Lipofectamine™ ¹⁶⁷ ...	53
Abb.49: Toxizität der Lipoplexe aus E ₁₄ Lys 86 unter Zusatz von Cholesterol (Chol) und DOPE als Helferlipide in unterschiedlicher Zusammensetzung der Liposomen an Hep-G2-Zellen bei optimierten Ladungsverhältnissen der Lipoplexe (in Klammern +/-) sowie n = 3 Versuchen gegenüber dem Standard Lipofectamine™ ¹⁶⁷	53
Abb.50: Transfektionseffizienz der Lipoplexe aus E ₁₄ Lys 86 mit DOPE als Helferlipid im Verhältnis 1:2 (n/n) unter Variation des Ladungsverhältnisses (+/-) zwischen Lipid und DNA an Hep-G2-Zellen bei n = 3 Versuchen ¹⁶⁷	54
Abb.51: Zytotoxizität der Lipoplexe aus E ₁₄ Lys 86 mit DOPE als Helferlipid im Verhältnis 1:2 (n/n) unter Variation des Ladungsverhältnisses (+/-) zwischen Lipid und DNA an Hep-G2-Zellen bei n = 3 Versuchen ¹⁶⁷	54
Abb.52: Lipiddoppelschichten im ungeneigten (L _β) und geneigten (L _β [*]) geordneten Zustand der Gelphase und dem ungeordneten Zustand in der flüssig-kristallinen Phase ¹⁷⁴	56
Abb.53: DSC-Kurven der Lipide 46/49/93 und 101 (c = 1 mg/ml) bei einer Heizrate von 60 K/h und pH = 7. Die Kurven wurden jeweils um 0,5 kJ/mol*K zueinander verschoben ¹⁷⁵	57
Abb.54: Einfluss der Helferlipide Cholesterol und DOPE auf die Übergangstemperatur des 2-Tetradecyloctadecansäure-(2-aminoethyl)amids 46 (c _{gesamt} = 1 mg/ml) bei einer Heizrate von 60 K/h und pH = 7. Die Kurven wurden jeweils um 0,5 kJ/mol*K zueinander verschoben ¹⁷⁵	58
Abb.55: Schematische Darstellung der Filmwaagenmethode ¹⁷³	59
Abb.56: Darstellung einer beispielhaften Isotherme einer Langmuir Monoschicht von der flüssig expandierten zur ungeneigt kondensierten Phase ¹⁷⁶	60
Abb.57: Physikalisches Prinzip der BREWSTERwinkelmikroskopie (BAM) an der Monoschicht ¹⁷⁹	60

Abb.58: Isothermen der Transfektionslipide E14/16 (links) und E14/16Lys (rechts) auf Wasser bei 20 °C und einer Kompressionsgeschwindigkeit von 5 Å ² /Molekül min ¹⁷⁵ ...	61
Abb.59: BAM-Ausschnitte mit einer Größe von 586 x 586 µm der Verbindung E14/16 (46) bei verschiedenen Oberflächendrücken: $\pi = 0,1$ mN/m (a), $\pi = 15$ mN/m (b), $\pi = 20$ mN/m (c) ¹⁷⁵	61
Abb.60: BAM-Ausschnitte mit einer Größe von 586 x 586 µm der Verbindung E14/16Lys (93) bei verschiedenen Oberflächendrücken: $\pi = 31$ mN/m (a), $\pi = 39$ mN/m (b), $\pi = 41$ mN/m (c), $\pi = 43$ mN/m (d), $\pi = 45$ mN/m (e), $\pi = 48$ mN/m (f) ¹⁷⁵	62
Abb.61: Darstellung der mittleren Wellenzahlen der antisymmetrischen (≈ 2922 cm ⁻¹) und symmetrischen (≈ 2850 cm ⁻¹) CH ₂ -Schwingungen von E _{14/16} in Abhängigkeit vom Oberflächendruck mit und ohne DNA ¹⁷⁵	63
Abb.62: Darstellung der mittleren Wellenzahlen der antisymmetrischen (≈ 2922 cm ⁻¹) und symmetrischen (≈ 2850 cm ⁻¹) CH ₂ -Schwingungen von E _{14/16} Lys in Abhängigkeit vom Oberflächendruck mit und ohne DNA ¹⁷⁵	63
Abb.63: Vergleich der an die Grenzfläche gebundenen DNA von E _{14/16} und E _{14/16} Lys	64
Tab.1: Laufmittelzusammensetzung für die chromatographische Substanztrennung mittels MPLC-Verfahren.....	69

8 Literaturverzeichnis

- (1) Anderson, W. F. *Nature* **1998**, 392, 25-30.
- (2) Verma, I. M.; Sormina, M. *Nature* **1997**, 389, 239-242.
- (3) Yla-Herttuala, S.; Martin, J. F. *Lancet* **2000**, 355, 213-222.
- (4) Pathak, A.; Patnaik, S.; Gupta, K. C. *Biotechnol. J.* **2009**, 4, 1559-1572.
- (5) Leonetti, J. P.; Mechti, N.; Degolos, G.; Gagnor, C.; Lebleu, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 2702-2706.
- (6) Srivastava, K. I.; Liu, M. A. *Ann. Intern. Med.* **2003**, 138, 550-559.
- (7) Cavazzana-Calvo, M.; Hacein-Bey, S.; De.Saint Basile, G.; Gross, F. Y., E.; Nusbaum, P.; Selz, F.; Hue, C.; Certain, S.; Casanova, J. L.; Bousso, P.; Le Deist, F.; Fischer, A. *Science* **2000**, 288, 669-672.
- (8) Stocker, A. G.; Kremer, K. L.; Koldej, R.; Miller, D. S.; Anson, D. S.; Parsons, D. W. *J. Gene Med.* **2009**, 11, 861-867.
- (9) Murphy, S. L.; High, K. A. *Brit. J. Haematology* **2008**, 140, 479-487.
- (10) Eisensmith, R. C.; Kuzmin, A. I.; Krougliak, V. A. *MRDD Research Reviews* **1999**, 5, 136-143.
- (11) Edelstein, M. *The Journal of Gene Medicine - Online Library - Gene Therapy Clinical Trials Worldwide - www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/* **2011**.
- (12) Bjorklund, T.; Kordower, J. H. *Movement Disorders* **2010**, 25, 161-173.
- (13) Nilsson, P.; Iwata, N.; Muramatsu, S.; O Tjernberg, L.; Winblad, B.; Saido, T. C. *J. Cell. & Mol. Med.* **2010**, "Postprint";10.1111/j.1582-4934.2010.01038.x.
- (14) Melo, L. G.; Pachori, A. S.; Gneccchi, M. e. a. *Trends Mol Med* **2005**, 11, 240-250.
- (15) Williams, K. A.; Coster, D. J. *Clinical and Experimental Ophthalmology* **2010**, 38, 93-103.
- (16) Karmali, P. P.; Chaudhuri, A. *Wiley Periodicals, Inc Med Res Rev* **2007**, 27, 696-722.
- (17) Hollon, T. *Nature Med.* **2000**, 6, 6.
- (18) Woods, N. B., et. al. *Blood* **2003**, 101, 1284-1289.
- (19) Schröder, A. R. e. a. *Cell* **2002**, 110, 521-529.
- (20) Li, Z. e. a. *Science* **2002**, 296, 497.
- (21) Ruiz, F. E.; Clancy, J. P.; Perricone, M. A.; Bebok, Z.; Hong, J. S.; Cheng, S. H.; Meeker, D. P.; Young, K. R.; Schoumacher, R. A.; Weatherly, M. R.; Wing, L.; Morris, J. E.; Sindel, L.; Rosenberg, M.; van Ginkel, F. W.; McGhee, J. R.; Kelly, D.; Lyrene, R. K.; Sorscher, E. J. *Hum Gene Ther* **2001**, 12, 751-761.

- (22) Behr, J.-P. *Acc. Chem. Res* **1993**, *26*, 274-278.
- (23) Zhang, Y.; Yu, L.-C. *BioEssays* **2008**, *30*, 606-610.
- (24) O'Brien, J. A.; Lummis, S. C. R. *Nature Protocols* **2006**, *1*, 977-981.
- (25) O'Brien, J. A. e. a. *J. Neurosci. Methods* **2001**, *112*, 57-64.
- (26) Jiao, S.; Cheng, L.; Wolff, J. A.; Yang, N.-S. *Biotechnology* **1993**, *11*, 497-502.
- (27) Neumann, E.; Schaefer-Ridder, M.; Wang, Y.; Hofschneider, P. H. *Embo J* **1982**, *1*, 841-845.
- (28) Ratanamart, J.; Huggins, C.; Shaw, J. A. M. *J Gene Med* **2010**, *12*, 377-384.
- (29) Andre, F.; Mir, L. M. *Gene Ther.* **2004**, *11*, 33-42.
- (30) Paterson, L.; Agate, B.; Comrie, M.; Ferguson, R.; Lake, T. K.; Morris, J. E.; Carruthers, A. E.; Brown, C. T. A.; Sibbett, W.; Bryant, P. E.; Gunn-Moore, F.; Riches, A. C.; Dholakia, K. *Optics Express* **2005**, *13*, 595-600.
- (31) Shirahata, Y.; Ohkohchi, N.; Itagak, H.; Satomi, S. *J. Invest. Med.* **2001**, *49*, 184-190.
- (32) Tsai, K. C.; Liao, Z. K.; Yang, S. J.; Lin, W. L.; Shieh, M. J.; Hwang, L. H.; Chen, W. S. *J Gene Med* **2009**, *11*, 933-940.
- (33) Koike, H.; Tomita, N.; Azuma, H. e. a. *J Gene Med* **2005**, *7*, 108-116.
- (34) Bekeredjian, R.; Chen, S. Y.; Frenkel, P. A. e. a. *Circulation* **2003**, *108*, 1022-1026.
- (35) Yang, S. Y.; Sun, J. S.; Liu, C. H.; Tsuang, J. H.; Chen, L. T.; Hong, C. Y.; Yang, H. C.; Horng, H. E. *Artif Organs* **2008**, *32*, 195-204.
- (36) Huth, S.; Lausier, J.; Gersting, S. W.; Rudolph, C.; Plank, C.; Welsch, U.; Rosenecker, J. *J Gene Med* **2004**, *6*, 923-936.
- (37) Luo, D.; Saltzman, W. M. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 33-37.
- (38) Jiang, M.; Chen, G. *NATURE PROTOCOLS*, *1*, 695-700.
- (39) Craig, A. M. *MIT Press, Cambridge* **1998**.
- (40) Laemmli, U. K. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1975**, *72*, 4288-4292.
- (41) Wu, G. Y.; Wu, C. H. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 14621-14624.
- (42) Wu, G. Y.; Wu, C. H. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 4429-4432.
- (43) Neu, M.; Fischer, D.; Kissel, T. J. *Gene Med.* **2005**, *7*, 992-1009.
- (44) Boussif, O.; Lezoualch, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D. e. a. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 7297-7301.
- (45) Cherng, J.-Y.; van de Wetering, P.; Talsma, H.; Crommelin, D. J. A.; Hennink, W. E. *Pharm. Res.* **1996**, *13*, 1038-1042.
- (46) Hirano, S.; Seino, H.; Akiyama, Y.; Nonaka, I. *Prog. Biomed. Polym.* **1990**, *283*, 90.

- (47) Kim, T.-H.; Jiang, H.-L.; Jere, D.; Park, I.-K.; Cho, M.-H.; Nah, J.-W.; Choi, Y.-J.; Akaike, T.; Cho, C.-S. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 726-753.
- (48) Borchard, G. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *52*, 145-150.
- (49) Rigby, P. G. *Nature* **1969**, *221*, 968-969.
- (50) Nimesh, S.; Kumar, R.; Chandra, R. *Int. J. Pharm.* **2006**, *320*, 143-149.
- (51) Boussif, O.; Delair, T.; Brua, C.; Veron, L. e. a. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 877-883.
- (52) Mintzer, M. A.; Simanek, E. E. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 259-302.
- (53) Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M. e. a. *Polym. J.* **1985**, *17*, 117-132.
- (54) Schatzlein, A. G.; Zinselmeyer, B. H.; Elouzi, A.; Dufes, C. e. a. *J. Controlled Release* **2005**, *101*, 247-258.
- (55) Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84*, 7413-7417.
- (56) Hirko, A.; Tang, F.; Hughes, J. A. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1185-1193.
- (57) Floch, V.; Loisel, S.; Guenin, E.; Hervé, A. C.; Clement, J. C.; Yaouanc, J. J.; des Abbayes, H.; Férec, C. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4617-4628.
- (58) Horobin, W. R.; Weissig, V. *J. Gene Med.* **2005**, *7*, 1023-1034.
- (59) Tros de Ilarduya, C.; Sun, Y.; Düzgünes, N. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *40*, 159-170.
- (60) Behr, J. P.; Demeneix, B.; Loeffler, J. P.; Perez-Mutul, J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1989**, *86*, 6982-6986.
- (61) Elouahabi, A.; Thiry, M.; Pector, V.; Fuks, R.; Ruyschaert, J.-M.; Vandenbranden, M. *FEBS Lett.* **1997**, *414*, 187-192.
- (62) Vigneron, J. P.; Oudrhiri, N.; Fauquet, M.; Vergely, I.; Bradley, J. C.; Basseville, M.; Lehn, P.; Lehn, J. M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 9682-9686.
- (63) Zhang, G.; Gurtu, V.; Smith, T. H.; Nelson, P.; Kain, S. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *236*, 126-129.
- (64) Guenin, E.; Herve, A.-C.; Floch, V.; Loisel, S.; Yaouanc, J.-J.; Clement, J.-C.; Férec, C.; des Abbayes, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 629-631.
- (65) Chabaud, P.; Camplo, M.; Payet, D.; Serin, G.; Moreau, L.; Barthelemy, P.; Grinstaff, M. W. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 466-472.
- (66) Boomer, J. A.; Thompson, D. H.; Sullivan, S. M. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 1292-1301.
- (67) Ajmani, P. S.; Tang, F.; Krishnaswami, S.; Meyer, E. M.; Sumners, C.; Hughes, J. A. *Neurosci. Lett.* **1999**, *277*, 141-144.

- (68) Tang, F.; Hughes, J. A. *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10*, 791-796.
- (69) Schulze, I. C. *Dissertation Martin-Luther-Universität Halle* **2006**.
- (70) Beyer, H.; Walter, W. *Lehrbuch der organischen Chemie; S.Hirzel Verlag Stuttgart, 23.Auflage* **1998**.
- (71) Hauptmann, S. *Organische Chemie; VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie Leipzig, 1.Auflage* **1985**.
- (72) Jones, G. *Org. React.* **1967**, *15*, 204ff.
- (73) Bergmann, E. D. e. a. *Org. React.* **1959**, *10*, 179ff.
- (74) Becker, H. G.; Berger, W.; Domschke, G. e. a. *Organikum 20.Auflage* **1999**.
- (75) Pearson, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3533-3539.
- (76) Ayres, D. C. *Carbanions in Synthesis, Oldbourne Press London* **1966**, 142.
- (77) House, O. H. M. S. R., W. A. Benjamin Inc., New York, Kap. *Modern Synthetic Reactions; W.A.Benjamin Inc.* **1965**, Kap. 7.
- (78) Cope, A. C.; Holms, H. L.; House, H. O. *Org. React.* **1957**, *9*, 107.
- (79) Breusch, F. L.; Ulusoy, E. *Chem. Ber.* **1953**, *86*, 688.
- (80) Schulte, K. E.; Weißkopf, W.; Kirschner, J. *Z. physiol. Chem.* **1951**, 288, 69.
- (81) Ulusoy, E. *Rev. Fac. Sci.* **1954**, *19*, 46.
- (82) Creger, P. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 1397.
- (83) Folz, M. *Diplomarbeit Martin-Luther-Universität Halle* **2006**.
- (84) Ehlers, E. *Chemie II, Jungjohann Verlagsgesellschaft mbH* **1992**.
- (85) Mamlock, L.; Wolfenstein, R. *Ber.* **1900**, *33*, 159.
- (86) Cope, A. C.; Hardy, E. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *62*, 441.
- (87) Tschugaeff, L. *Ber. d. Dt. Chem. Ges.* **1899**, *32*, 3332-3335.
- (88) Pizey, J. S. *Synthetic Reagents; Wiley* **1974**, *1*, 321-357.
- (89) Pearson, A. J.; Roush, W. R. *Handbook of Reagents for Organic Synthesis: Activating Agents and Protecting Groups; Wiley* **1999**.
- (90) Chu, W.; Tu, Z.; McElveen, E.; Xu, J.; Taylor, M.; Luedtke, R. R.; Mach, R. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 77-87.
- (91) Antell, M. F.; Patai, S. *In The Chemistry of Acyl Halides; Interscience* **1972**, 40-44.
- (92) Sanchez-Sancho, F.; Mann, E.; Herradon, B. *Synlett* **2000**, *4*, 509-513.
- (93) Bouron, E.; Goussard, G.; Marchand, C.; Bonin, M.; Pannecoucke, X.; Quirion, J.-C.; Husson, H.-P. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7227-7230.
- (94) Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G.; Selve, C. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *14*, 1219-1222.

- (95) Castro, B.; Dormoy, J.-R.; Dourtoglou, B.; Evin, G.; Selve, C.; Ziegler, J.-C. *Synthesis* **1976**, 751.
- (96) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.
- (97) Dykstra, R. R. *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis; Paquette, L.A. Ed.; John Wiley & Sons* **1995**, *4*, 2668.
- (98) Wissmann, H.; Kleiner, H.-J. *Angew. Chem.* **1980**, *92*, 129-130.
- (99) Klose, J.; Bienert, M.; Mollenkopf, C.; Wehle, D.; Zhang, C.-W.; Carpinoc, L. A.; Henklein, P. *Chem. Commun.* **1999**, 1847-1848.
- (100) Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208.
- (101) Albericio, F.; Bofill, J. M.; El-Faham, A.; Kates, S. A. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678-9683.
- (102) Sheehan, J. C.; Hess, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067-1068.
- (103) Sheehan, J. C.; Cruickshank, P. A. *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 2525-2528.
- (104) Schuessler, H.; Zahn, H. *Chem. Ber.* **1962**, *95*, 1076-1080.
- (105) Smith, M. B.; March, J. *March's Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms, and Structure; Wiley* **2001**.
- (106) Rebek, J.; Feitler, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 4052-4053.
- (107) Rebek, J.; Feitler, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 1606-1607.
- (108) König, W.; Geiger, R. *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788.
- (109) Windridge, G. C.; Jorgensen, E. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *17*, 6318-6319.
- (110) Griehl, C.; Weigt, J.; Jeschkeit, H. *High Resolution Chromatography* **1994**, *17*, 700.
- (111) Menger, F. M.; Keiper, J. S. *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1980-1996.
- (112) Menger, F. M.; Littau, C. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1451-1452.
- (113) Kirby, A. J.; Camilleri, P. *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1486-1496.
- (114) Oda, R.; Huc, I.; Candau, S. J. *Chem. Commun.* **1997**, 2105-2106.
- (115) Renouf, P.; Mioskowski, C.; Lebeau, L.; Hebrault, D.; Desmurs, J.-R. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1357-1360.
- (116) Buynsters, P. J. J. A.; Garcia Rodriguez, C. L.; Willighagen, E. L.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Kremer, A.; Camilleri, P.; Feiters, M. C.; Nolte, R. J. M.; Zwanenburg, B. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1397-1406.
- (117) Jennings, K.; Marshall, I.; Birrell, H.; Edwards, A.; Haskins, N.; Södermann, O.; Kirby, A. J.; Camilleri, P. *Chem. Commun.* **1998**, 1951-1952.
- (118) Ronsin, G.; Perrin, C.; Guedat, P.; Kremer, A.; Camilleri, P.; Kirby, A. J. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **2001**, 2234-2235.

- (119) McGregor, C.; Perrin, C.; Monck, M.; Camilleri, P.; A.J., K. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6215-6220.
- (120) Bell, P. C.; Bergsmam, M.; Dolbnya, I. P.; Bras, W.; Stuart, M. C. A.; Rowan, A. E.; Feiters, M. C.; Engberts, J. B. F. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1551-1558.
- (121) Grubbs, R. H. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 7117-7140.
- (122) Hérrison, J. L.; Chauvin, Y. *Makromol. Chem.* **1970**, *141*, 161-176.
- (123) Fürstner, A. *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3140-3172.
- (124) Febo-Ayala, W.; Morera-Felix, S. L.; Hrycyna, C. A.; Thompson, D. H. *Biochemistry* **2006**, *45*, 14683-14694.
- (125) Kakinuma, K.; Arakawa, K.; Eguchi, T. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4741-4745.
- (126) Xu, Y.; Szoka, F. C., Jr. *Biochemistry* **1996**, *35*, 5616-5623.
- (127) Zabner, J.; Fasbender, A. J.; Moninger, T.; Poellinger, K. A.; Welsh, M. J. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 18997-19007.
- (128) Prata, C. A. H.; Zhao, Y.; Barthelemy, P.; Li, Y.; Luo, D.; McIntosh, T. J.; Lee, S. J.; Grinstaff, M. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12196-12197.
- (129) Bowden, K.; Heilbron, I. M.; Jones, E. R. H.; Weedon, B. C. L. *J. Chem. Soc.* **1946**, 39-45.
- (130) Collins, J. C.; Hess, W. W.; Frank, F. J. *Tetrahedron Lett.* **1968**, 3363.
- (131) Corey, E. J.; Suggs, J. W. *Tetrahedron Lett.* **1975**, 2647.
- (132) Piancatelli, G.; Scettri, A.; D'Auria, M. *Synthesis* **1982**, 245.
- (133) Agarwal, S.; Tiwari, H. P.; Sharma, J. P. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *46*, 4417-4420.
- (134) Mumper, R. J.; Duguid, J. G.; Anwer, K.; Barron, M. K. e. a. *Pharm. Res.* **1996**, *13*, 701-709.
- (135) Kawabata, K.; Takakura, Y.; Hashida, M. *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 825-830.
- (136) Houk, B. E.; Hochhaus, G.; Hughes, J. A. *AAPS Pharm. Sci.* **1999**, *1*, E9.
- (137) Read, M. L.; Logan, A.; Seymour, L. W. *Adv. Genet.* **2005**, *53*, 19-46.
- (138) Wiethoff, C. M.; Middaugh, C. R. *J. Pharm. Sc.* **2003**, *92*, 203-217.
- (139) Lin, A. J.; Slack, N. L.; Ahmad, A.; George, C. X.; Samuel, C. E.; Safinya, C. R. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 3307-3316.
- (140) Gupta, B.; Levchenko, T. S.; Torchilin, V. P. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 637-651.
- (141) Watson, P.; Jones, A. T.; Stephens, B. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 43-61.
- (142) Hashida, M.; Nishikawa, M.; F., Y.; Takakura, Y. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *52*, 187-196.

- (143) Caracciolo, G.; Caminiti, R.; Digman, M. A.; Gratton, E.; Sanchez, S. *J. Phys. Chem.* **2009**, *113*, 4995-4997.
- (144) Thomas, M.; Klivanov, A. M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 14640-14645.
- (145) Ma, B.; Zhang, S.; Jiang, H.; Zhao, B.; Lv, H. *J. Controlled Release* **2007**, *123*, 184-194.
- (146) Pollard, H.; Remy, J. S.; Loussouarn, G.; Demolombe, S.; Behr, J. P.; Escande, D. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 7507-7511.
- (147) Grabe, M.; Oster, G. *J. Gen. Physiol.* **2001**, *117*, 329-344.
- (148) Boussif, O.; Zanta, M. A.; Behr, J. P. *Gene Ther.* **1996**, *3*, 1074-1080.
- (149) Merdan, T.; Kunath, K.; Fischer, D.; Kopecek, J.; Kissel, T. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 140-146.
- (150) Lukacs, G. L.; Haggie, P.; Seksek, O.; Lechardeur, D.; Freedman, N.; Verkman, A. S. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 1625-1629.
- (151) Pollard, H.; Toumaniantz, G.; Amos, J. L.; Avet-Loiseau, H.; Guihard, G.; Behr, J. P.; Escande, D. *J Gene Med* **2001**, *3*, 153-164.
- (152) Lechardeur, D.; Sohn, K. J.; Haardt, M.; Joshi PB; Monck, M.; Graham, R. W.; Beatty, B.; Squire, J.; O'Brodovich, H.; Lukacs, G. L. *Gene Ther.* **1999**, *6*, 482-497.
- (153) Cornelis, S.; Vandenbrande, M.; Ruyschaert, J. M.; Elouahabi, A. *DNA Cell. Biol.* **2002**, *21*, 91-97.
- (154) Suh, J.; Wirtz, D.; Hanes, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3878-3882.
- (155) Nguyen, D. N.; Green, J. J.; Chan, J. M.; Langer, R.; Anderson, D. G. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 847-867.
- (156) Bonner, W. M. *J. Cell. Biol.* **1975**, *64*, 421-430.
- (157) Dowty, M. E.; Williams, P.; Zhang, G.; Hagstrom, J. E.; Wolff, J. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 4572-4576.
- (158) Featherstone, C.; Darby, M. K.; Gerace, L. *J. Cell Biol.* **1988**, *107*, 1289-1297.
- (159) Brunner, S.; Fürtbauer, E.; Sauer, T.; Kursa, M.; Wagner, E. *Mol. Ther.* **2000**, *5*, 80-86.
- (160) Brunner, S.; Sauer, T.; Carotta, S.; Cotton, M.; Saltik, M.; Wagner, E. *Gene Ther.* **2000**, *7*, 401-407.
- (161) Männistö, M.; Reinisalo, M.; Ruponen, M.; Honkakoski, P.; Tammi, M.; Urtti, A. *J. Gene Med.* **2007**, *9*, 479-487.
- (162) Schaffer, D. V.; Fidelman, N. A.; Dan, N.; Lauffenburger, D. A. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *67*, 598-606.

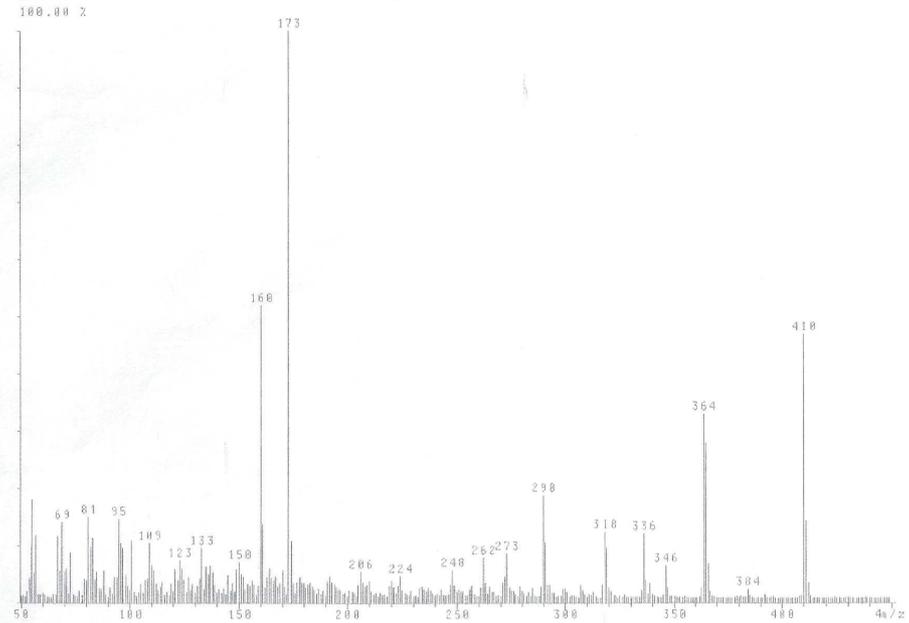
- (163) Safinya, C. R. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 440-448.
- (164) Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C.; 238-52, J. M. B. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 238-252.
- (165) Olson, F.; Hunt, C. A.; Szoka, F. C.; Vail, W. J.; Papahadjopoulos, D. *Biochim Biophys Acta* **1979**, *557*, 9-23.
- (166) Schubert, R. *Meth Enzymology* **2003**, *367*, 46-70.
- (167) Erdmann, N. *Persönliche Mitteilungen* **2010**.
- (168) Schrimpf, G. *Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, 3. Auflage Spektrum Akademischer Verlag **2002**.
- (169) Freshney, R. I. *Tierische Zellkultur - ein Methodenhandbuch*, Dt. Ausgabe der 2.Auflage Walter de Gruyter **1990**.
- (170) Lindl, T.; Bauer, J. *Zell- und Gewebekultur; Fischer Verlag* **1994**, 3. Auflage.
- (171) Berridge, M. V.; Tan, A. S.; McCoy, K. D.; Wang, R. *Biochemica* **1996**, *4*, 14-19.
- (172) Atkins, P. W.; de Paula, J. *Physikalische Chemie 4.Auflage; Wiley-VHC Verlag, Weinheim* **2006**, 43-44, 761.
- (173) Antipina, M. N.; Schulze, I. C.; Dobner, B.; Langner, A.; Brezesinski, G. *Langmuir* **2007**, *23*, 3919-3926.
- (174) Brauer, C. *Bachelorarbeit Chemie, Universität Potsdam* **2010**.
- (175) Kaganer, V. M.; Möhwald, H.; Dutta, P. *Rev. Mod. Phys.* **1999**, *71*, 779-819.
- (176) Hacke, S. *Dissertation Georg-August-Universität Göttingen* **2001**, 8-10.
- (177) Brewster, D. *Philos. Trans. Roy. Soc* **1815**, *105*, 125.
- (178) Kaercher, T.; Hönig, D.; Möbius, D. *International Ophtalmology* **1993**, *17*, 341-348.
- (179) Henon, S.; Meunier, J. *Thin Solid Films* **1992**, *210*, 121-123.
- (180) Henon, S.; Meunier, J. *Rev. Sci. Instr.* **1991**, *62*, 936-939.
- (181) Hönig, D.; Möbius, D. *Thin Solid Films* **1992**, *159*, 1.
- (182) Hönig, D.; Möbius, D. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 4590-4592.
- (183) Mendelsohn, R.; Flach, C. R. *Peptide-Lipid Interactions* **2002**, *52*, 57-88.
- (184) Mendelsohn, R.; Brauner, J. W.; Gericke, A. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1995**, *46*, 305-334.
- (185) Dluhy, R. A.; Cornell, D. G. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 3195-3197.
- (186) Kerth, A. M. *Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg* **2003**.
- (187) Mitchell, M. L.; Dluhy, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 712-718.
- (188) Hunt, R.; Mitchell, M. L.; Dluhy, R. A. *J. Molec. Struct.* **1989**, *214*, 93-109.
- (189) Jatzkewitz, H.; Mehl, E. *Z. Physiol. Chem.* **1961**, *320*, 251-257.

-
- (190) Schmidt, R. R.; Jankowski, K. *Liebigs Ann.* **1996**, 867.
- (191) Jaeger, D. A.; Sayed, Y. M.; Dutta, A. K. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 449-450.
- (192) Bier, G. *Makromol. Chem.* **1949**, 4, 124.
- (193) Staudinger, H.; Bier, G.; Lorentz, G. *Makromol. Chem.* **1949**, 4, 264.
- (194) Staudinger, H. *Chem. Ber.* **1933**, 66, 378.

Oleylmalonsäurediethylester - 10

EI-MS

File : FOLZ2_Vers. 1 Comment: MF130193 80 /PHARM: CHEN, PROF. DOBNER
 of D3, 18.04.1997, 14:51 h Commission: AND 402 LM:14 BEARBEITER: LETSBRING
 Spectrum 4 <n> = basepeak <g> = 1.00 <d> = user

¹H-NMR

Folz_5662-63_MF 130103 8D Folz_5662-63_MF 130103 8D Folz_5662-63_MF 130103 8D Folz_5662-63_MF 130103 8D

Automation directory: /export/home/vnmr1/auto/rt/14
 File: Folz_5662-63_03

Pulse Sequence: s2pu1

Solvent: cdcl3

Temp: 27.0 C / 300.1 K

Sample #12

File: Folz_5662-63_02

DEMN1-40989 "lane"

Relax. delay 2.000 sec

Pulse 22.1 degrees

Acq. time 2.502 sec

NUC1 13C 101.626 MHz

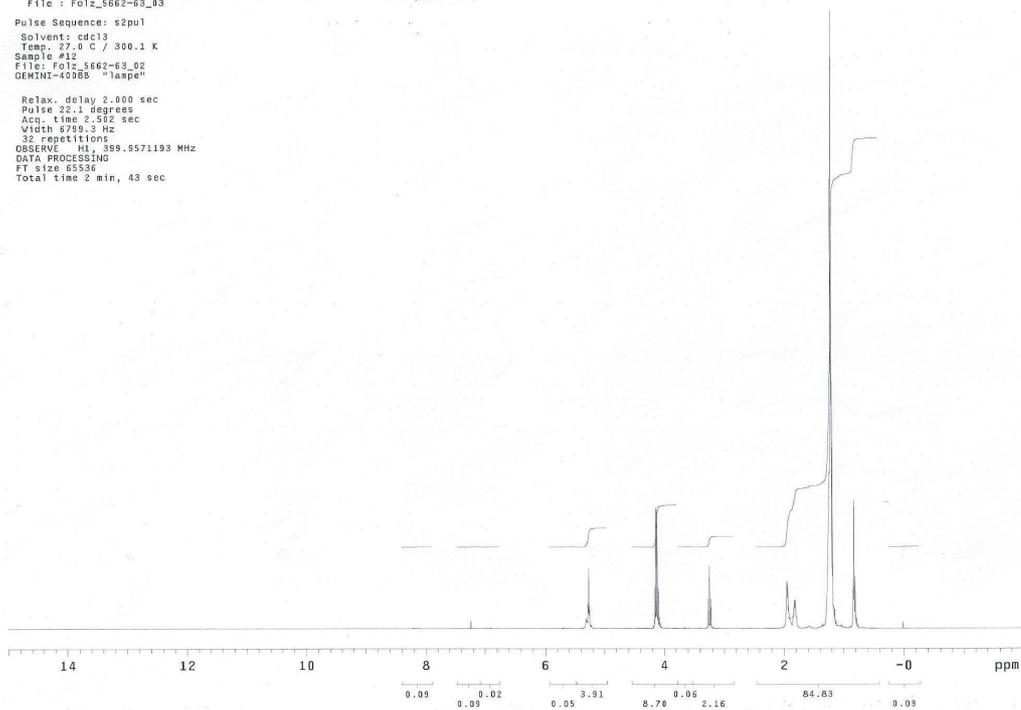
32 repetitions

OBSERVE H1, 399.8571193 MHz

DATA PROCESSING

FT size 65536

Total time 2 min, 48 sec



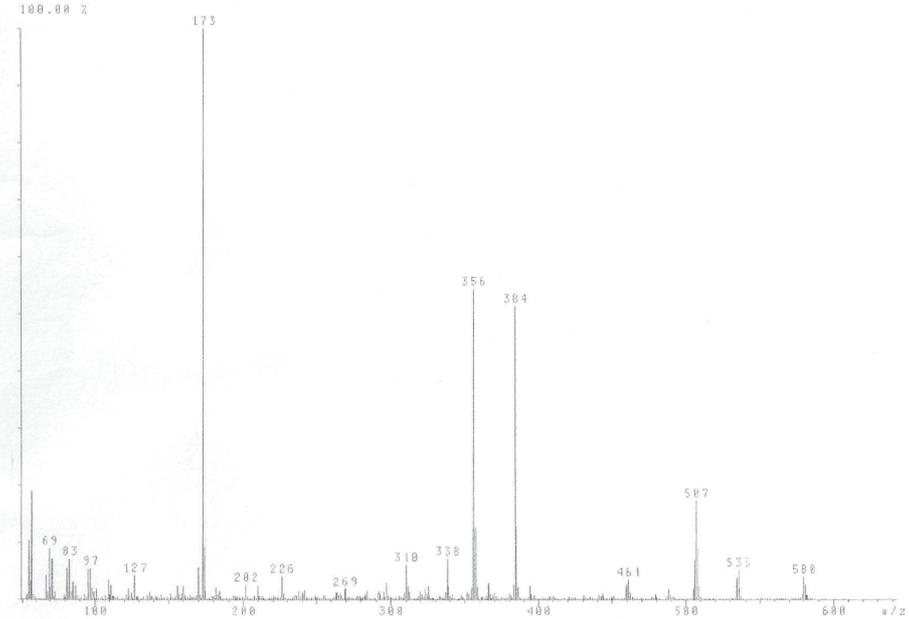
Hexadecyltetradecylmalonsäurediethylester - 13

EI-MS

File : F0LZ3, Vers. 1
 of Di, 10.04.1997, 15:14 h
 Spectrum 7

Comment: MF060409
 Commission: AMD 402
 LN:14
 <n> = basepeak

/PHARM. CHEM. PROF. DOBNER
 BEARBEITER: LEISSRING
 <g> = 1.00
 <d> = user

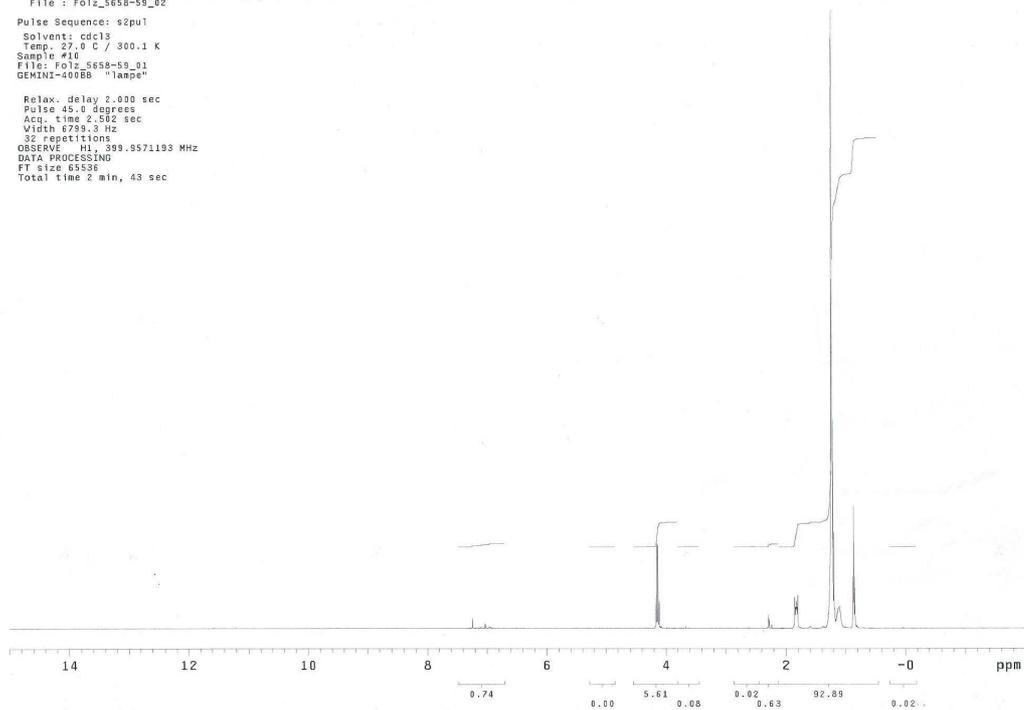
¹H-NMR

Folz_5658-59_MF_060409 Folz_5658-59_MF_060409 Folz_5658-59_MF_060409 Folz_5658-59_MF_060409

Automation directory: /export/home/vnmr1/auto/rt7/14
 File : folz_5658-59_g2

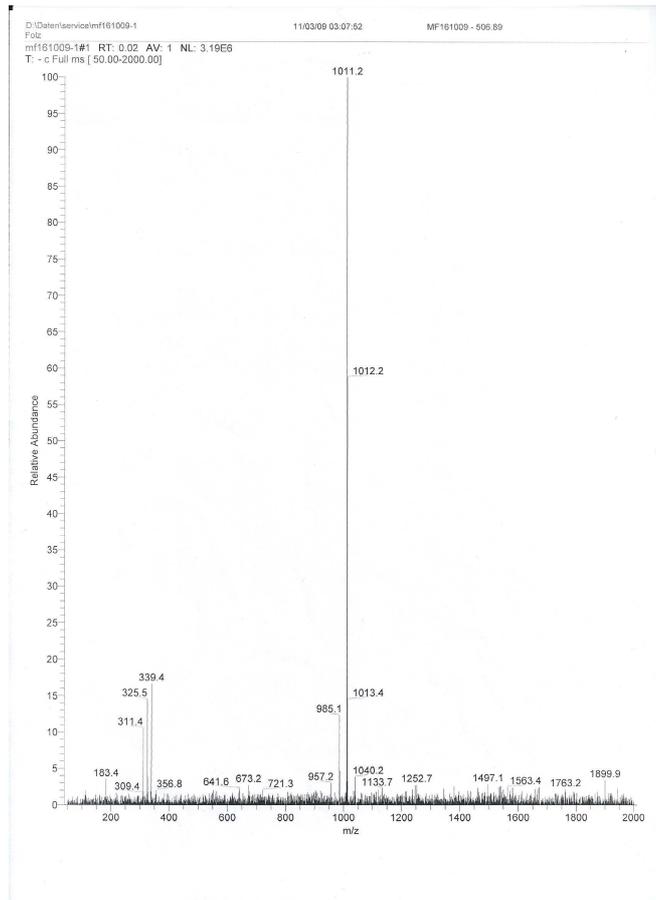
Pulse Sequence: g2pu1
 Solvent: cdcl3
 Temp: 27.0 C / 300.1 K
 Sample #10
 File: folz_5658-59_01
 GEMINI-400BB "lampe"

Relax. delay 2.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 2.562 sec
 Width 6799.3 Hz
 32 repetitions
 OBSERVE H1 399.9571193 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 65536
 Total time 2 min, 43 sec



2-Tetradecyleicosa-11-ensäure - 25 C_{18u/14}

ESI-MS

¹H-NMR

Folz_3885-86_MI 161009

Archive directory: /export/home/vnmri/vnmrsys/data
Sample directory: auto_09rez010

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: cdcl3

Temp: 27.0 C / 300.1 K

Sample #3, user vnmri

File: Folz_3885-86_01

INOVA-500 "max2"

Relax. delay 2.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 3.277 sec

Width 11001.1 Hz

8 repetitions

OBSERVE H1 499.7609530 MHz

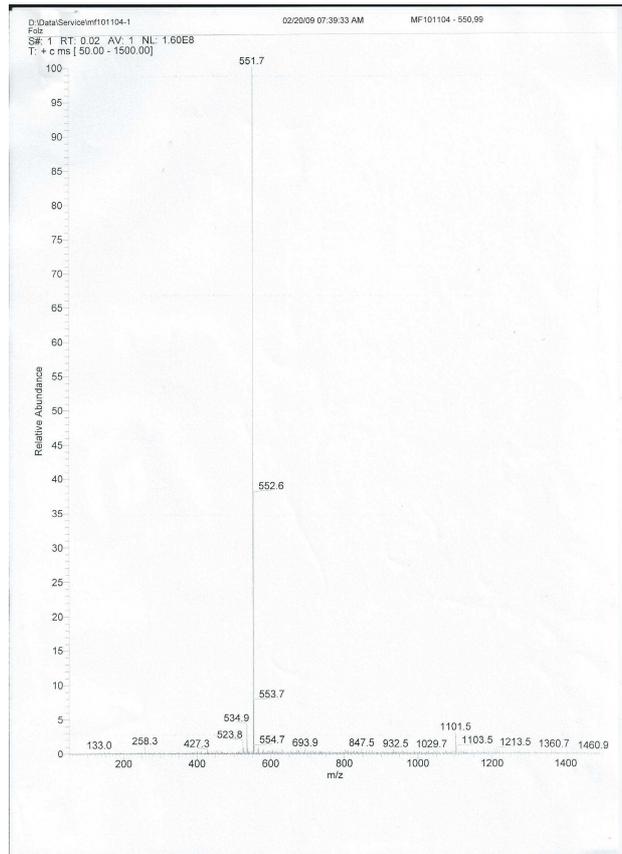
DATA PROCESSING

Line broadening 0.5 Hz

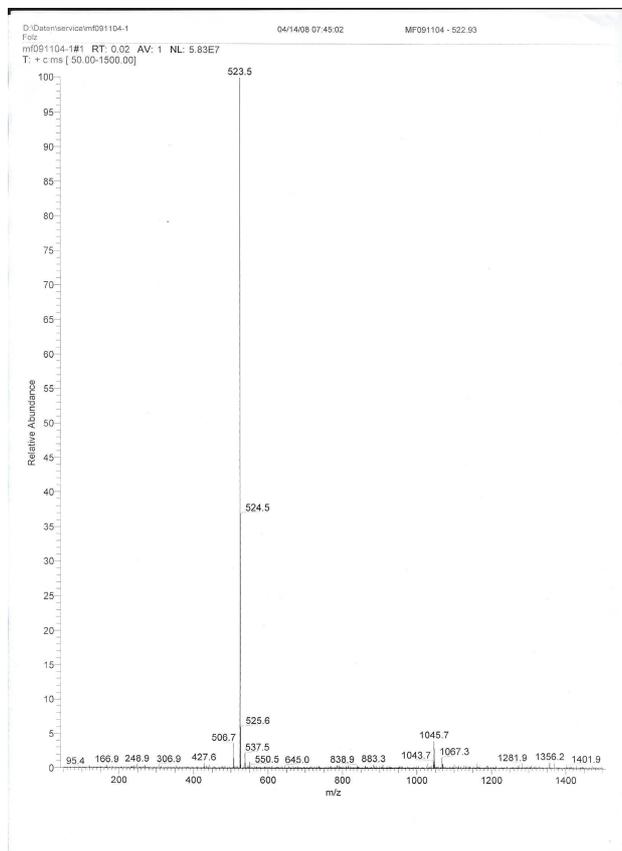
FT size 131072

2-Hexadecyloctadecansäure-(2-aminoethyl)amid - 31 E₁₆

ESI-MS

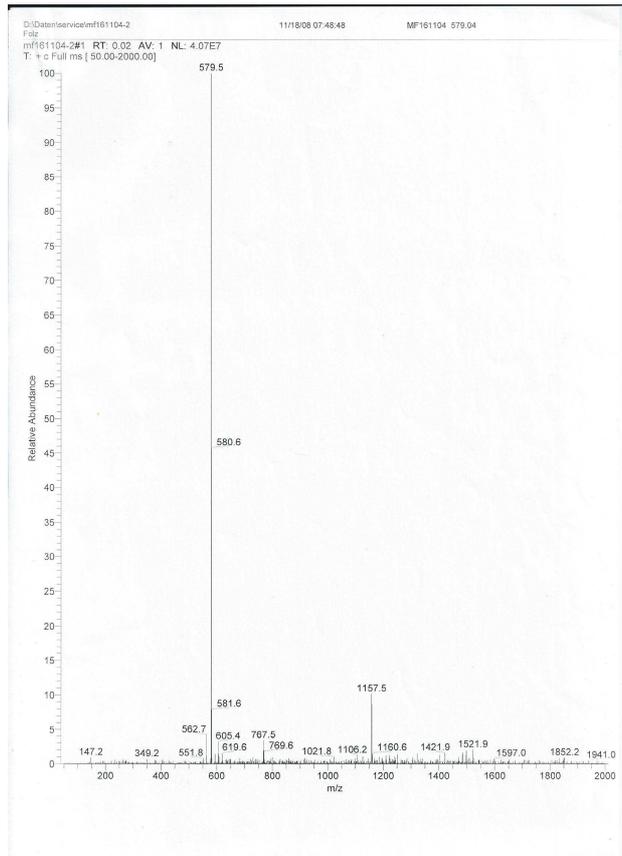
**2-Tetradecylhexadecansäure-(4-aminobutyl)amid - 32 P₁₄**

ESI-MS

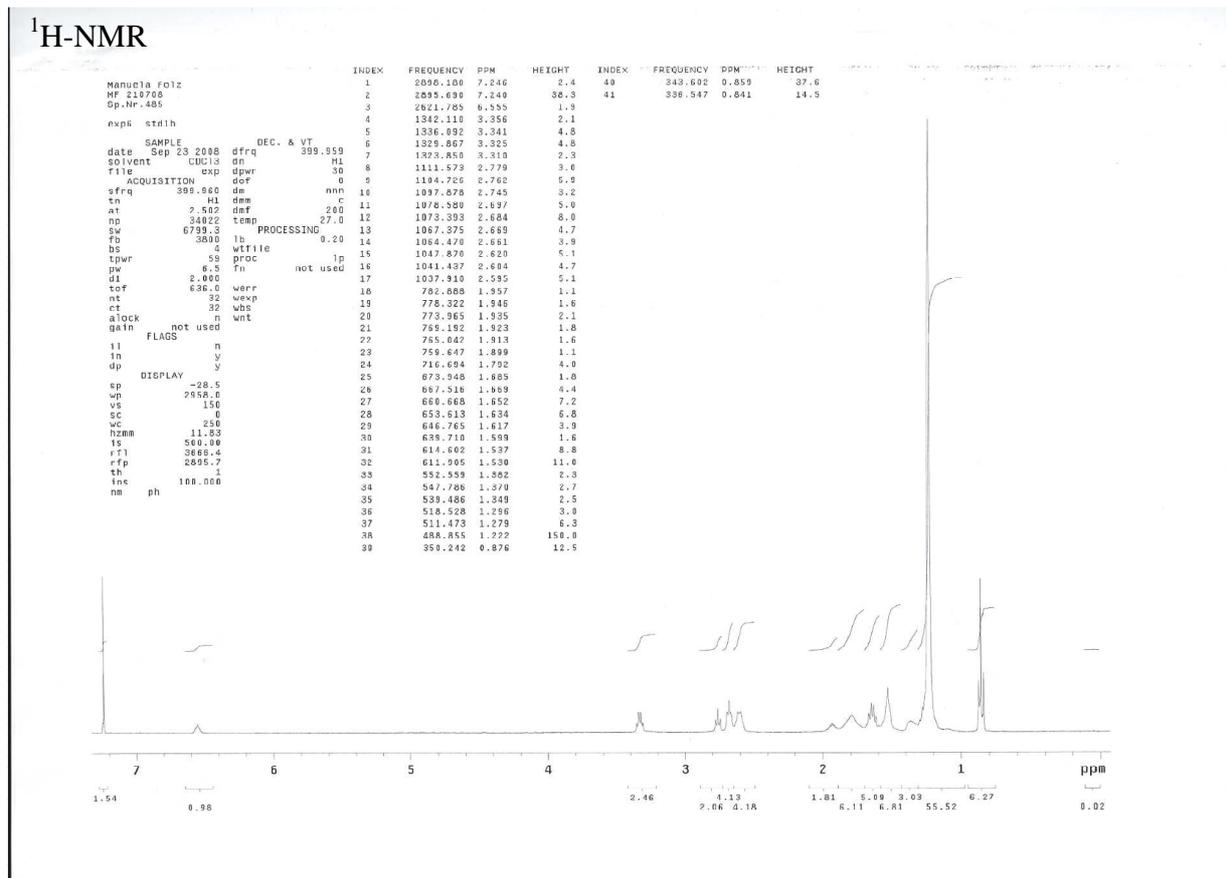


2-Hexadecyloctadecansäure-(4-aminobutyl)amid - 33 P₁₆

ESI-MS



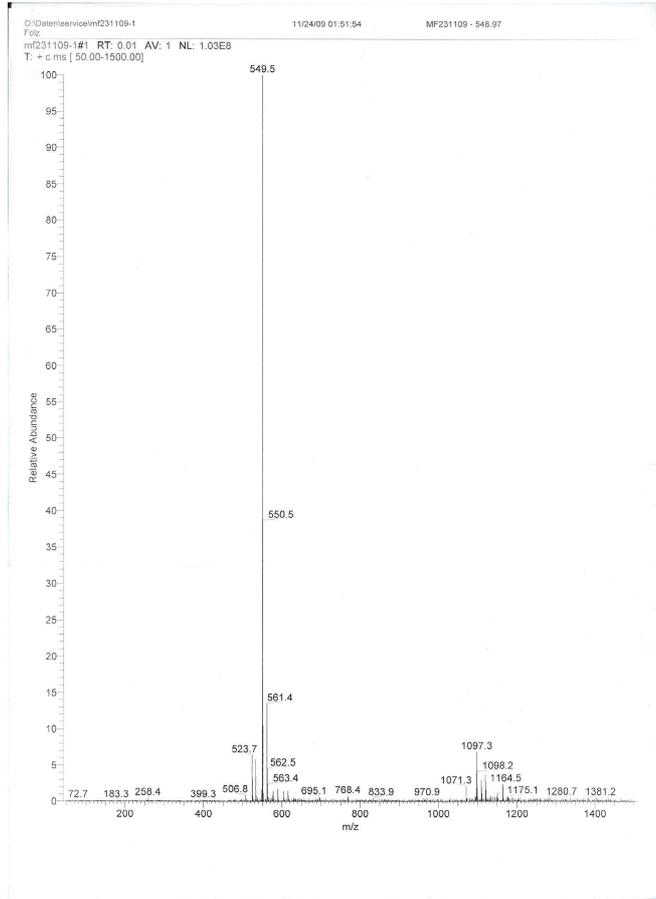
2-Tetradecylhexadecansäure-{3-[4-(3-aminopropyl)aminobutyl]aminopropyl}amid - 39



2-Tetradecyleicosa-11-ensäure-(2-aminoethyl)amid - 47

E18u/14

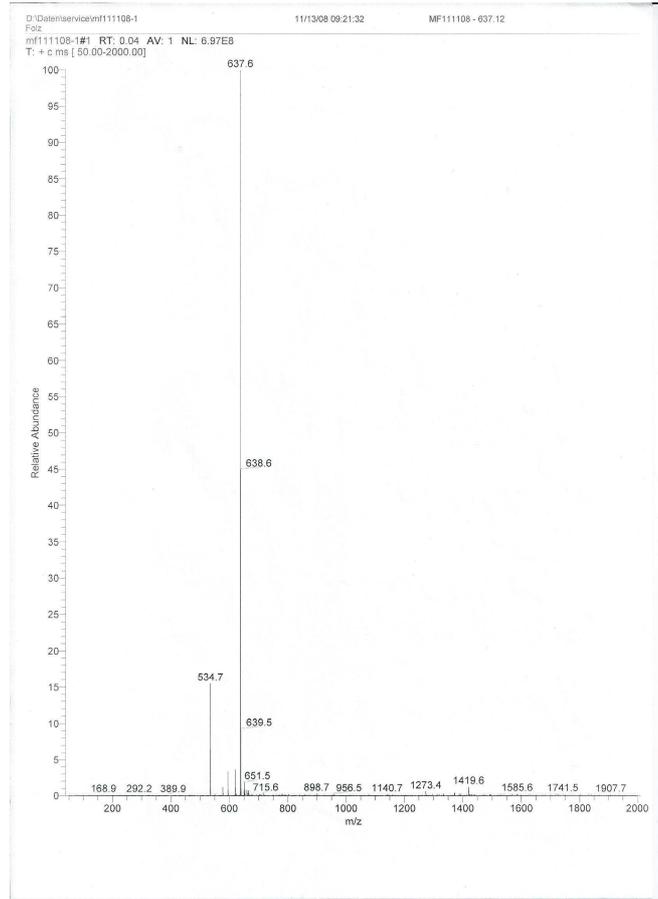
ESI-MS



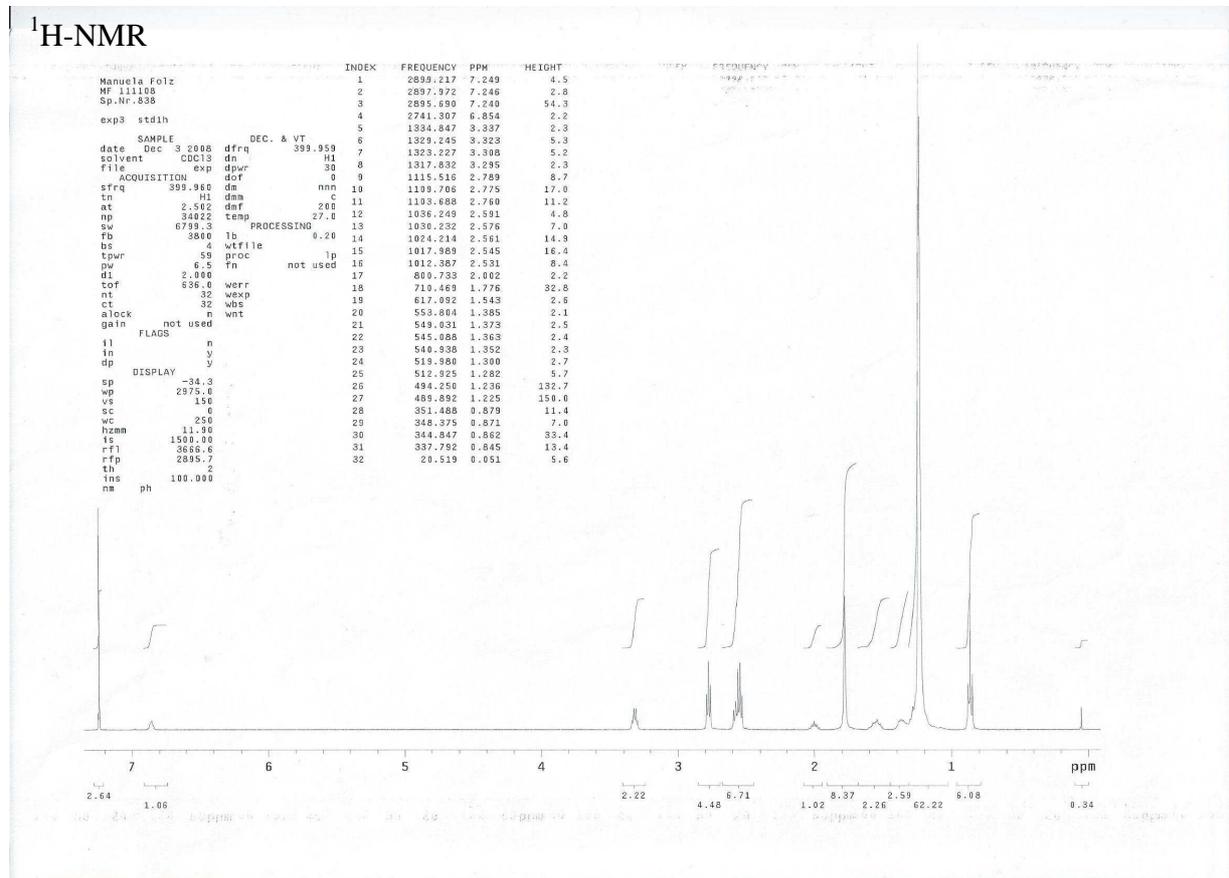
2-Hexadecyloctadecensäure-[2-bis(2-aminoethyl)aminoethyl]amid - 50

T₁₆

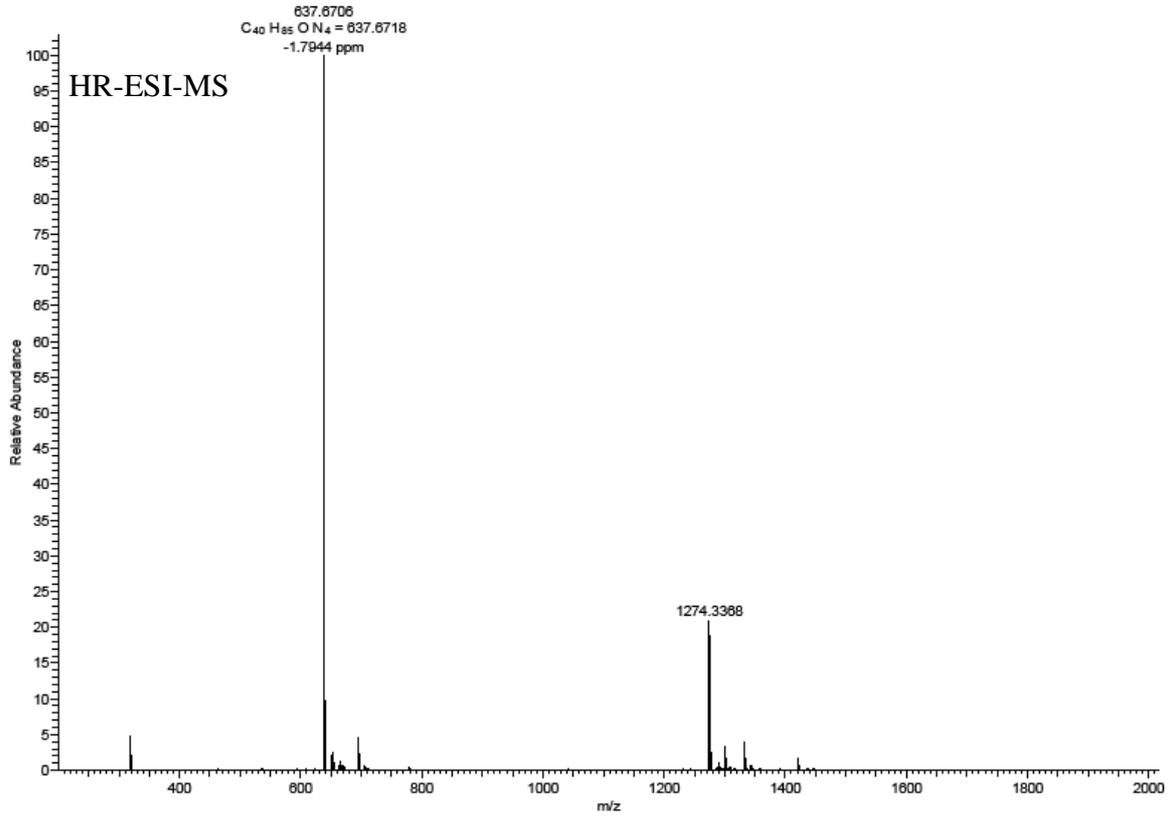
ESI-MS



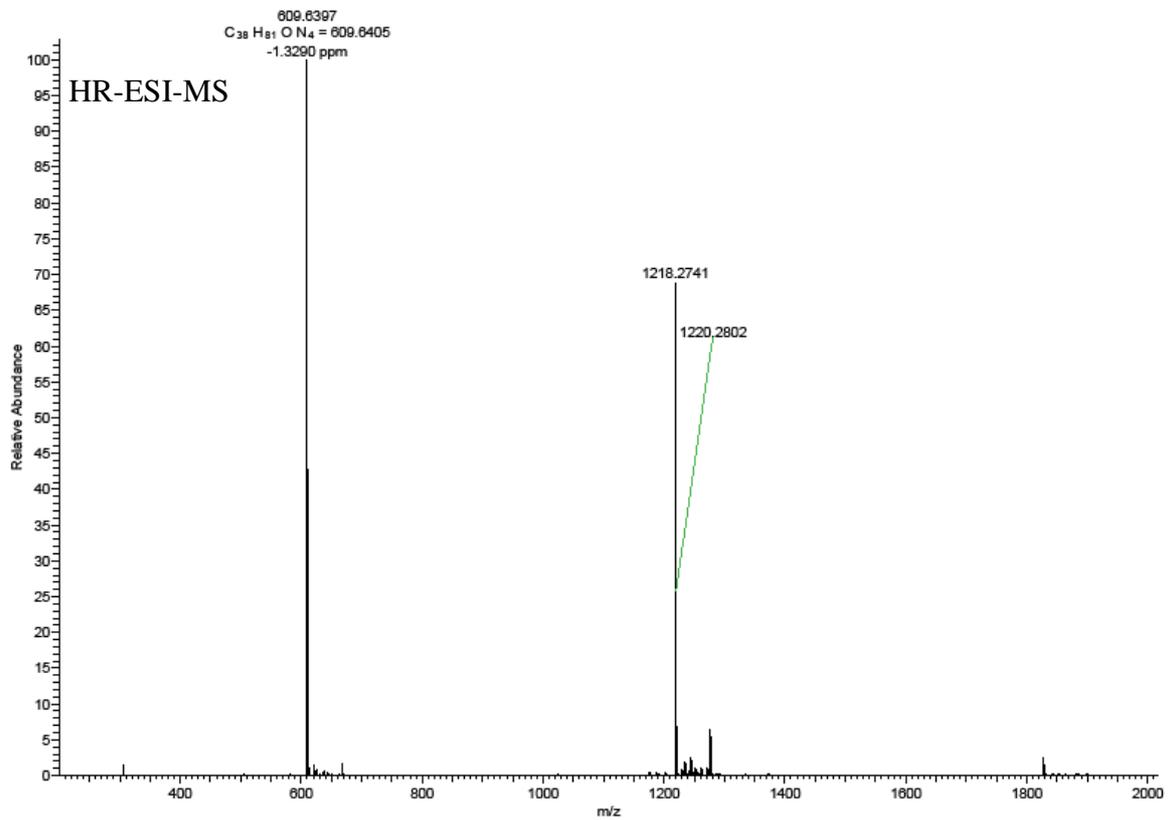
¹H-NMR



4/1/2010 4:41:57 PM nuelal100401\T16

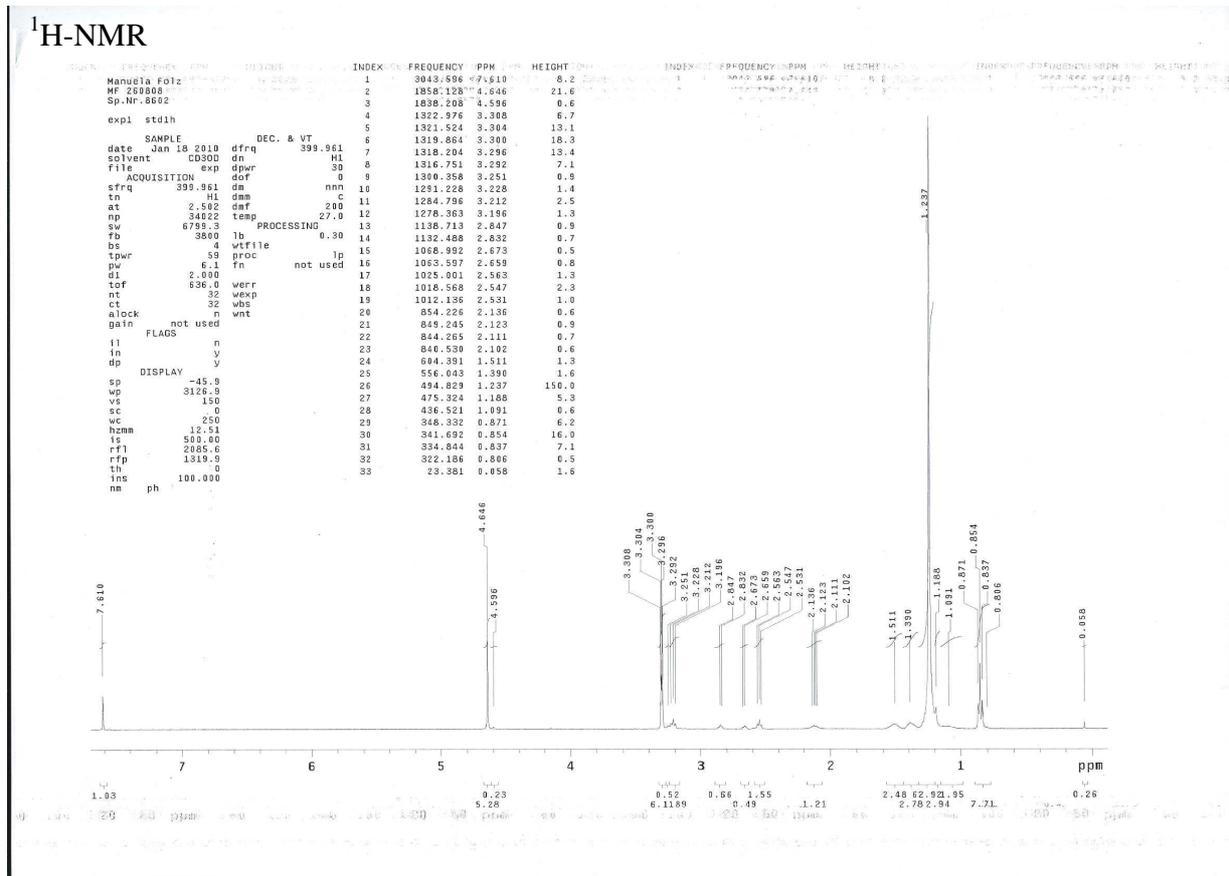
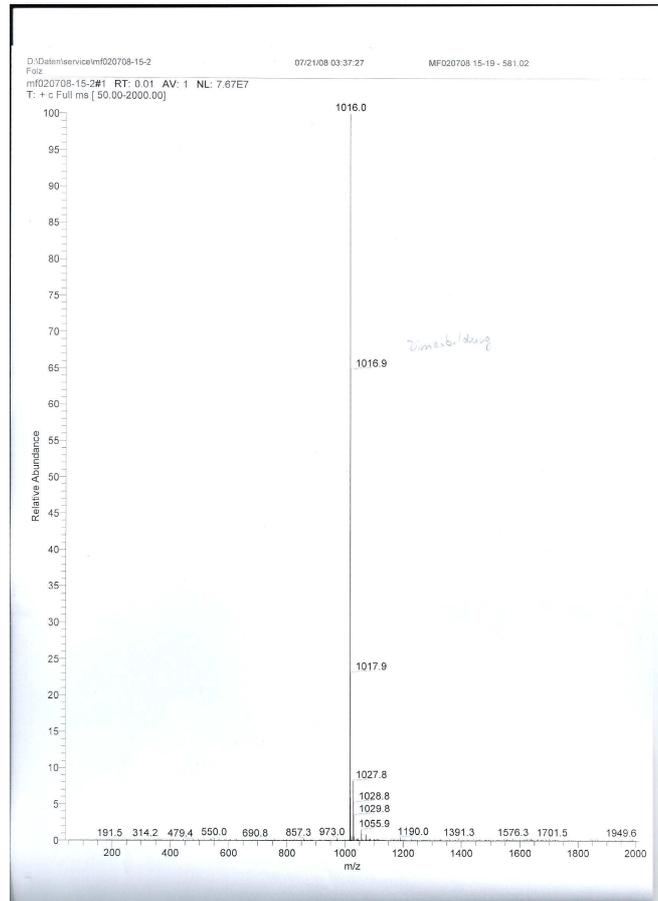
T16 #3-30 RT: 0.02-0.24 AV: 28 NL: 2.07E8
T: FTMS + p NSI Full ms [200.00-2000.00]**2-Tetradecyloctadecansäure-[2-bis(2-aminoethyl)aminoethyl]amid - 49****T_{14/16}**

4/1/2010 4:49:55 PM nuelal100401\T14_16

T14_16 #3-30 RT: 0.02-0.24 AV: 28 NL: 2.27E8
T: FTMS + p NSI Full ms [200.00-2000.00]

2-Tetradecylhexadecansäure-[2-(2-aminoethyl-2-tetradecylhexadecanoylaminoethyl)-aminoethyl]amid - 53 T₁₄Dimer

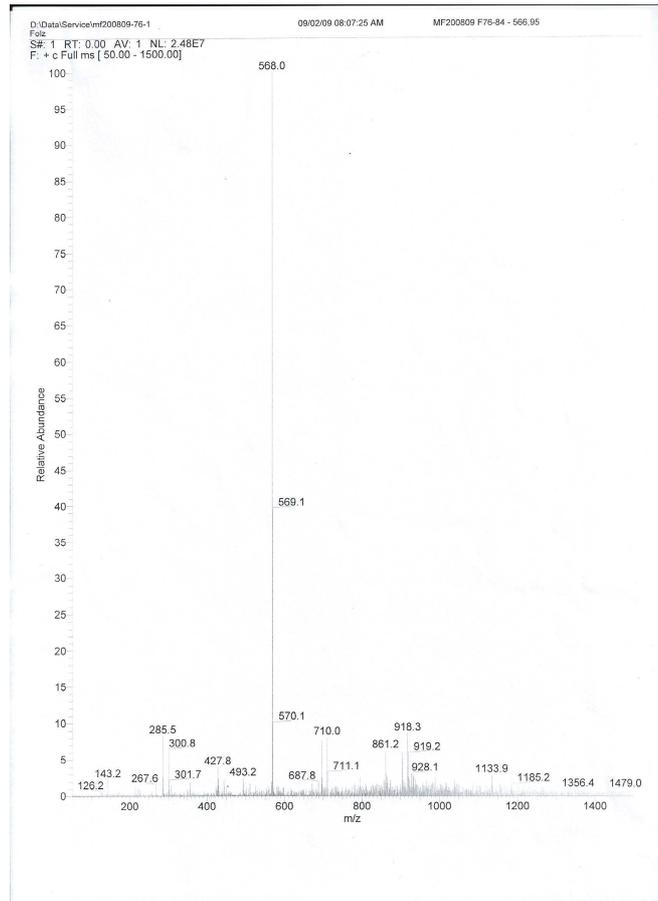
ESI-MS



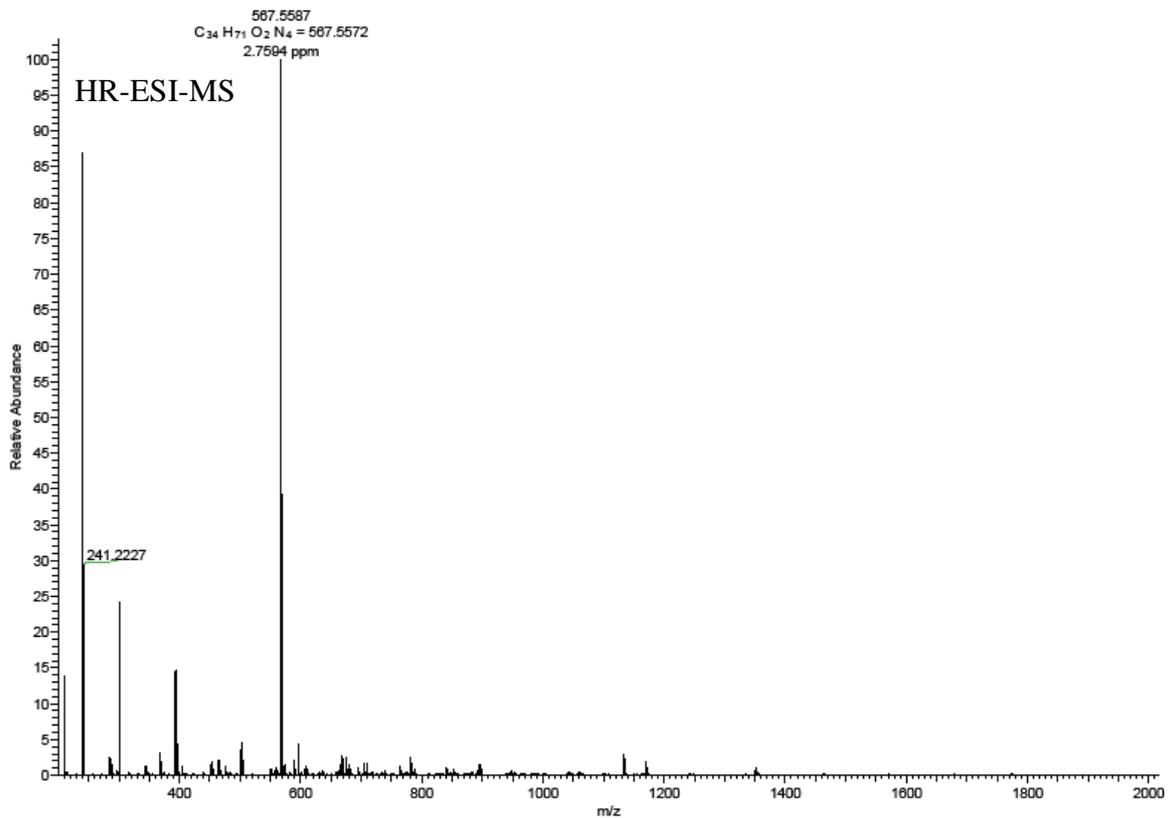
2-Dodecyltetradecansäure-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]amid - 91

E₁₂Lys

ESI-MS

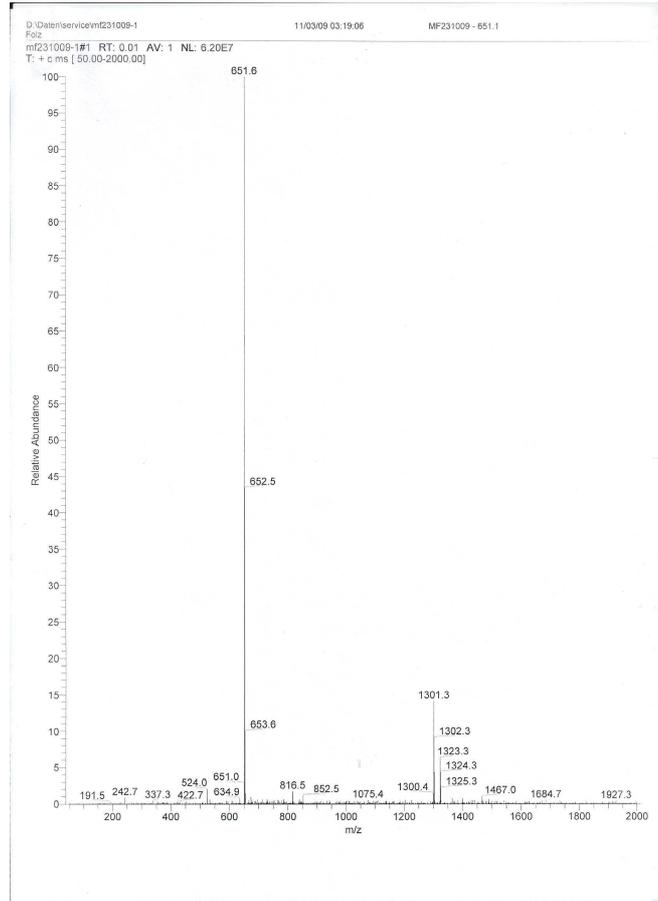


4/1/2010 4:44:41 PM nuela\100401\E12Lys

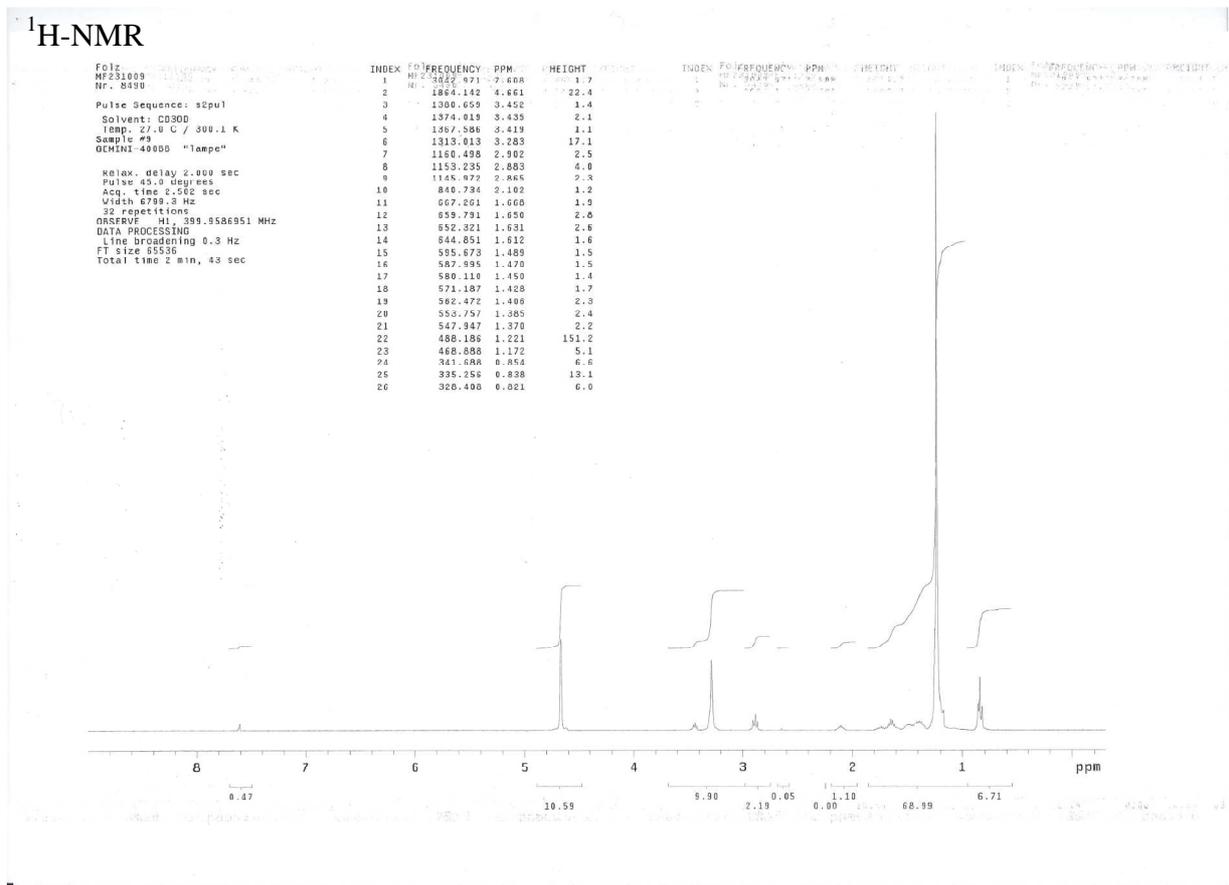
E12Lys #3-30 RT: 0.02-0.28 AV: 28 NL: 4.63E8
T: FTMS + p NSI Full ms [200.00-2000.00]

2-Tetradecyloctadecansäure-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]amid - 93 E_{14/16}Lys

ESI-MS

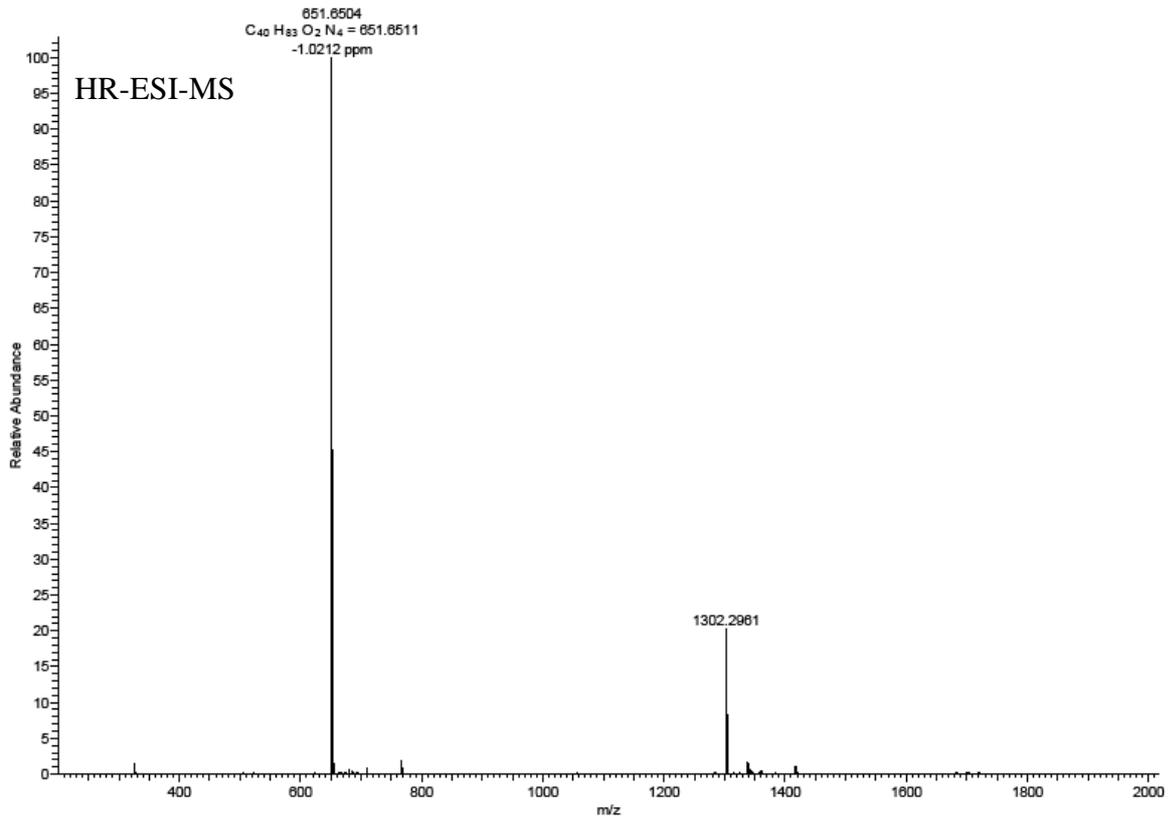


¹H-NMR



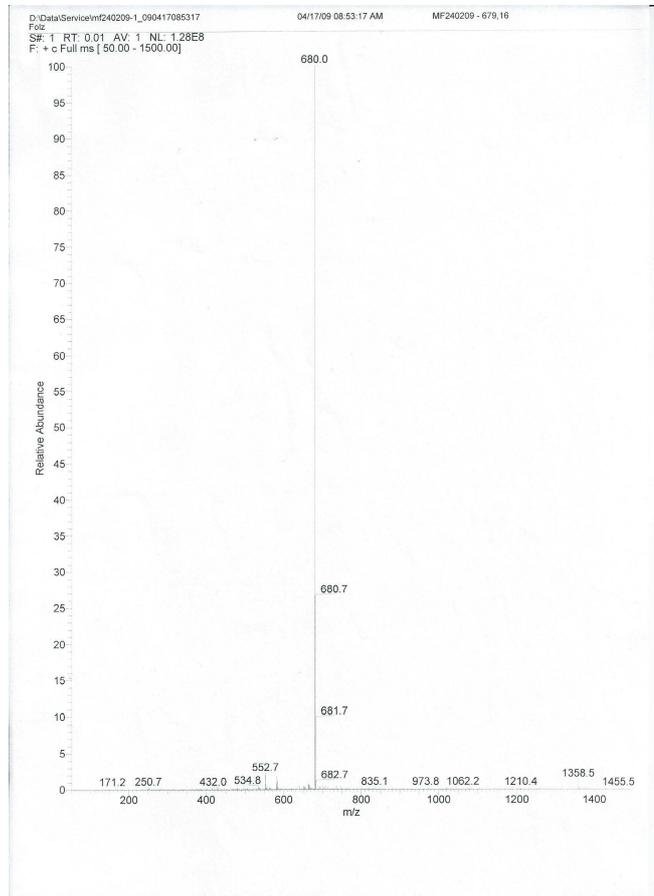
4/1/2010 4:45:55 PM 100401E14_16Lys

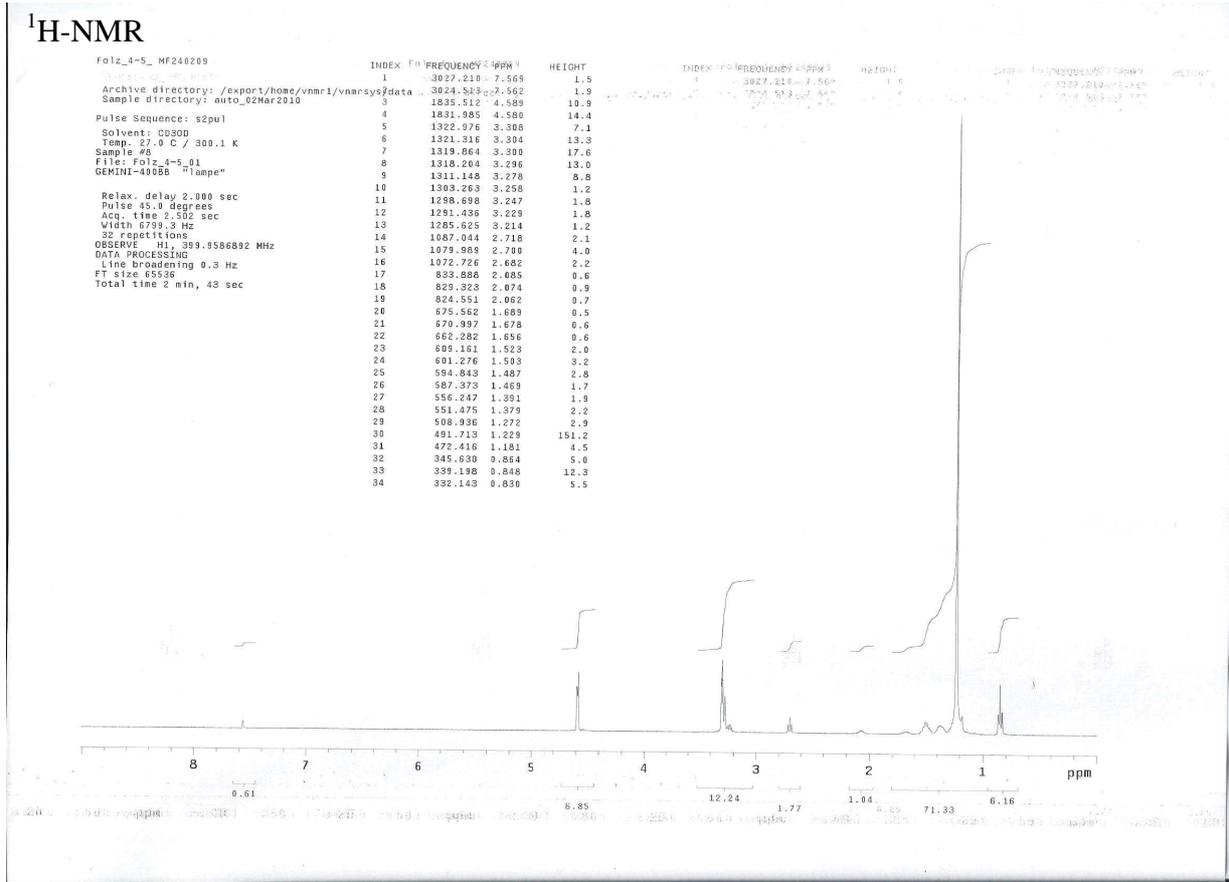
E14_16Lys #3-30 RT: 0.02-0.29 AV: 28 NL: 1.71E7
T: FTMS + p NSI Full ms [200.00-2000.00]



2-Hexadecyloctadecansäure-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]amid - 94 E₁₆Lys

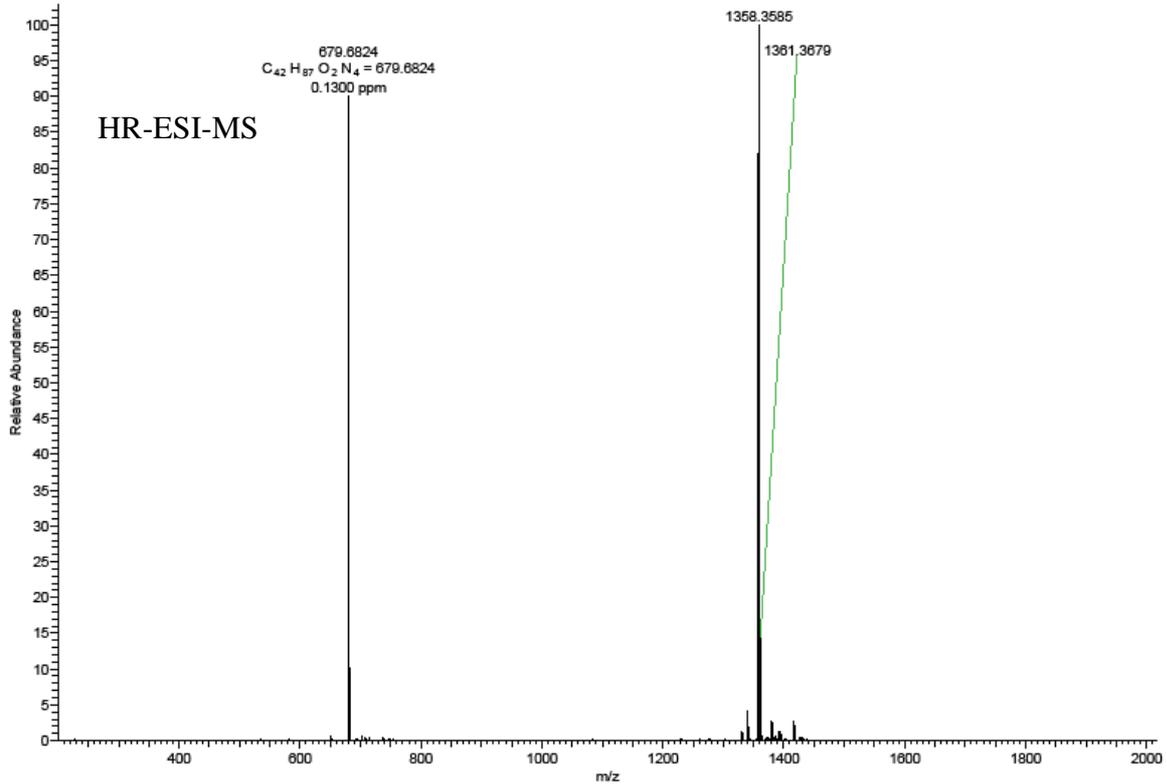
ESI-MS





4/1/2010 4:48:39 PM nuela100401E18Lys

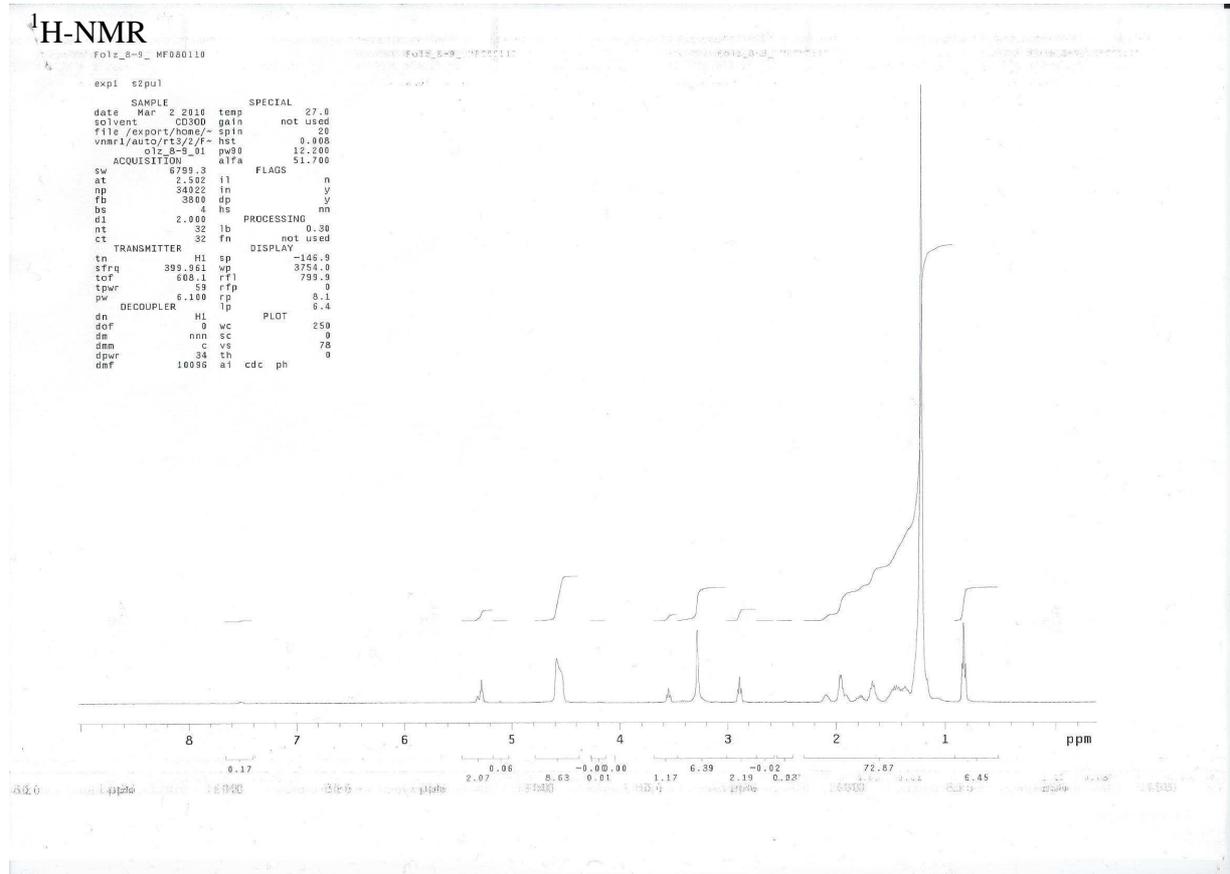
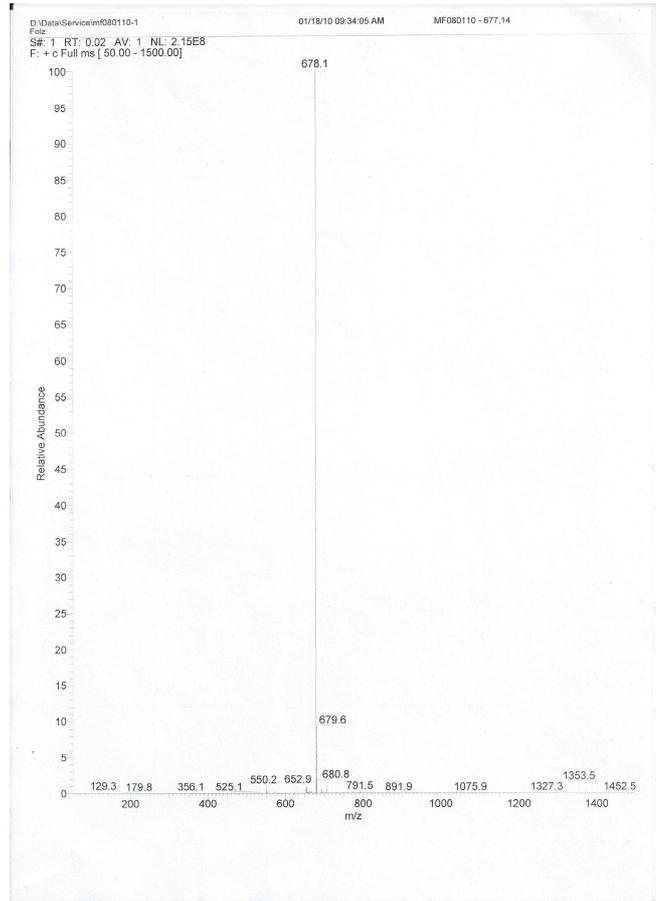
E18Lys #3-30 RT: 0.02-0.24 AV: 28 NL: 0.08E7
 T: FTMS + p NSI Full ms [200.00-2000.00]



2-Tetradecyleicosa-11-ensäure-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]amid - 96

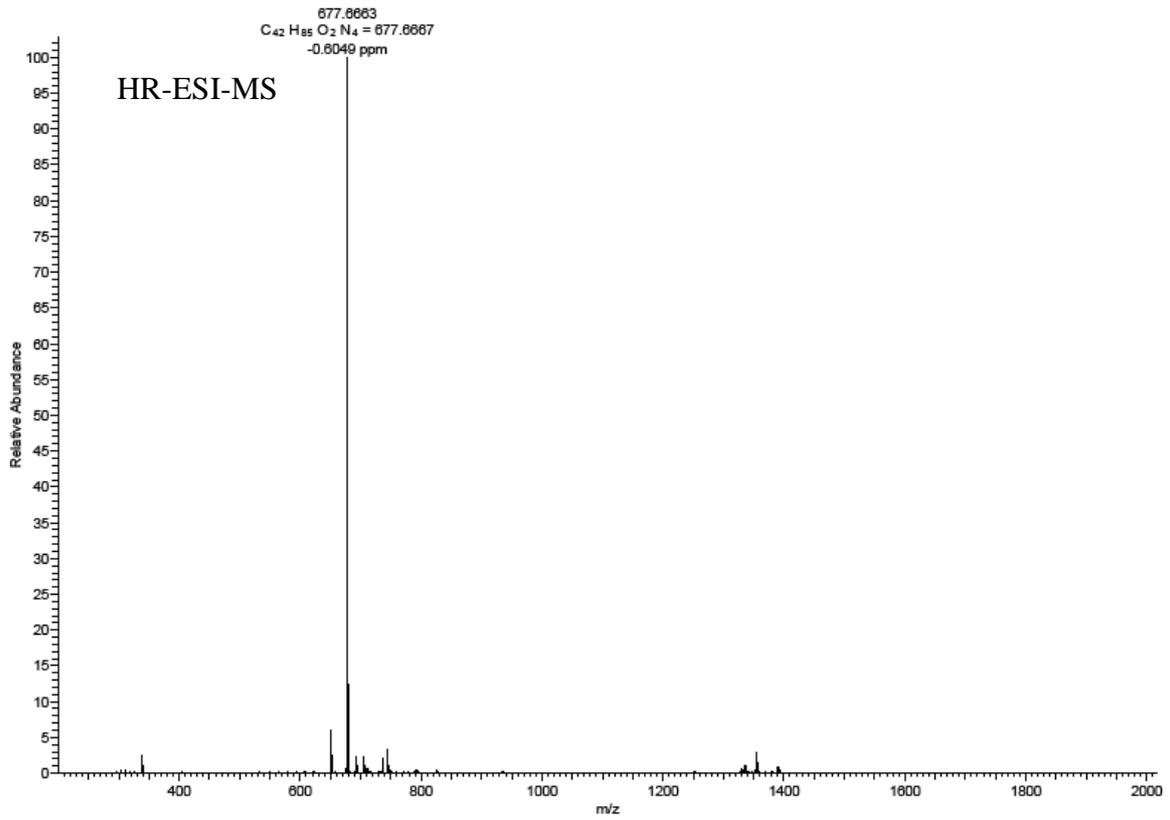
$E_{18u/14Lys}$

ESI-MS



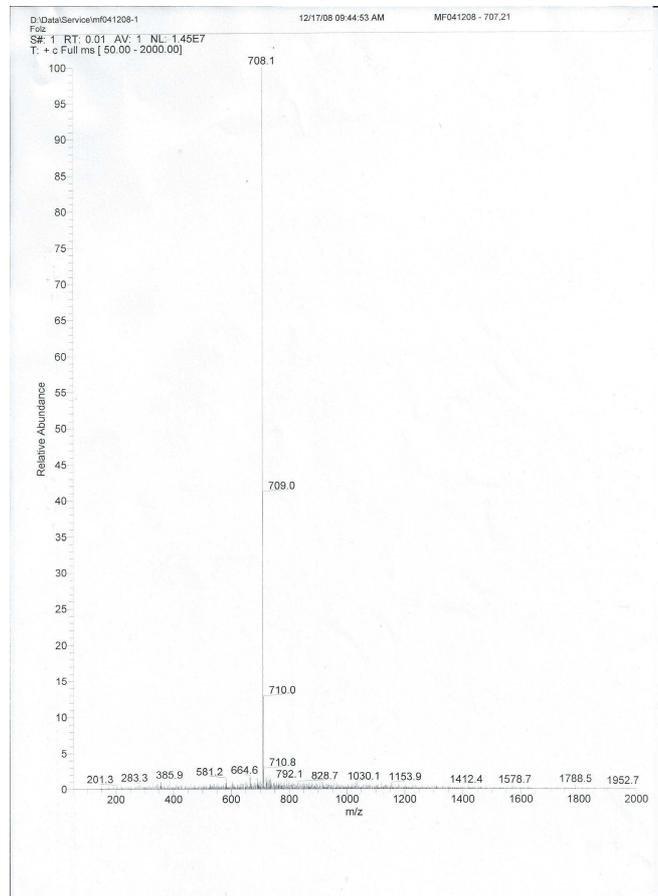
4/1/2010 4:47:08 PM 100401E18u14Lys

E18u14Lys #3-30 RT: 0.02-0.29 AV: 28 NL: 1.54E7
T: FTMS + p NSI Full ms [200.00-2000.00]



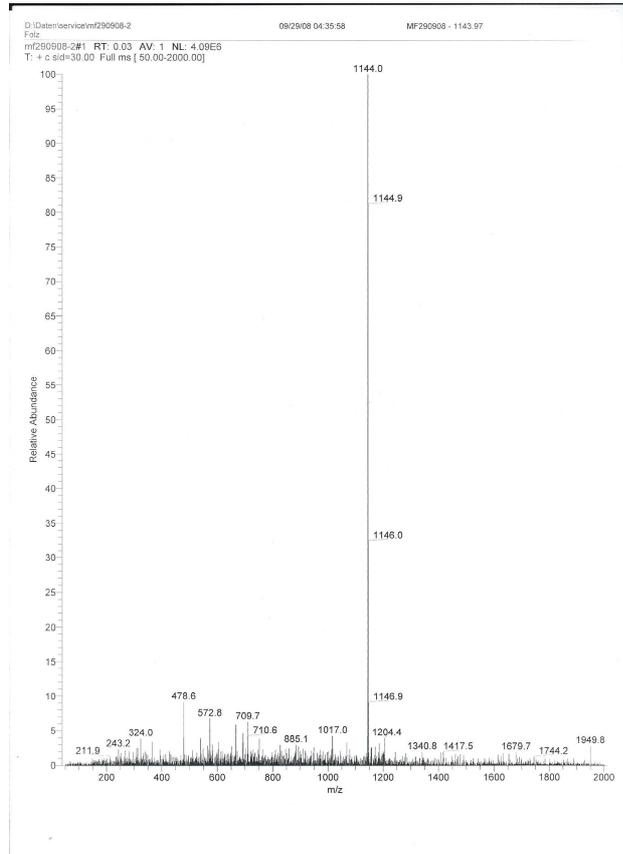
2-Hexadecyloctadecansäure-[4-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminobutyl]amid - 95 P₁₆Lys

ESI-MS



2-Tetradecylhexadecansäure-{2-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl-2-tetradecyl-hexadecanoylaminoethyl]aminoethyl}amid - 98 T₁₄DimerLys

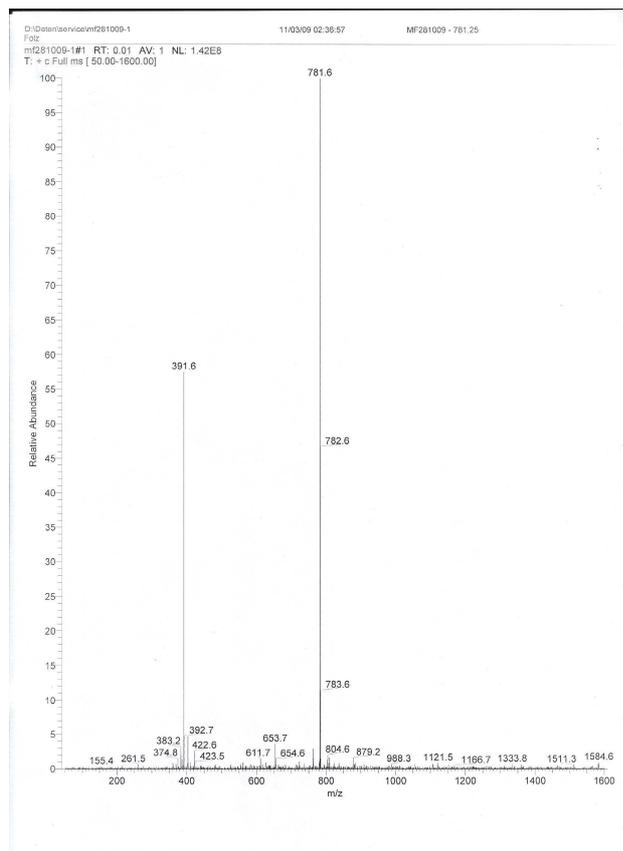
ESI-MS

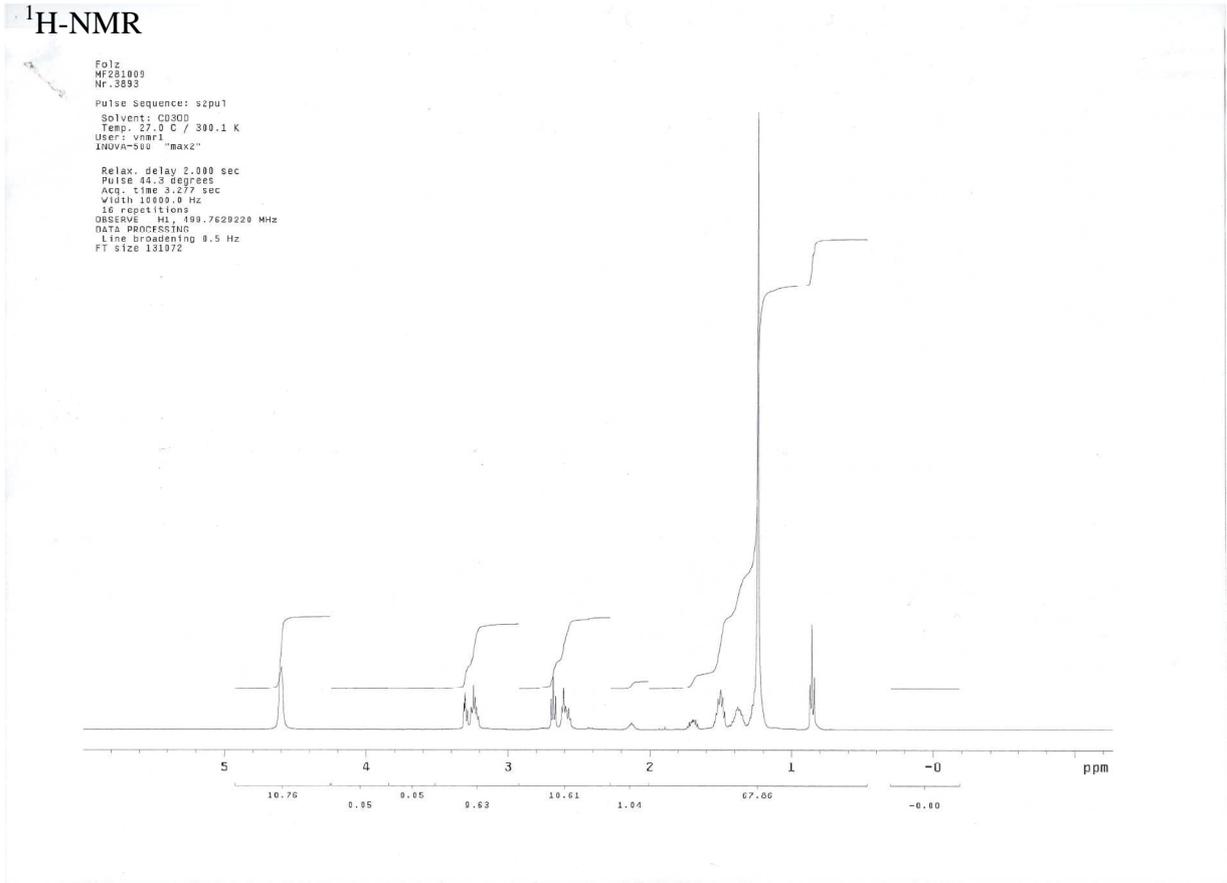


2-Dodecyltetradecansäure-{2-bis[(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]aminoethyl}-amid

(99) T₁₂diLys

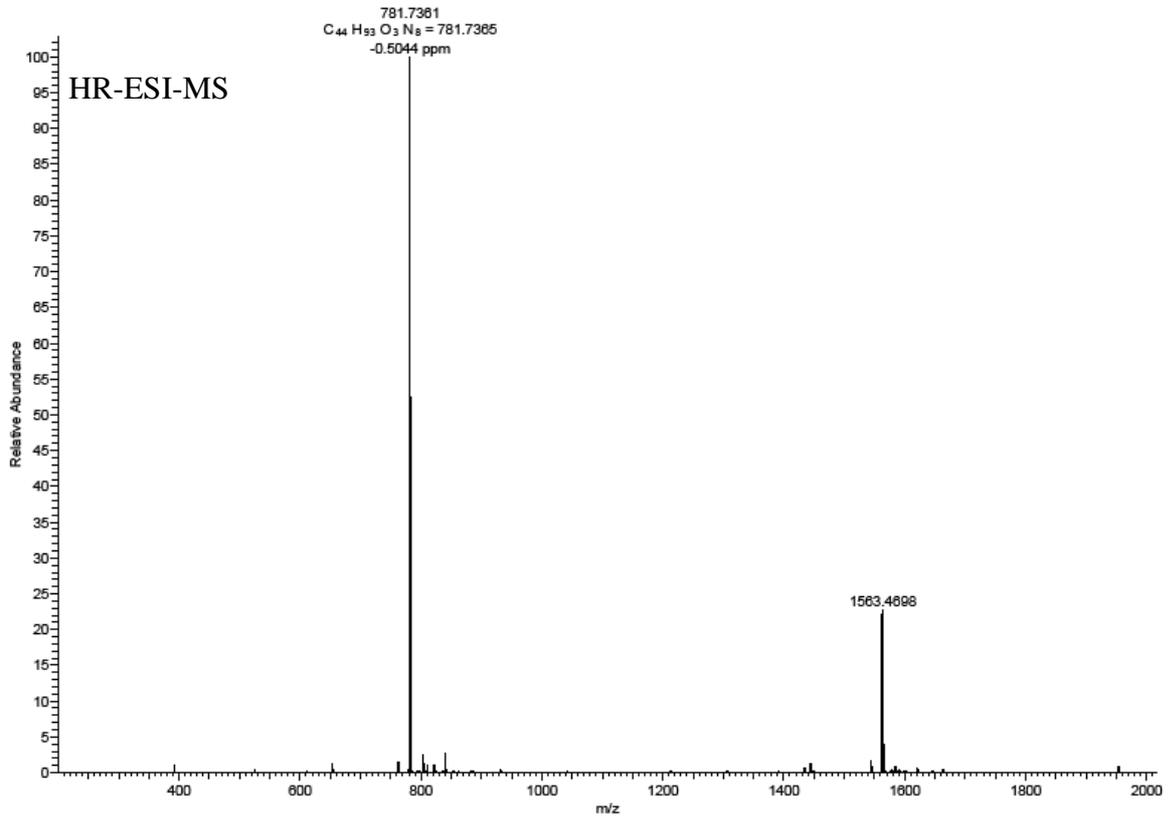
ESI-MS





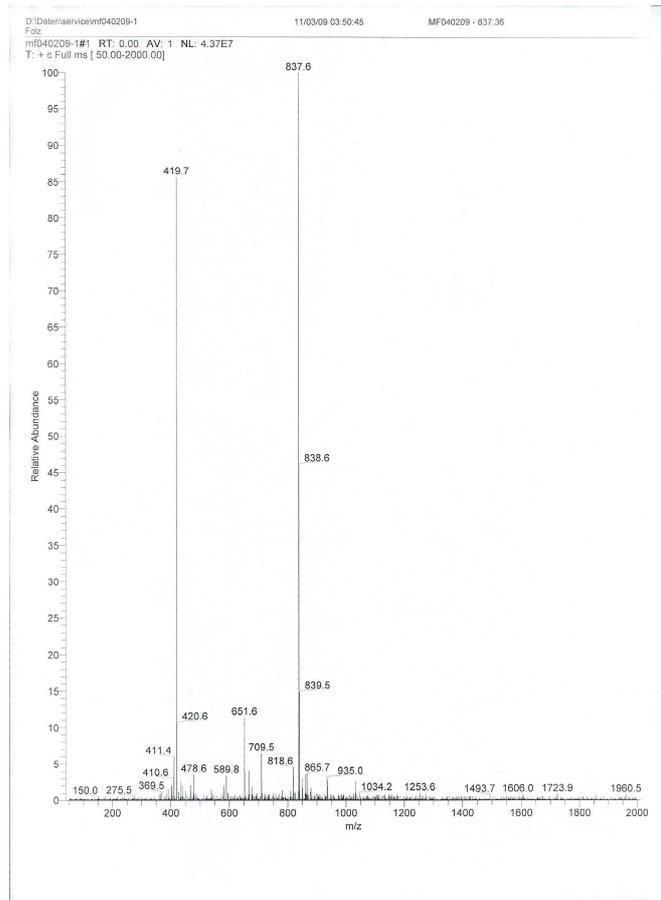
4/7/2010 4:34:34 PM 100401T12dlLys

T12dlLys #3-30 RT: 0.02-0.24 AV: 28 NL: 1.30E8
T: FTMS + p NSI Full ms [200.00-2000.00]



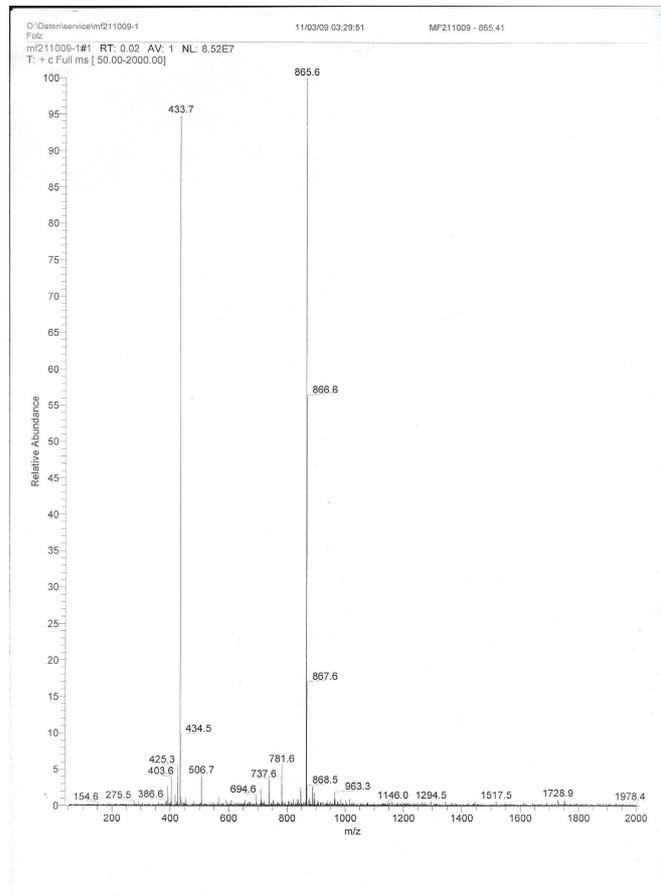
2-Tetradecylhexadecansäure-{2-bis[(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]aminoethyl}-amid - 100 **T₁₄diLys**

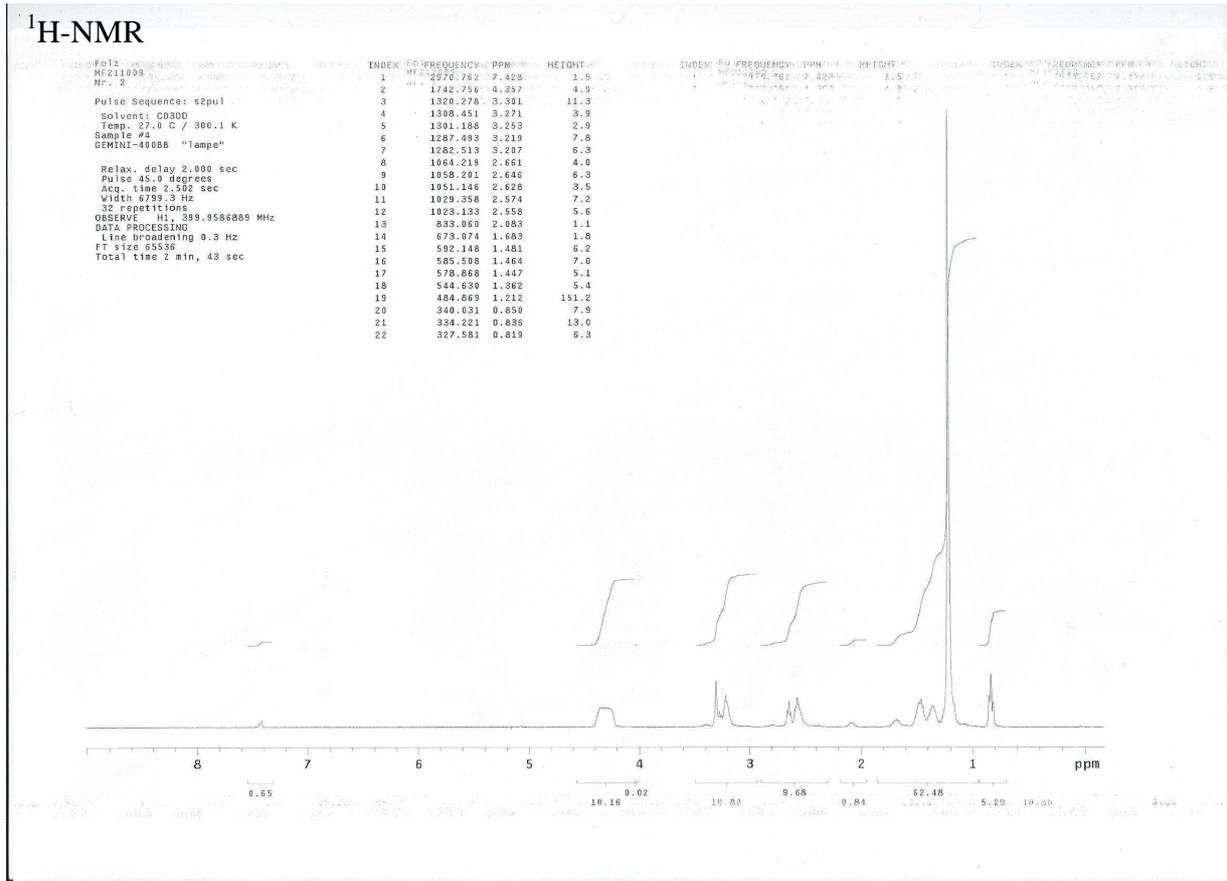
ESI-MS



2-Tetradecyloctadecansäure-{2-bis[(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]aminoethyl}-amid - 101 **T_{14/16}diLys**

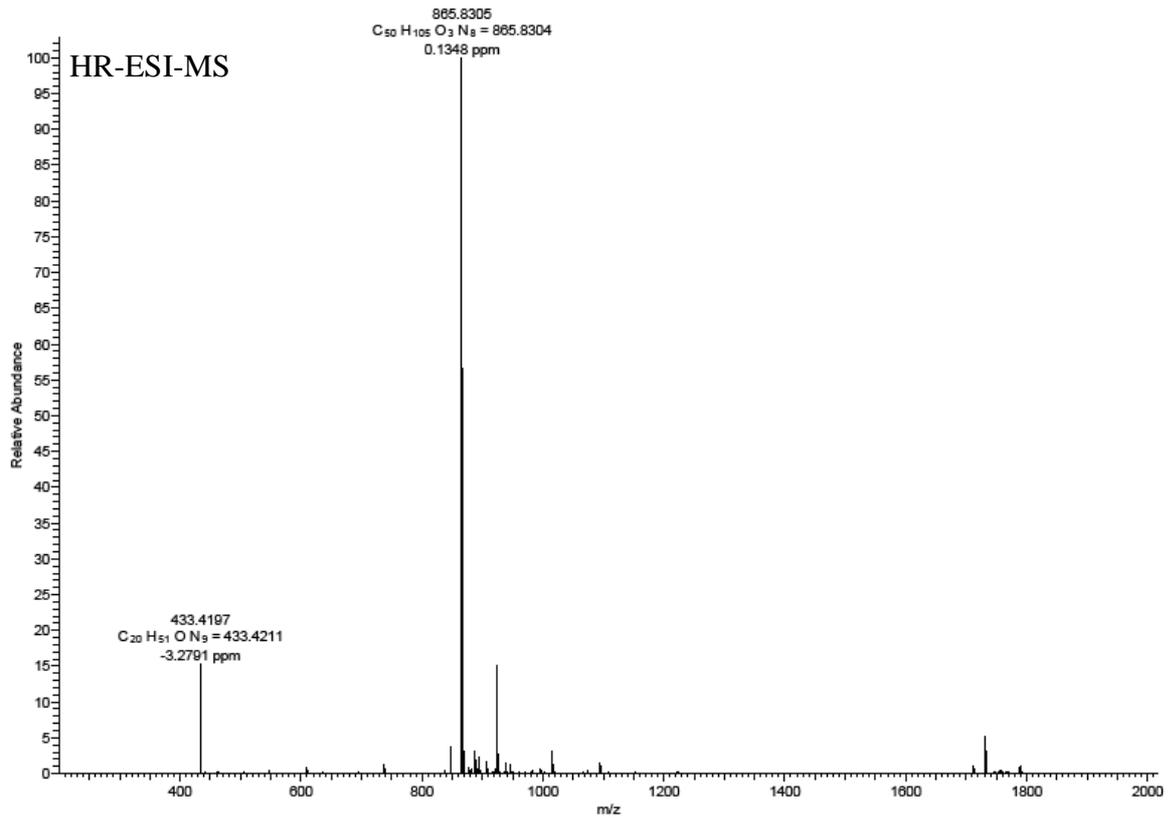
ESI-MS



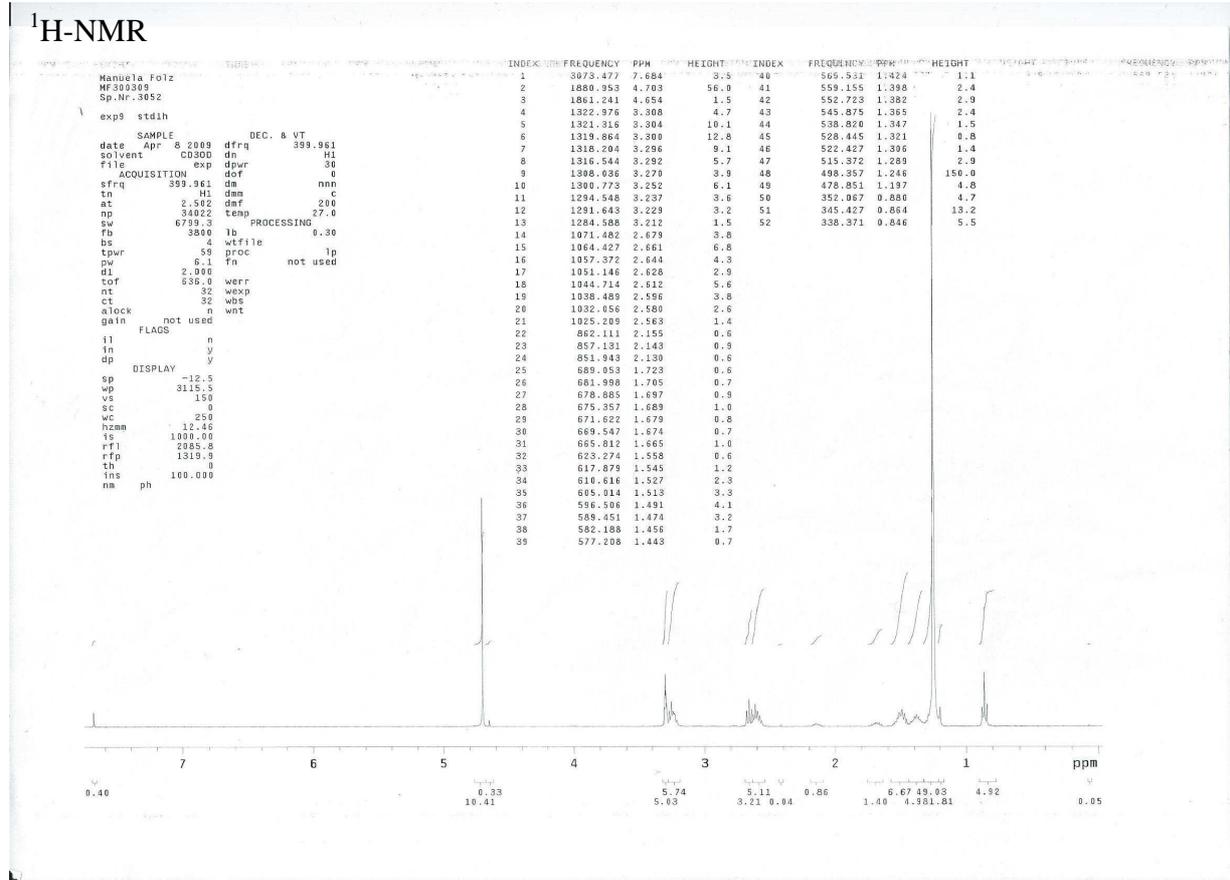


4/1/2010 4:33:15 PM 100401T14_16diLys

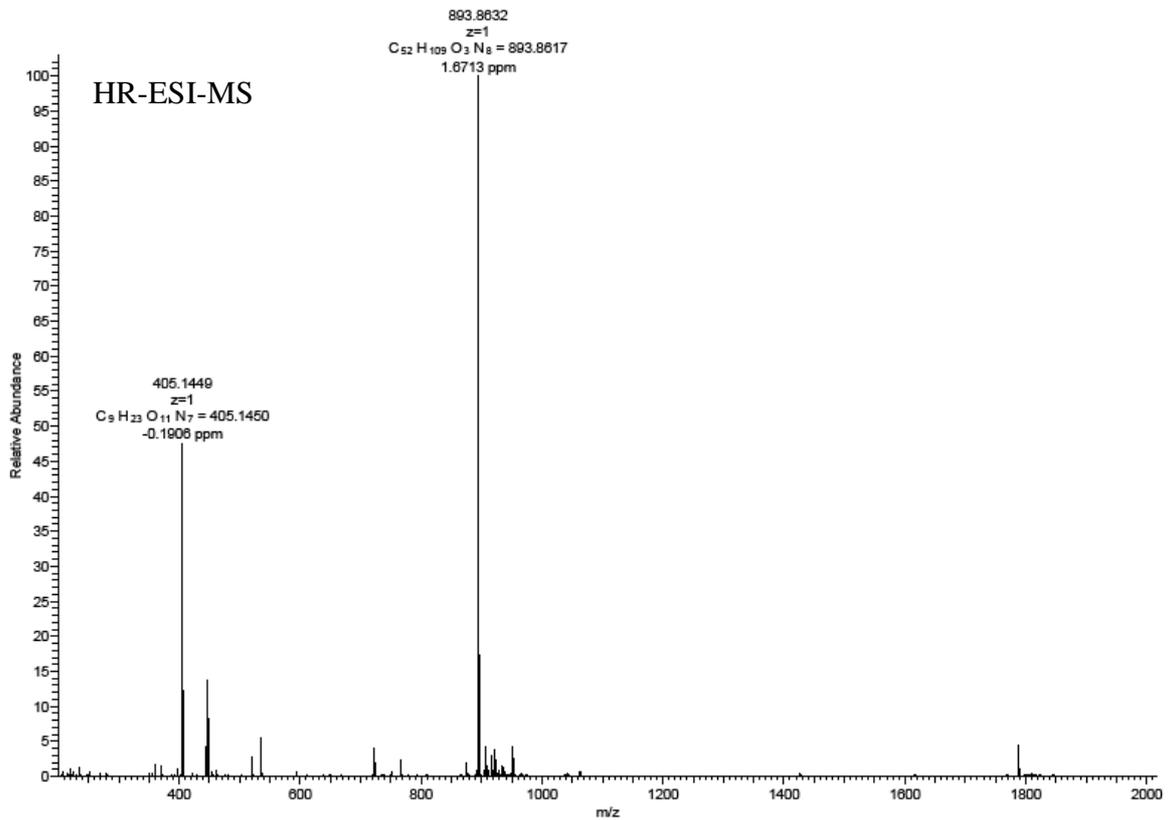
T14_16diLys #3-30 RT: 0.02-0.23 AV: 28 NL: 3.45E8
 T: FTMS + p NSI Full ms [200.00-2000.00]



2-Hexadecyloctadecansäure-{2-bis[(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]aminoethyl}-amid - 102 T₁₆diLys

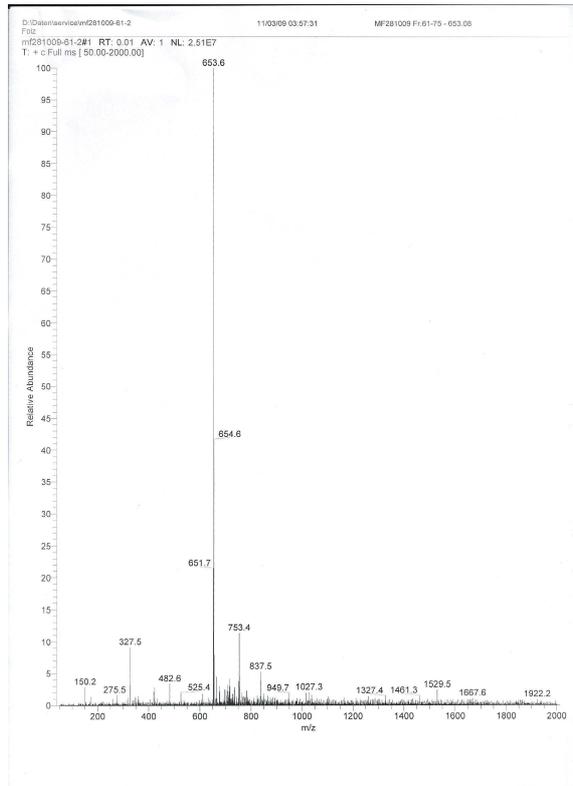


4/1/2010 4:36:01 PM 100401T16diLys

T16diLys #2-30 RT: 0.02-0.33 AV: 29 NL: 1.88E7
T: FTMS + p NSI Full ms [200.00-2000.00]

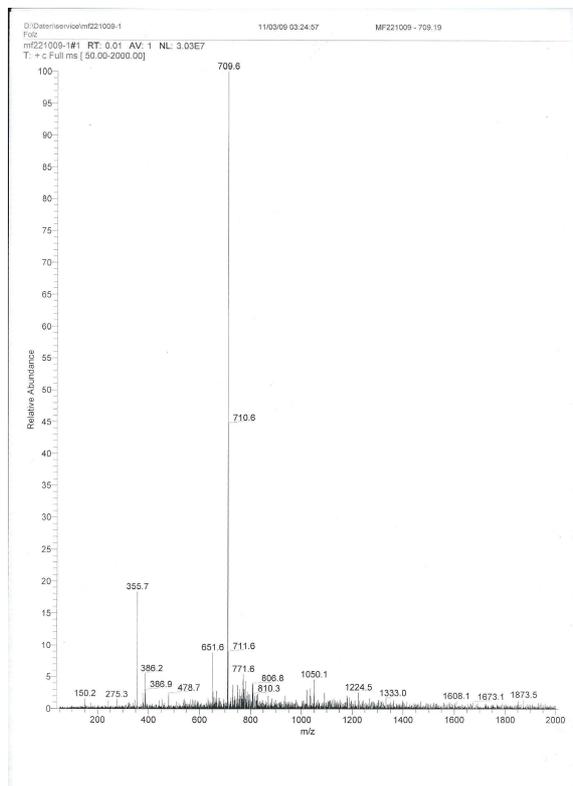
2-Dodecyltetradecansäure-{2-(2-aminoethyl)-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]-aminoethyl}amid - 103 **T₁₂monoLys**

ESI-MS



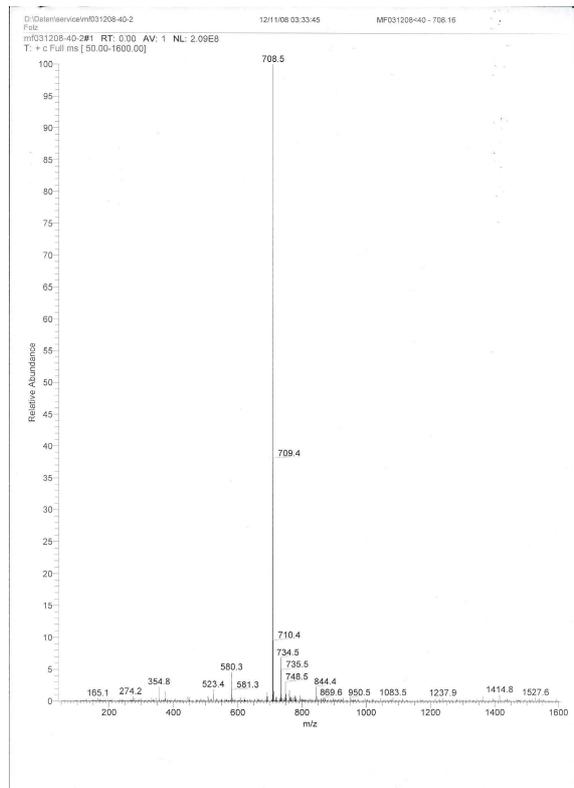
2-Tetradecylhexadecansäure-{2-(2-aminoethyl)-[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]-aminoethyl}amid - 104 **T₁₄monoLys**

ESI-MS



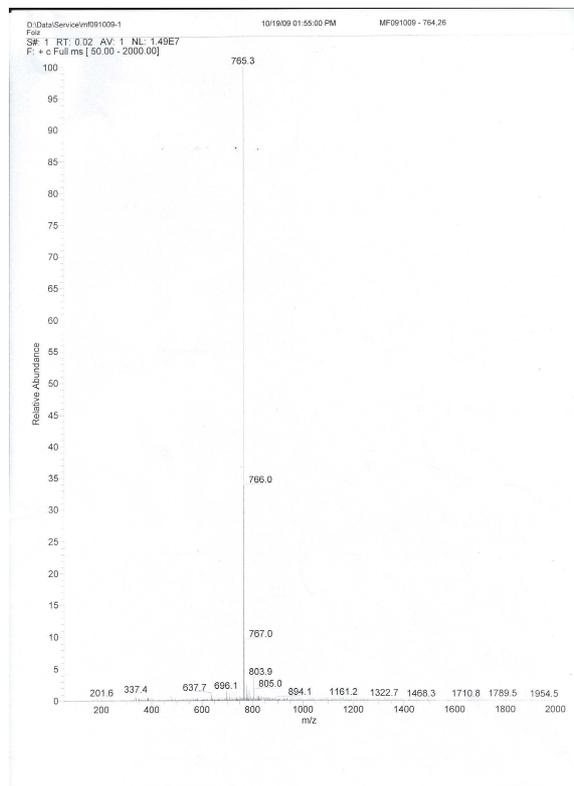
2-Tetradecylhexadecansäure-(4-[[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)amino]-1-oxoethyl]amino-butyl)amid - 107 **P₁₄GlyLys**

ESI-MS



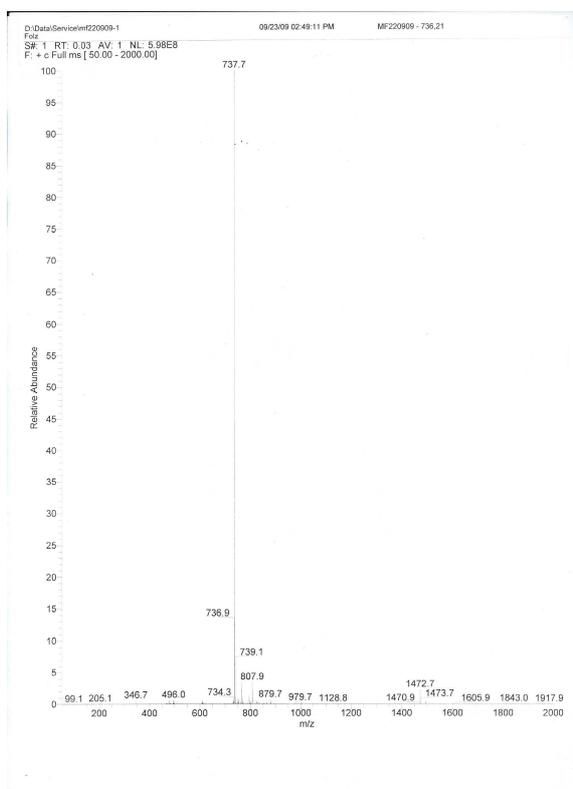
2-Hexadecyloctadecansäure-(4-[[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)amino]-1-oxoethyl]amino-butyl)amid - 108 **P₁₆GlyLys**

ESI-MS



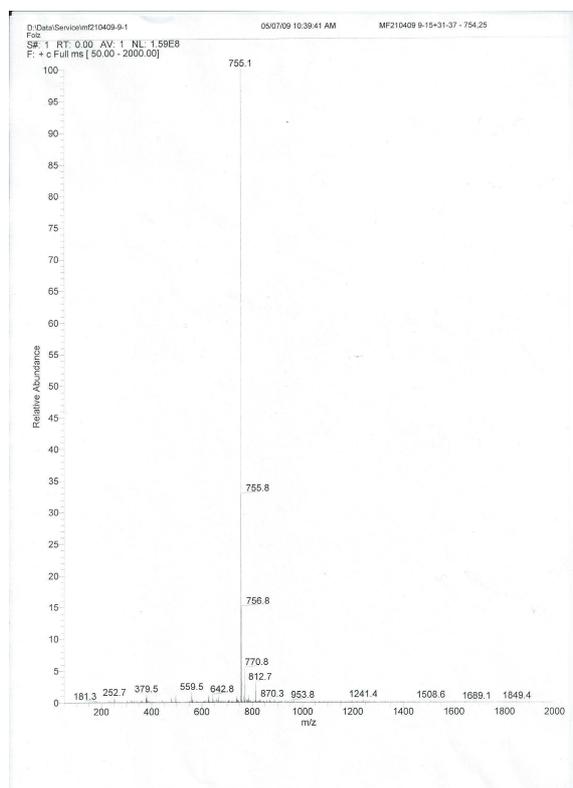
**2-Tetradecylhexadecansäure-(2-[[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)amino]-4-methyl-1-oxopen-
tyl]aminoethyl)amid - 109 E₁₄LeuLys**

ESI-MS



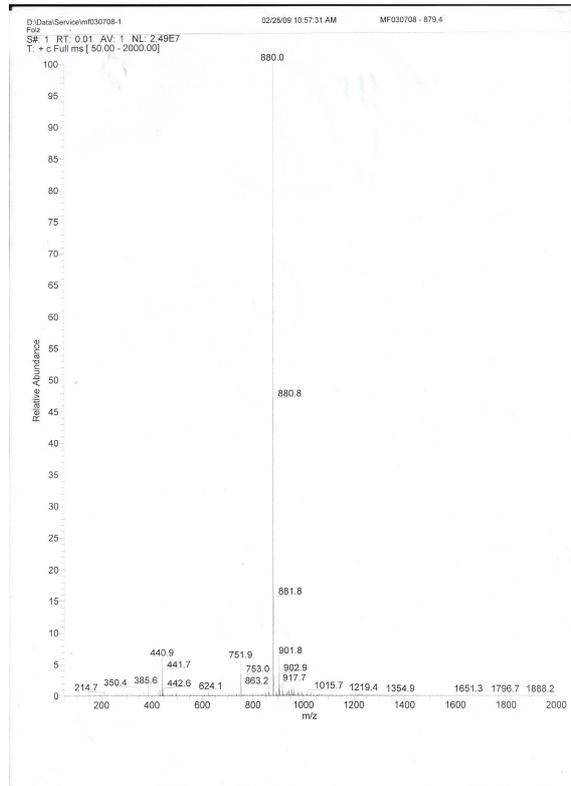
**2-Tetradecylhexadecansäure-(2-[[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)amino]-4-methylthio-1-
oxobutyl]aminoethyl)amid - 110 E₁₄MetLys**

ESI-MS



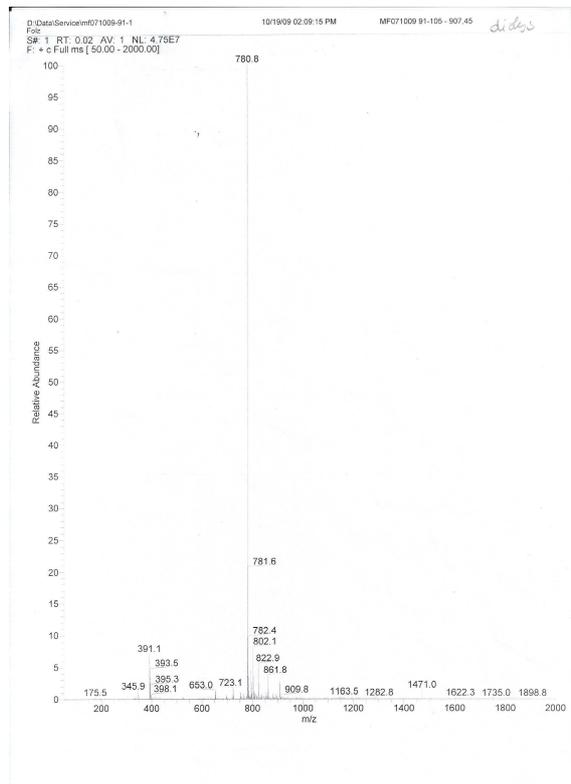
**2-Tetradecylhexadecansäure-(2-{2,6-[bis-(2,6-diamino-1-oxohexyl)]diamino-1-oxohexyl}
aminoethyl)amid - 112 E₁₄trisLys**

ESI-MS



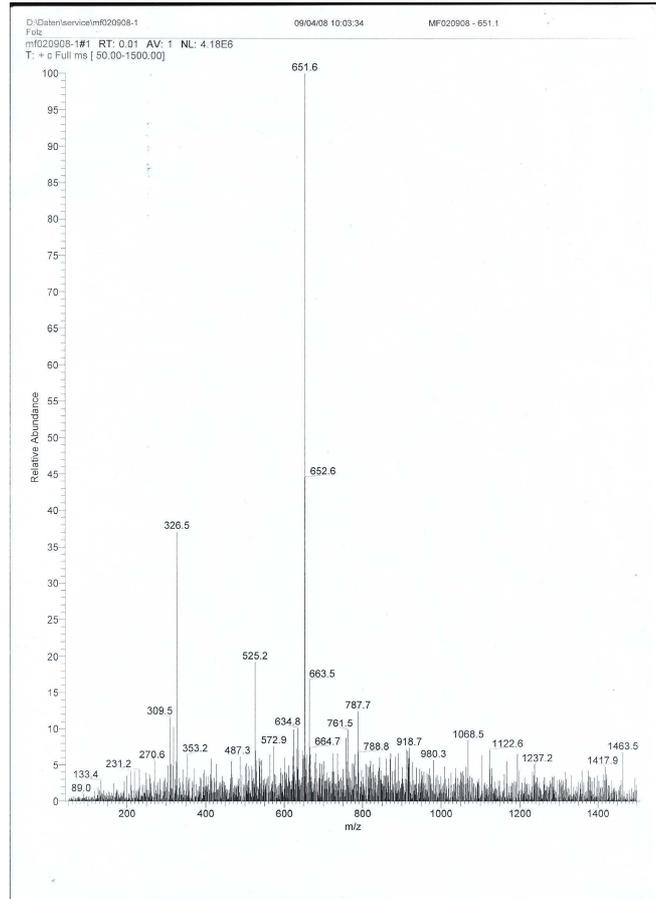
**2-Tetradecylhexadecansäure-(4-{6-[(2,6-diamino-1-oxohexyl)amino]-2-amino-1-oxo-
hexyl}aminobutyl)amid - 116 P₁₄diLys**

ESI-MS



2,7-Ditetradecyloctandisäure-bis-(2-aminoethyl)amid - 126* G₁₄

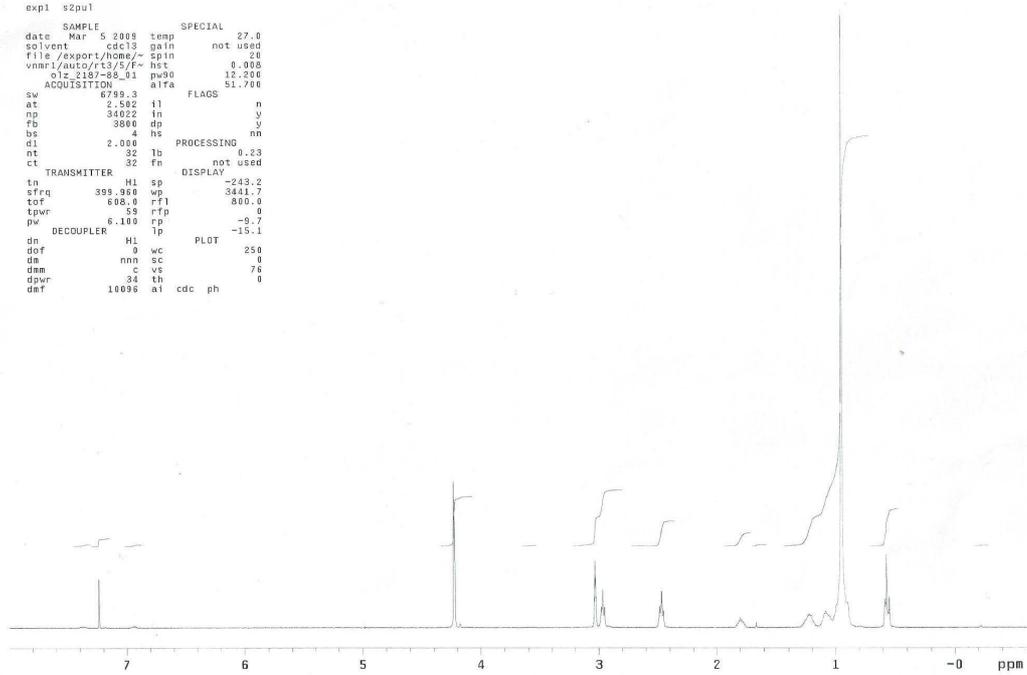
ESI-MS

¹H-NMR

Fo1z_2187-88_MF020908

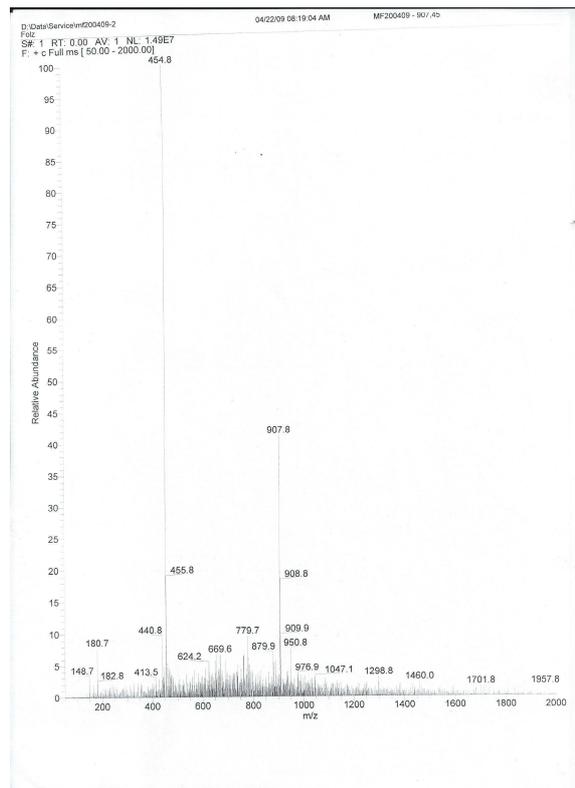
exp1 s2pu1

date	Mar 5 2009	temp	SPECIAL	27.0
solvent	cdc13	gain	not used	
file	/export/home/~	spin	28	
nmr1/autoc/r13/3/f1-		hct	0.005	
olz_2187-88_01		pw90	12.200	
ACQUISITION	alpha		51.700	
sw	6799.3	FLAGS		
at	2.582	ll	n	
np	34022	ln	y	
fb	3800	dp	y	
bs	4	ns	nn	
d1	2.000	hs		
nt	32	fb	0.23	
ct	32	fn	not used	
TRANSMITTER	H1	sp	PROCESSING	
ln			DISPLAY	-243.2
sfrq	399.960	wp	3441.7	
torf	608.0	rfl	800.0	
tpwr	5.9	rfg	0	
pw	6.100	rp	-9.7	
DECOUPLER	H1	tp	PLOT	-15.1
dn				
dof	0	wc	250	
dm	nn0	sc	0	
dmm	c	vs	76	
dpvr	34	th	0	
dpr	10096	at	cdc	ph

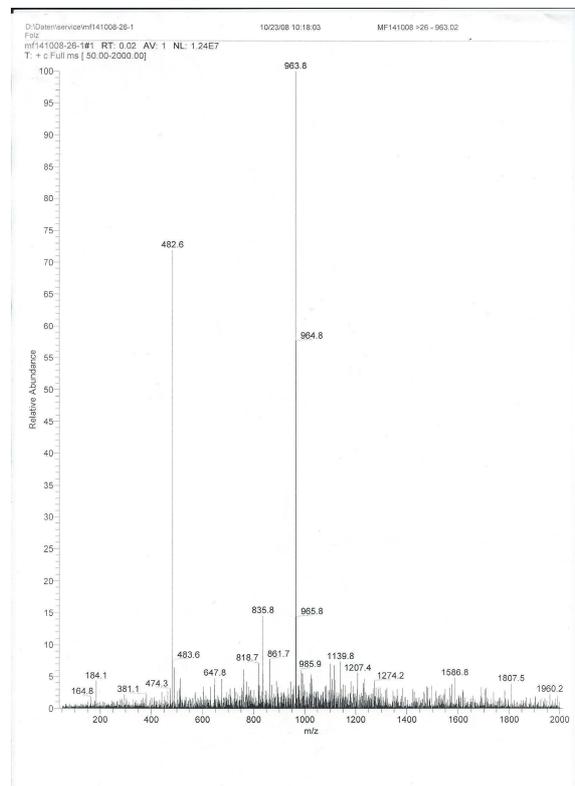


2,7-Ditetradecyloctandisäure-bis-[2,2'-bis-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]amid -**128 G₁₄diLys**

ESI-MS

**2,7-Dihexadecyloctandisäure-bis-[2,2'-bis-(2,6-diamino-1-oxohexyl)aminoethyl]amid -****129 G₁₆diLys**

ESI-MS



Veröffentlichungen

Vorträge und Poster

M. Folz, N. Erdmann, A. Langner and B. Dobner

Synthesis of Novel Cationic Lipids for Use in Liposomal Gene Delivery

DPhG-Tagung - Jena 2009

M. Folz, N. Erdmann, G. Brezesinski, A. Langner and B. Dobner

Synthesis and Cell-Transfection Properties of Novel Cationic Lipids for Use in Liposomal Gene Transfection

DPhG-Tagung - Bonn 2008

M. Folz, I. Schulze, D. Mirska, M. Heinze, G. Brezesinski, A. Langner and B. Dobner

Efficient Synthesis and Cell-Transfection Properties of New Branched Chain Transfection Lipids For Nonviral Gene Transfection

DPhG-Doktorandentagung - Leipzig 2005

Danksagung

Die Arbeiten habe ich in der Zeit von 04/2006 bis 03/2007 und von 01/2008 bis 12/2010 im Institutsbereich Pharmazeutische Chemie und Klinische Pharmazie des Instituts für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg durchgeführt.

Im Folgenden möchte ich mich herzlich bei zahlreichen Personen für ihre Unterstützung bedanken, ohne die diese Dissertation nicht entstanden wäre.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. habil. Bodo Dobner, nicht nur für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit zu einem sehr interessanten Thema sondern ebenfalls dessen freie Gestaltung. Herr Prof. Dobner stand mir stets freundlich und geduldig zur Seite und gab mir zahlreiche theoretische und praktische Hinweise. Die anregenden Diskussionen haben einen großen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Zudem möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. habil. Andreas Langner für die finanzielle Unterstützung und die Überlassung der Doktorandenstelle bedanken.

Mein Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe Biochemische Pharmazie für die freundliche Arbeitsatmosphäre. Frau Nicole Erdmann danke ich dabei besonders für die hervorragende Zusammenarbeit, die Durchführung der Transfektionsuntersuchungen und die vielen anregenden Diskussionen auf der Strecke zwischen Halle und Leipzig. Bei Herrn Dr. Simon Drescher möchte ich mich ganz besonders für seine zahlreichen, intensiven Bemühungen bei der Fertigstellung der Dissertation bedanken und Herrn Wölk danke ich zudem für die zum Teil durchgeführte Probenvorbereitung.

Mein spezieller Dank gilt Frau Christa Troitzsch für ihre tatkräftige Unterstützung im gemeinsamen Labor und die vielen liebevollen Ratschläge in jeglichen Lebenssituationen.

Herrn Dr. Gerald Brezesinski und Herrn Chris Brauer sowie Herrn Dr. Matthias Diettrich vom Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung in Golm danke ich für die physiochemischen Untersuchungen der synthetisierten Lipide.

Weiterhin danke ich Frau Woigk und Frau Leissing für die schnelle und sorgfältige Anfertigung der Massenspektren, Frau Brandt für die Durchführung der Elementaranalysen,

Herrn Dr. Ihling aus der AG von Frau Prof. Dr. habil A. Sinz für die erstellten Massenspektrometriedaten sowie Herrn Dr. Ströhl und Mitarbeitern für die Erstellung der unzähligen NMR-Spektren.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. habil Peter Imming möchte ich für die häufige Bereitstellung des MPLC-Gerätes, sowie für die stets herzliche Atmosphäre während meiner Tätigkeiten daran danken.

Für seine herzliche Art und die vielen Anregungen möchte ich tief bewegt von seinem plötzlichen Tod posthum Herrn Dr. Olaf Zschörnig der Medizinischen Fakultät Leipzig danken.

Von Herzen danke ich schließlich meiner lieben Familie, vor allem meiner Mutti Frau Kristina Folz, die mich in jeder Lebenslage intensiv unterstützt und mir fortwährend Mut gemacht hat und die, ebenso wie meine Schwiegermutter Frau Marion Zankl, durch die Betreuung meiner kleinen Söhne Lukas Alexander und Noah die Dissertation in diesem Umfang erst ermöglicht hat. Besonders jedoch gilt meinem lieben Mann Herrn Hans Müller-Folz Dank für die liebevolle Hilfe in jeglichen Lebensumständen und die viele aufgebrauchte Geduld und meinen kleinen Söhnen Lukas und Noah für jedes aufmunternde Lächeln und jede liebevolle Umarmung!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ich versichere, dass ich diese Dissertation bisher an keiner anderen Universität oder Hochschule im In- und Ausland vorgelegt habe.

Halle/Saale im Oktober 2012

Manuela Folz

Lebenslauf

Persönliches

Name	Manuela Folz (Dipl. Pharm.)
Geburtsdatum, Geburtsort	20. August 1981 in Leipzig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet, 2 Kinder (Lukas Alexander, geboren am 09.05.2007 und Noah, geboren am 23.09.2010)
Wohnsitz	Ploßstr. 42, 04347 Leipzig

postgraduale Ausbildung

seit 03/2012	Filialleiterin der Scheffel-Apotheke in Leipzig in Elternzeitvertretung
10/2011 – 02/2012	Apothekerin in der Scheffel-Apotheke in Leipzig
04/2006 – 12/2010	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg (Promotionsstudium), Fachbereich Pharmazie, Institut für Pharmazeutische Chemie (04/2007-12/2007 und 08/2010-09/2011 Unterbrechung der Promotion durch Mutterschutz und Elternzeit)
01/2006 – 06/2006	Apothekerin in der Phönix-Apotheke Leipzig
10/2005 – 12/2005	Pharmazeutin in der Phönix-Apotheke Leipzig
10/2004 – 03/2005	Diplomarbeit zur Erlangung des akademischen Grades: Diplompharmazeut (Dipl. Pharm.) Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, Fachbereich Pharmazie, Institut für Pharmazeutische Chemie „Beiträge zur Synthese und Charakterisierung von Transfektionslipiden“

Lehrtätigkeit

2006 – 2010	Praktikumsbetreuung im Grundstudium der Pharmazie „Chemie der organischen Arznei-, Hilfs- und Schadstoffe“
-------------	---

Studium und praktische Ausbildung

12/2005	Approbation als Apothekerin
11/2005	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
04/2005 – 09/2005	Praktische Ausbildung im Rahmen des Dritten Abschnitts Phönix-Apotheke Leipzig
09/2004	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
08/2002	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
10/2000 – 10/2004	Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität, Halle- Wittenberg

Schulbildung

08/1992 – 07/2000	Abitur F.A.-Brockhaus-Gymnasium in Leipzig mathematisch-naturwissenschaftliches Profil
09/1988 – 07/1992	„Rudolf-Hartig“-Oberschule in Leipzig

Halle (Saale) im Oktober 2012