

Synthese und Charakterisierung von Polyplexmizellen basierend auf biokompatiblen Blockkationomeren für eine effiziente Gentransfektion

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Technische Universität Dortmund
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie
Arbeitsgruppe Polymere Hybridsysteme

Vorgelegt von

Irene Pretzer

aus Lissakowsk

Dortmund, 2019

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2015 bis Juli 2019 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ralf Weberskirch an der Fakultät Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund erstellt.

.....

.....

Gutachter: Prof. Dr. Ralf Weberskirch

Gutachter: Prof. Dr. Jörg Tiller

Eingereicht am 10.07.2019

Danksagungen

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herr *Prof. Dr. Ralf Weberskirch* für seine wissenschaftliche und methodische Unterstützung während meiner Dissertation. Ich danke herzlich für das interdisziplinäre Forschungsthema, was mich immer begeistert hat, sowie für die hilfreichen Gespräche auf fachlicher und persönlicher Ebene.

Herrn *Prof. Dr. Jörg Tiller* möchte ich herzlich für die freundliche Übernahme des Koreferats danken.

Außerdem gilt mein Dank *Dr. Gustavo Rivera*, der mich durch zielführende Diskussionen und anhaltende Hilfestellung begleitet und unterstützt hatte. Ich habe unsere Dialoge stets als Ermutigung und Motivation empfunden.

Den Arbeitskreisen von *Prof. Dr. Jörg Tiller*, *Prof. Dr. Heinz Rehage*, *Prof. Dr. Daniel Rauh*, *Prof. Dr. Daniel Summerer* und *PD Dr. Leif Dehmelt* danke ich für die Bereitstellung der analytischen Geräte und das mir entgegenbrachte Vertrauen. Ohne diese großzügige Unterstützung wäre die vorliegende Arbeit so nicht möglich gewesen. An dieser Stelle möchte ich meinen Großen Dank an *Jörn Weisner*, *Dominic Kamps*, *Jan Wolffgramm*, *Anna Witte*, *Björn Holzapfel*, *Lena Richter*, *Dr. Montasser Hijazi* und *Dr. Martin Schmidt* aussprechen, die mich in ihren Arbeitskreisen mehr als freundlich empfangen und unterstützt haben. Das habe ich nie als selbstverständlich angesehen und für diese Kollegialität bin ich sehr dankbar.

Weiter bedanke ich mich bei *Frau Monika Meuris*, *Herrn Volker Brandt* für die Messung der TEM-Aufnahmen und *Frau Iris Henkel* für die Messung der ICP-Proben. In diesem Zusammenhang gebührt mein Dank *Prof. Dr. Wolf Hiller* und der NMR-Abteilung für die Messung der zahlreichen Proben.

Ich möchte den Mitarbeitern der Fakultät Chemie und Chemische Biologie, insbesondere *Frau Katja Weber*, *Herrn Andreas Hammer*, *Frau Andrea Bockelmann*, *Frau Dr. Alexandra Behler* und *Frau Heidi Auer* für ihre freundliche Hilfsbereitschaft und die angenehme Zusammenarbeit danken. Vor allem möchte ich an dieser Stelle *Frau Silvia Lessing* und

Frau *Dr. Ljuba Iovkova* für ihre tatkräftige Unterstützung bei allen möglichen Aufgabenstellungen und Problemen danken.

Ebenso danke ich meinen zahlreichen Praktikanten, Bachelor und Master-Studenten, die ich während meiner Promotion betreuen durfte. Dabei möchte ich vor allem *Yannik Olszowy* und *David Bushiri* danken. Besonders wertvoll war für mich die Betreuung von *Moritz Brückner* während seiner Ausbildung zum Chemie-Laboranten, der mich tatkräftig und äußerst fleißig im Labor unterstützt und begleitet hat. Herzlichen Dank.

Mein Dank gilt auch allen Mitgliedern des Arbeitskreises für die freundschaftliche Atmosphäre und die anregende Zeit beim gemeinsamen Mittagessen. Mein großer Dank gebührt vor allem *Dr. Anne-Larissa Kampmann*, *Dr. Henning Sand*, *Hanne Petersen*, *David Pelzer*, *Michael Luksin* und *Dr. Andrea Ernst*, mit denen gute Zusammenarbeit und überragender Zusammenhalt zu einer langjährigen und tiefen Freundschaft wurde. Besonders wertvoll waren für mich die ehrlichen und offenen Gespräche, die mich immer wenn nötig geerdet haben. Ich konnte immer auf euren Beistand zählen, nicht nur in einem Motivationstief, sondern auch auf zahlreichen Konferenzen, Umzügen und Partys. Für diese besondere Freundschaft und die unvergesslich tolle Zeit nicht nur im Labor, sondern auch außerhalb und bis jetzt bin ich euch sehr dankbar.

Das gilt natürlich auch für meine langjährigen Schulfreunde, *Tanja Sothilingham*, *Bryony Muir*, *Anna-Lena Koch*, *Stefanie Held* und *Desiree Schomann*, die mein Klagen ertragen haben und mich wieder aufgebaut haben, wenn es nötig war. Danke für euer offenes Ohr, die tolle gemeinsame Zeit und die gelungene Abwechslung außerhalb des Labors.

Tief verbunden und dankbar bin ich meiner Familie, *Peter*, *Helene* und *Swetlana Pretzer* und meinem Verlobten *Alexander Schmer* für die unermüdliche Stärkung, Motivierung und Geduld, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre. Danke für euer liebevolles Verständnis, den Trost und die uneingeschränkte Liebe in dieser teils beschwerlichen Zeit. Insbesondere gebührt mein Dank *Alexander Schmer* für seine mehrfachen Korrekturen, kritischen und wissenschaftlichen Anmerkungen, sowie seine hilfreichen Ratschläge zur Verbesserung dieser Arbeit. Dein Halt und deine Liebe haben mir Kraft und Mut zur Anfertigung und Vollendung meiner Dissertation gegeben.

Kurzfassung

Zur erfolgreichen Weiterentwicklung der Gentherapie besteht ein hoher Forschungsbedarf insbesondere bei der Entwicklung effizienter und sicherer nicht-viraler Genvektoren. Die größte Herausforderung ist es eine hohe Gentransfereffizienz neben gleichzeitiger minimaler Zytotoxizität zu erzielen. In diesem Zusammenhang haben kationische Polymere auf Basis von biokompatiblen Poly(2-oxazolin) (POx) und dem bioabbaubaren Poly(aspartamid) (PAsp), welches mit einer Diethylentriamin (DET)-Seitenkette modifiziert vorliegt, ein großes Potential. Blockkationere mit einer 1,2-Diaminoethan-Seitenkette komplexieren die DNA effizient im Kern und haben eine geringere Toxizität als der Goldstandard 25 kDA Poly(ethylenimin) (bPEI). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Polymerarchitektur auf die Eigenschaften des gebildeten Polymer/pDNA-Komplexes untersucht, indem Blockkationere mit verschiedenen Blocklängen und Molmassen synthetisiert und vollständig *via* NMR-Spektroskopie, GCP- und IR-Analysen charakterisiert wurden. Die gebildeten Polyplexmizellen, mit einem Durchmesser von ca. 70 nm, waren stabil in wässriger und isotonischer Lösung. Die Polyplexmizellen sind aufgrund einer Schale-Kern-Mizellenstruktur mit einer neutralen POx-Hülle biokompatibel. Um die Gentransfereffizienz zu verbessern wurde ein reduktiv-spaltbarer Disulfid-Linker in die Polymerstruktur eingeführt. Durch die abspaltbare POx-Hülle wurde die Gentransfereffizienz gesteigert, da dadurch eine höhere Wechselwirkung mit der Zellmembran und damit ein effizienterer endosomaler Austritt erreicht wurden. Es wurde ein weiterer Ansatz für die Steigerung der Gentransportaktivität verfolgt, indem Biotin, als aktiver Ligand für die spezifische Zellaufnahme in die Polymerstruktur eingeführt wurde. Durch die Rezeptor-vermittelte Aufnahme wurde die Gentransfereffizienz bei gleichbleibender Zytokompatibilität maßgeblich erhöht.

Abstract

The synthesis of biocompatible synthetic cationic polymers (polyplexes) for *in vivo* nonviral gene therapy is one of the most important challenges in polymer science and biomedicine. A promising approach in this regard is the use of poly(2-oxazoline) (POx) based block cationic polymers, which form a biocompatible core-shell polyplex micelle. In this study PMOx/PETox was combined with the biocleavable peptide block poly(aspartic acid) (PAsp) and finally modified by diethylenetriamine (DET) at the side chain of the polymer. Block cationic polymers bearing a 1,2-diaminoethane side chain show, in comparison to commonly used polymers like 25 kDa branched poly(ethylenimine) (bPEI), a higher efficiency and less toxicity in gene transfection. We synthesized block cationic polymers with different chain lengths and molar masses with focus on the polymer architecture and the desired polymers were characterized by $^1\text{H-NMR}$, SEC and FT-IR. The block cationic polymers showed an efficient complexation with pDNA, and the resulted polyplex micelles were stable in an aqueous and isotonic medium with a narrowly distributed diameter of ~ 70 nm and a zeta potential of ~ 4 mV due to the formation of hydrophilic PETox/PMOx palisades. Enhancing gene transfection efficiency one promising approach is the use of a cleavable PETox shell because of deshielding in intracellular reducing environment. Therefore, a novel block cationic polymer was designed by introducing a cleavable disulfide linkage between PETox and polycation segment P[Asp(DET)]. These micelles showed a higher gene transfection efficiency in HEK293 cells as a result of higher cell uptake and efficient endosomal escape. Another successful approach to enhance the gene transfer efficiency without increasing the cytotoxicity, is the introduction of biotin to the block cationic polymer structure as an active targeting ligand. Transfection with biotin-modified micelles led to a significant higher number of fluorescent HEK293 cells due to receptor-mediated endocytosis.

Inhaltsverzeichnis

1	Motivation.....	- 1 -
2	Einleitung	- 2 -
2.1	Einführung in den Gentransport	- 3 -
2.2	Vektoren für den Transport von DNA	- 5 -
2.3	Virale Vektoren für den Gentransport	- 6 -
2.4	Entwicklung nicht-viraler Vektoren für den Transport von DNA	- 8 -
2.4.1	Poly(ethylenimin) (PEI).....	- 16 -
2.4.2	Lösung für das <i>charge dilemma</i> – Abschirmung mit Stealth-Polymeren.....	- 17 -
2.4.3	Stimuliresponsive Polymere mit einem spaltbaren Disulfid-Linker	- 24 -
2.4.4	Zellspezifisches Targeting – aktiver und passiver Gentransport.....	- 25 -
2.4.5	Endosomalen Austritt effizienter gestalten – Poly(aspartat) (PAsp)	- 28 -
2.5	Klinische Studien	- 30 -
3	Aufgabenstellung und Zielsetzung	- 32 -
4	Biokompatible PMOx- <i>b</i> -P[Asp(DET)] Blockkatiomere für den Gentransport	- 36 -
4.1	Einleitung	- 36 -
4.2	Zielsetzung	- 37 -
4.3	Ergebnisse und Diskussion	- 39 -
4.3.1	Synthese und Charakterisierung der Blockkatiomere PMOx- <i>b</i> -P[Asp(DET)]	- 39 -
4.3.2	Bildung und Charakterisierung der Polyplexmizellen aus den Blockkatiomeren P1-P4.....	- 49 -
4.4	Zusammenfassung	- 65 -
4.5	Experimentelles.....	- 67 -
4.5.1	Synthesevorschriften der Blockkatiomere P1-P4.....	- 67 -
5	Reduktiv-spaltbares PEtOx _n -SS-P[Asp(DET)] _m Blockkatiomer für den Gentransport.....	- 75 -
5.1	Einleitung	- 75 -
5.2	Zielsetzung	- 78 -
5.3	Ergebnisse und Diskussion	- 80 -
5.3.1	Synthese und Charakterisierung reduktiv-spaltbarer PEtOx-SS-P[Asp(DET)] Blockkatiomere mit einem Disulfid-Linker.....	- 80 -
5.3.2	Bildung und Charakterisierung der Polyplexmizellen mit einer reduktiv-spaltbaren PEtOx-Schale	- 90 -
5.4	Zusammenfassung	- 120 -
5.5	Experimentelles.....	- 122 -
5.5.1	Synthesevorschriften der Blockkatiomere.....	- 122 -
6	Biotin-modifiziertes PEtOx _n - <i>b</i> -P[Asp(DET)] _m Blockkatiomer für den aktiven Gentransport.....	- 131 -
6.1	Einleitung	- 131 -

6.2	Zielsetzung	- 134 -
6.3	Ergebnisse und Diskussion	- 136 -
6.3.1	Synthese und Charakterisierung Biotin-modifizierter PEOx- <i>b</i> -P[Asp(DET)] Blockkatiomere für den aktiven Gentransport	- 136 -
6.3.2	Bildung und Charakterisierung von Polyplexmizellen mit einer Biotin-modifizierten PEOx-Schale für eine rezeptorvermittelte Zellaufnahme.....	- 154 -
6.4	Zusammenfassung	- 174 -
6.5	Experimentelles	- 177 -
6.5.1	Synthesevorschrift des Biotin-Azid-Derivats.....	- 177 -
6.5.2	Synthesevorschriften der Blockkatiomere.....	- 180 -
7	Zusammenfassung und Ausblick.....	- 189 -
8	Allgemeiner experimenteller Teil	- 203 -
8.1	Vorschriften zur Charakterisierung der Polyplexmizellen	- 203 -
8.2	Allgemeine Arbeitstechniken und verwendete Geräte	- 210 -
9	Literaturverzeichnis	- 215 -
10	Anhang	I
10.1	Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	I
10.2	Abbildungsverzeichnis	VI
10.3	Schemataverzeichnis.....	XV
10.4	Tabellenverzeichnis.....	XVI
10.5	NMR-Spektren.....	XVII
10.6	Eidesstaatliche Versicherung (Affidavit).....	XLI

1 Motivation

Viele Krankheiten, wie Krebserkrankungen, monogenetische Erbkrankheiten (Bluterkrankheit, Mukoviszidose) und Infektionskrankheiten (HIV/AIDS) entstehen aufgrund von defekten Genen in der DNA. Die heutigen therapeutischen Ansätze unterdrücken lediglich die Symptome solcher Krankheiten anstatt sie an ihrem Entstehungspunkt zu heilen. Hierfür müsste mithilfe der so genannten Gentherapie ein Gen in die Zelle transportiert werden mit dem Ziel, die Produktion benötigter Proteine zu ermöglichen bzw. die Produktion unerwünschter Proteine zu unterbinden und folglich einen therapeutischen Nutzen zu erzielen.^[1] Den ersten Baustein für die Gentherapie legten Avery et al.^[2] im Jahr 1944. Sie erkannten anhand von virulenten Pneumokokken, dass Desoxyribonukleinsäure (DNA) genetische Informationen übermittelt. Seitdem stieg das Interesse an der Gentherapie stark an. Die ersten klinischen Studien in den 90er Jahren demonstrierten den Erfolg der Gentherapie. Forscher erkannten die wesentlichen Hürden für einen erfolgreichen Gentransport und stellten fest, dass die DNA selbst nicht in der Lage ist die biologischen Barrieren zu überwinden, sondern schützende Transportsysteme notwendig sind. Die Verwendung von viralen Vektoren stellte sich zwar als eine effiziente Strategie dar, geht jedoch mit hohen finanziellen Investitionen und strengen Sicherheitsaspekten bei der Herstellung einher. Aus diesen und weiteren Gründen ist das Interesse an nicht-viralen Transportsystemen mit hoher Gentransfereffizienz bei gleichzeitiger minimaler Zytotoxizität hoch. Damit ist die Motivation der vorliegenden Arbeit, die Entwicklung und Charakterisierung neuer nicht-viraler Vektoren auf Basis von biokompatiblen und leicht funktionalisierten Polymeren und ihre Anwendung für den Gentransport. Aus den erzielten Ergebnissen sollen Struktur- und Eigenschaftsbeziehungen hergeleitet werden, um so einen innovativen Beitrag zur Etablierung neuer Vektorsysteme zu leisten.

2 Einleitung

Gentherapie ist definiert als das Einbringen von Genen in Zellen oder Gewebe mit dem Ziel, durch Expression dieser Gene einen therapeutischen oder präventiven Nutzen zu erlangen.^[3] Das Ziel ist dabei, die Behebung von erworbenen oder vererbten Gendefekten. Das Gebiet der Gentherapie ist eines der dynamischsten und immer wieder kontrovers diskutierten Forschungsgebiete in der Medizin. Im Jahr 1944 legten *Avery et al.* den ersten Baustein für das Grundverständnis der DNA, mit dem Beweis, dass die DNA unsere Erbinformationen trägt.^[2] Es folgte im Jahr 1953 die Entschlüsselung der Doppelhelixstruktur der DNA von *Watson* und *Crick*^[4] sowie 1961 die Enthüllung des prinzipiellen Mechanismus der Botenribonukleinsäure (mRNA), die Gene in Proteine übersetzen kann.^[1] Die erste somatische Gentherapie am Menschen wurde 1990 berichtet. Seitdem hat der Gentransfer vielversprechende Therapieansätze geliefert. Es erschlossen sich für die Behandlung mit Gentherapie vier große Erkrankungsgruppen, wobei die Krebserkrankungen mehr als 60% des Anteils der weltweit laufenden klinischen Studien ausmachen und damit im Fokus der Gentherapie stehen (Stand Februar 2011).^[5] Eine weitere Erkrankungsgruppe, die mittels Gentherapie behandelt werden soll, sind monogene Erbkrankheiten (13.3%), wie beispielsweise Mukoviszidose. Der Anteil von Infektionskrankheiten, insbesondere HIV, sowie von kardiovaskulären Krankheiten beträgt dagegen nur 6.8%.^[5] Da die Gentherapie in die menschliche DNA eingreift, müssen die Therapiestudien strengen ethischen und wissenschaftlichen Prüfungen unterzogen werden. Beispielsweise wägt das „*Recombinant DNA Advisory Committee*“ (RAC) in den USA ab, welche Erkrankungen mittels Gentherapie behandelt werden dürfen und welche Zellen dabei genetisch umprogrammiert werden dürfen. Die Gentherapie wird dabei nur auf somatische Zellen beschränkt. Dabei werden als somatische Zellen all die Körperzellen bezeichnet, die im Gegensatz zu Keimbahnzellen ihr Erbgut nicht an die nächste Generation weitergeben können. Die Keimbahntherapie ist laut des Embryonenschutzgesetzes in Deutschland verboten. Hierbei wird nämlich das therapeutische Erbgut nur in eine einzige

Keimzelle oder nur wenige Keimzellen eingeschleust, mit dem Ziel Erbdefekte vor ihrer Entstehung zu beheben.^[6]

2.1 Einführung in den Gentransport

Je nach Art des gentherapeutischen Ansatzes wird zwischen folgenden Therapiemöglichkeiten unterschieden. Die *Immungentherapie* ist derzeit die am häufigsten genutzte Gentherapie für Krebserkrankungen. Die Krebszellen werden mit immunstimulierenden Genen so verändert, dass das Immunsystem in der Lage ist diese dauerhaft zu beseitigen. Hierfür werden nur sehr geringe Anforderungen an das Transportsystem gestellt, da der Gentransfer nur in einige wenige Zellen zur Stimulation der Immunantwort ausreicht.^[1] Die *Substitutionstherapie* oder *homologe Rekombination* befasst sich mit der Korrektur (Genkorrektur) eines defekten Genes bzw. des Ersatzes eines fehlenden Genes durch Einbringen von entsprechenden intakten Genkopien oder durch gezielte Genmodifikation. Es stellen sich hierbei hohe Ansprüche an das Transportsystem, da zum einen eine hohe Zielgenauigkeit und zum anderen eine sehr hohe Stabilität des Gentransfers erforderlich sind. Bisher ist weder die Korrektur noch der Ersatz, sondern lediglich die Genaddition einer intakten Genkopie zum vorhandenen defekten Gen möglich. Bei dieser so genannten *Additionstherapie* werden zusätzliche Gene (Genaddition) eingeschleust, die die physiologische Genfunktion verstärken sollen. Die *Suppressionstherapie* beschäftigt sich mit der Inaktivierung von pathogener Genaktivität.^[1,3,7] Zusätzlich ist der Transfer von potentiell zytotoxischen Genen in Tumorgewebe möglich. Hierbei ist eine sehr hohe Zielgenauigkeit des Gentransfers erforderlich.^[8]

Nukleinsäuren allein sind aufgrund ihrer Eigenschaften und der zahlreichen biologischen Barrieren nicht in der Lage *in vivo* zu den Zielzellen zu gelangen. Die Halbwertszeit von Plasmid-DNA in Mäusen beträgt ca. 10 Minuten.^[9] Daher wird ein Vehikel für die Nukleinsäuren, meist Plasmid-DNA oder RNA, der als Vektor bezeichnet wird benötigt,

benötigt. Dieser Vektor dient als stabilisierendes Transportsystem. Er ist dafür verantwortlich, dass die Nukleinsäure zur Zielzelle transportiert wird, wo das gewünschte Protein gebildet bzw. die Bildung unerwünschter Proteine unterbunden werden soll. Die Wahl des Vektors beeinflusst damit maßgeblich den Erfolg der Gentherapie.

Das Prinzip der Gentherapie kann in zwei wesentlichen Methoden unterschieden werden (Abbildung 1).^[10]

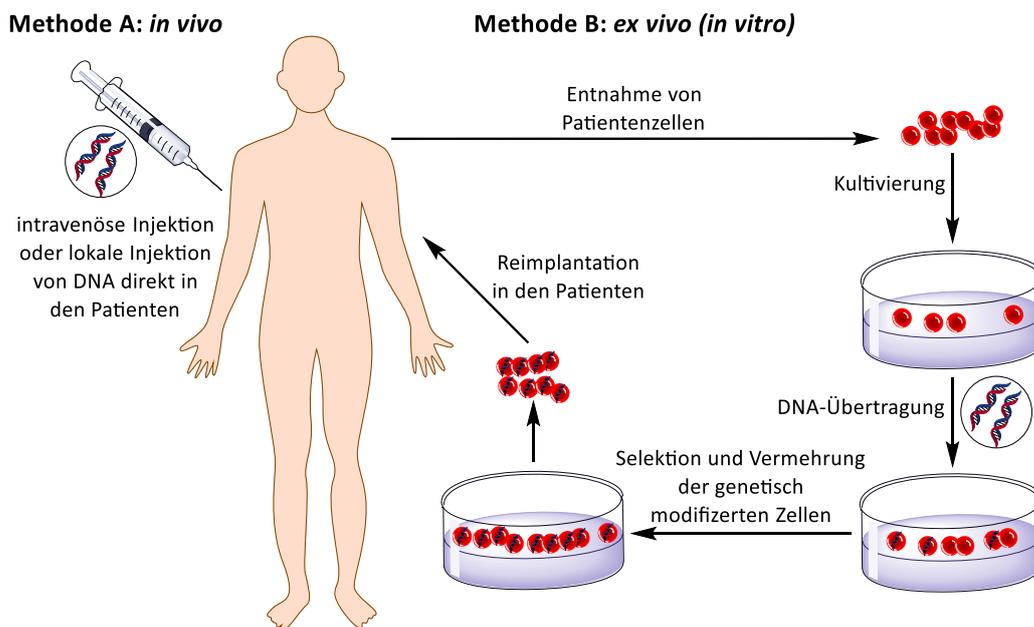


Abbildung 1 Prinzip der Gentherapie gegliedert in *in vivo* Methode (A) und *ex vivo* Methode (B).^[10]

Bei der *in vivo* Methode wird die DNA meist in einem Vektor verpackt dem Patienten direkt intravenös oder lokal in das Gewebe verabreicht. Bei der *ex vivo* Methode werden dem Patienten zunächst Zellen entnommen. Diese werden in Kultur vermehrt. Anschließend wird die DNA auf diese Zellen entweder mittels eines Vektors oder Elektroporation oder Mikroinjektionen übertragen. Nach Selektion und Vermehrung dieser genetisch modifizierten Zellen werden sie dem Patienten reimplantiert. Die *ex vivo* Methode ist nur auf wenige Zellen beschränkt, da die Entnahme mit Ausnahme von Blutzellen und die Kultivierung der Zellen ein schwieriges Unterfangen ist.^[11] Zusätzlich ist diese Methode zeit- und kostenintensiver im Vergleich zu der *in vivo* Verabreichung.^[3] Daher wird vor allem die

in vivo Gentherapie angestrebt und bevorzugt. Bei dieser Methode muss der Vektor zahlreichen unterschiedlichen Anforderungen während des Gentransfers im Körper standhalten. Deswegen ist ein multifunktionaler Vektor Voraussetzung für eine erfolgreiche Gentherapie *in vivo*.

2.2 Vektoren für den Transport von DNA

Allgemein wird zwischen viralen und nicht viralen Vektoren unterschieden. Das Einschleusen von Genen in Zellen durch virale Vektoren wird als *Transduktion* bezeichnet.^[3] Der Gentransfer mittels nicht-viralen Vektoren wird *Transfektion* genannt.^[3]

Die Entwicklung von Vektoren basiert auf dem Hintergrundwissen über die biologischen Barrieren, die sich einem effizienten Transfer entgegenstellen. Daher wird eine Vielzahl von Anforderungen an den Vektor gestellt. Da die Teilungsaktivität der Zellen in fast allen menschlichen Geweben gering ist, soll der Vektor die Fähigkeit haben, die DNA auch in sich nicht teilende Zellen zu transportieren. Eine weitere Anforderung ist eine ausreichend große Beladung mit Genen und das Erzielen einer ausreichend langen Genexpression. Insbesondere bei Erbkrankheiten ist eine dauerhafte Genkorrektur des Erbdefekts erwünscht. Daher soll der Vektor nicht nur stabil sein, sondern auch in der Lage sein sich in das menschliche Genom zu integrieren. Neben hoher Effizienz ist eine hohe Verträglichkeit und damit verbunden eine fehlende Immunogenität erstrebenswert. Somit sollen schädliche Langzeitwirkungen und gesundheitliche Risiken ausgeschlossen werden. Dafür ist die Fähigkeit zum gezielten Adressieren (Targeting) von Zielzellen erstrebenswert. Bezüglich der Herstellung der Vektoren ist eine einfache, kosteneffiziente und in großen Maßstäben reproduzierbare Darstellung lohnenswert.^[1]

2.3 Virale Vektoren für den Gentransport

In mehr als zwei Drittel der klinischen Studien weltweit werden virale Vektoren eingesetzt.^[5] Die evolutionäre Entwicklung der Viren, die hochentwickelte biologische Vehikel sind, ermöglicht das Eindringen in Gastzellen mit hoher Effizienz. Aus diesem Grund ist ihre Gentransfereffizienz bisher den nicht-viralen Systemen deutlich überlegen. Dabei bilden Retroviren mit 34.1% den größten Anteil in Gentherapiestudien, dicht gefolgt von Adenoviren (26.9%). Einen kleineren Anteil bilden bisher Adeno-assoziierte Viren (AAV) (2.4%) und Pockenviren (6.1%).^[5] Für die Anwendung in der Gentherapie sollen virale Vektoren eine Virus-Infektion imitieren ohne eine anschließende Vermehrung (Replikation) des Virus, sondern lediglich die des therapeutischen Gens.^[1] Deshalb werden für die virale Vektorherstellung die Abschnitte im Virusgenom entfernt oder zerstört, die für die Vermehrungsfähigkeit der Viren verantwortlich sind. In diesen Abschnitt wird stattdessen das therapeutische Gen eingesetzt, wodurch ein so genanntes rekombinantes Virus für den Gentransfer entsteht.^[1] Die eingesetzten Virusvektoren unterscheiden sich im Wesentlichen in Effizienz, Selektivität, der Ladekapazität und der Fähigkeit in das menschliche Genom zu integrieren. Zusätzlich wird in der Fähigkeit unterschieden, auch in sich nicht teilende Zellen zu transportieren (Tabelle 1).

Tabelle 1 Eigenschaften der drei wichtigsten Vektoren in Gentherapiestudien.^[1,7]

Vektor	Effizienz	Selektivität	Kapazität	Integration ins Genom	Transfer in nicht-mitotische Zielzellen	Applikation
Retroviren	Teilweise hoch	gering	Ca. 10 kb ^{a)}	+/zufällig	-	<i>Ex vivo</i>
Adenoviren	hoch	gering	7.5 kb ^{a)}	-/keine	+	<i>Ex vivo</i> und <i>in vivo</i>
AAV	hoch	gering	5 kb ^{a)}	+	+	<i>Ex vivo</i> und <i>in vivo</i>

a) 1 kb entspricht 1 000 Basenpaaren (bp) eines Doppelstranges

Retroviren und Adenoviren haben eine sehr hohe Effizienz. Im Fall von AAV-Vektoren gilt die hohe Effizienz sogar in teilungsinaktiven Zellen. Durch Retroviren übertragene Gene

integrieren nach dem Zufallsprinzip und können deshalb intakte Gene zerstören. Da der Transfer nur in sich teilende Zellen möglich ist, ist die Anwendung nur auf die *ex vivo* Methode limitiert. Die Adenoviren zeigen eine hohe Gentransfereffizienz und die übertragenen Gene sind nur temporär aktiv, was sie für bestimmte Kurzzeit-Anwendungen interessant macht. Ein großer Nachteil sind die häufig ausgelösten Immunreaktionen. AAV-Vektoren hingegen haben ebenfalls eine gute Effizienz und sind nur wenig immunogen. Außerdem haben sie die Fähigkeit aktiv in das menschliche Genom zu integrieren. Der große Nachteil ist allerdings die relativ geringe Aufnahmekapazität von nur fünf Kilobasen. Alle drei Viren weisen geringe Selektivität auf, sodass eine *in vivo* Anwendung oft nicht effizient genug ist, um Gene in das gewünschte Zielorgan- oder Gewebe einzuschleusen. Es wurde dazu eine interessante Kalkulation von Hallek et al. publiziert.^[1] Dabei wurde angenommen, dass der menschliche Körper aus insgesamt 5×10^{13} Zellen bestehe. Eine 10 mL Vektorlösung enthalte 10^{10} aktive Vektorpartikel, womit entsprechend nur 1 von 5 000 Zellen transduziert werden könnte.^[1] Daher ist es unabdingbar die Selektivität von Vektoren zu optimieren. Ein Ansatz ist das gezielte Retargeting. Dabei wird die Hülle des Virus mit Liganden modifiziert, die spezifisch an bestimmte Zellen oder Organe binden um dort Gene zu transduzieren. Diese Methode war bereits bei Retroviren, Adenoviren und AAV-Vektoren erfolgreich.^[1,12,13]

Vergleicht man virale mit nicht-viralen Genvektoren, so spricht die kaum zu übertreffende Gentransfereffizienz für virale Vektoren. Im Gegensatz zu nicht-viralen Vektoren, sind Viren in der Lage in das menschliche Genom zu integrieren und die Genexpression innerhalb der Zelle ist vergleichsweise stabiler. Ein großer Nachteil von viralen Vektoren ist allerdings die geringe Ladekapazität für Nukleinsäuren, die bei nicht-viralen Genvektoren unlimitiert ist. Ein weiterer Nachteil liegt in der Herstellung der viralen Vektoren. Aufgrund der hohen Sicherheitsauflagen ist die Produktion viraler Vektoren aufwendig und vor allem kostenintensiv. Weiterhin schränken auftretende Immunantworten auf unterschiedlichen Ebenen den Einsatz viraler Vektoren ein, genauso wie die geringe Selektivität. Trotz aller genannten Einschränkungen stellen virale Genvektoren derzeit die beste Variante für den

Gentransfer dar. Aufgrund der erwähnten Grenzen steht jedoch die Entwicklung optimierter nicht-viraler Vektoren im Fokus und stellt die zentrale Aufgabe der vorliegenden Arbeit dar. Für weiterführende Informationen hinsichtlich viraler Vektoren soll auf folgende aktuelle Übersichtsartikel verwiesen werden.^[14–16]

2.4 Entwicklung nicht-viraler Vektoren für den Transport von DNA

Die Leistungsfähigkeit der aktuell entwickelten Vektoren entspricht selten den klinischen Ansprüchen. Der Fortschritt in der Gentherapie ist durch das Fehlen effizienter Vektoren limitiert und deshalb ist die Optimierung von synthetischen Vektoren dringend notwendig. In der aktuellen Forschung werden Assoziationen der Nukleinsäuren mit chemischen Molekülen, wie unlöslichen Calciumphosphaten^[17], kationischen Lipiden^[18] und kationischen Polymeren^[19] untersucht. Kationische Polymere zeichnen sich vor allem durch gezielte Möglichkeiten zur Funktionalisierung und durch die kontrollierbare und kosteneffiziente Herstellung aus. Im Vergleich zu viralen Vektoren, zeigen die synthetischen Polymere eine meist geringere Immunogenität und eine unbegrenzte DNA-Ladefähigkeit.^[20,21] Die kationischen Polymere sind in der Lage die negativ geladene Nukleinsäure durch elektrostatische Wechselwirkungen im Kern zu komplexieren und zu kondensieren. Dabei bilden sich so genannte Polyplexmizellen (Abbildung 2).

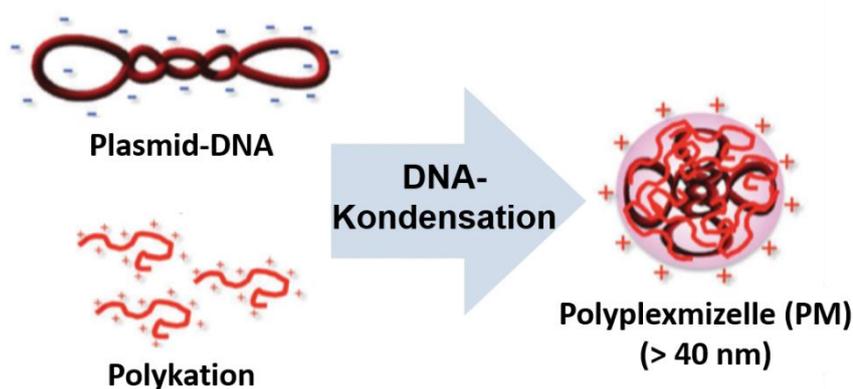


Abbildung 2 Schematische Darstellung der DNA-Kondensation durch elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Polykation zur Bildung einer Polyplexmizelle (PM).^[22]

Als Nukleinsäuren wird häufig Plasmid-DNA, ein zirkulär doppelsträngiges DNA-Molekül mit 1-25 kb, verwendet.^[23] Um zu verstehen welche Modifikationen an Polykationen vorgenommen werden müssen, müssen die biologischen Hürden (A-E) und unterschiedlichen Gegebenheiten, wie Redoxpotential- und pH-Wert-Änderungen näher betrachtet werden. Deswegen werden im folgenden Abschnitt die bereits bekannten Strategien für die Entwicklung von nicht-viralen Vektoren anhand der biologischen Hindernisse, (A) Bildung eines stabilen Komplexes, (B) Hämokompatibilität, (C) Zellaufnahme, (D) endosomale Freisetzung und (E) Eintritt in den Zellkern (Abbildung 3), verdeutlicht.

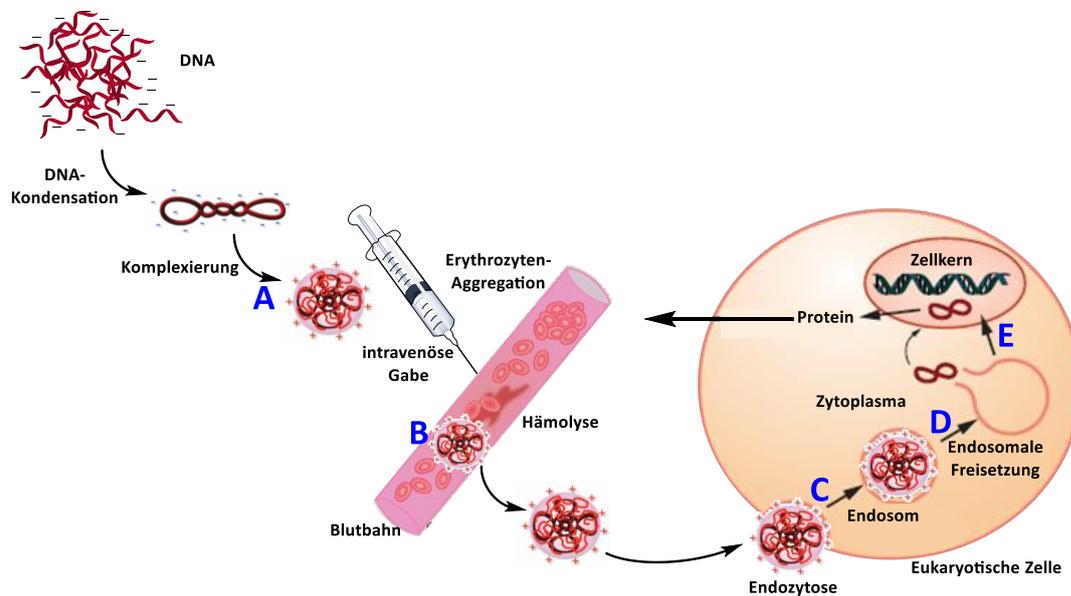


Abbildung 3 Schematische Darstellung der fünf Hauptherausforderungen für eine erfolgreiche Gentransfektion: (A) Bildung eines stabilen Komplexes, (B) Hämokompatibilität, (C) Zellaufnahme, (D) endosomaler Austritt und (E) Eintritt in den Zellkern.^[3]

(A) Die Bildung einer stabilen Transportform stellt die erste Hürde (A) für eine erfolgreiche Gentransfektion dar. Ungeschützte Nukleinsäuren werden innerhalb von kürzester Zeit durch unterschiedliche Blutbestandteile abgebaut. Dazu gehören unter anderem Enzyme, wie Nukleasen, die die DNA innerhalb von 5-10 Minuten verdauen.^[3,24] Ein weiterer Ausscheidungsprozess körperfremder Nukleinsäuren

verläuft über Leber und Nieren.^[25] Nucleinsäuren können aufgrund ihres Molekulargewichts von 1 500-20 000 Basenpaaren^[23], ihrer Größe und ihrer anionischen Ladungen^[11], aufgrund elektrostatischer Abstoßung mit anionischen Proteoglykanen auf der Zelloberfläche, nicht in Zellen eindringen.^[26] Deswegen muss die DNA vorher in eine kompakte Konformation kondensiert (DNA-Kondensation) und die negative Ladung, welche durch Phosphatgruppen hervorgerufen wird, maskiert werden. Das geschieht durch Polykationen, welche meist kationische Ammoniumgruppen tragen, da unter physiologischen Bedingungen ($5 < \text{pH} < 7.4$) die entsprechenden Aminfunktionen protoniert vorliegen. Durch einen Überschuss an positiver Ladung wird die negative Ladung der DNA neutralisiert und vollständig maskiert.^[3] Hierfür sollten mindestens 90% der anionischen Ladungen neutralisiert sein.^[27] Die Komplexierungskraft bzw. die DNA-Bindungsaffinität der Polykationen spielen eine wichtige Rolle. Es ist bekannt, dass sowohl das Molekulargewicht sowie die Flexibilität, Verzweigungen und Ladungsverteilung der Polymere einen Einfluss auf die Komplexierungskraft und somit auf die Stabilität des Komplexes haben. Im Allgemeinen lässt sich formulieren, dass je größer die Molmasse, desto stabiler ist der entstehende Komplex.^[28] Bei linearen Polykationen liegt die optimale molare Masse über 10 kDa.^[29]

(B) Die Hämokompatibilität spielt eine entscheidende Rolle im Hinblick auf die Verträglichkeit des Gentherapeutikums. Das heißt der mit dem Gen geladene Vektor, sowie alle daraus resultierenden Abbauprodukte sollen eine hohe Verträglichkeit gegenüber allen Bestandteilen des Blutplasmas haben. Weiterhin sollte die Oberfläche des Vektors so beschaffen sein, dass er minimale Wechselwirkungen mit den Blutkomponenten und Proteinen zeigt. Unspezifische Wechselwirkungen können nämlich Thrombosen, Embolien, Entzündungen und Gewebeschädigungen hervorrufen.^[30,31] Zusätzlich können Wechselwirkungen mit Blutbestandteilen zu einer schnellen Ausscheidung durch Leber und Milz, den Organen des retikuloendothelialen Systems (RES) führen.^[32-34] Es ist bekannt, dass

eine höhere positive Ladungsdichte am Polykation zwar zu einem stabilen Komplex führt, aber auch zu einer höheren Tendenz mit anionisch geladenen Bestandteilen des Blutes und Zellen zu interagieren. Die kationisch geladene Oberfläche der Polyplexmizellen kann die Membran schädigen und den Zellmetabolismus stören.^[35] Weiterhin können unspezifische Wechselwirkungen mit Blutkomponenten (Opsonierung) zur Aktivierung des Komplementsystems führen. Infolgedessen kann der Komplex durch das retikuloendotheliale System (RES) in kurzer Zeit komplett aus dem Körper entfernt werden.^[11] Dieser einerseits negative Effekt der unspezifischen Wechselwirkungen mit Blutbestandteilen und andererseits wünschenswerte Wechselwirkung der kationischen Ladung mit der negativ geladenen DNA wird als Ladungsproblem (engl. *charge dilemma*) bezeichnet. Aus diesem Grund wird die überschüssige positive Ladung mithilfe von hydrophilen, nichtionischen Polymeren abgeschirmt. Polymere wie Poly(ethylenglycol) (PEG)^[36] und Poly(oxazoline) (POx)^[37] haben die Fähigkeit das Transportsystem gegen ladungsinduzierte Wechselwirkungen abzuschirmen, indem sie die Wechselwirkung mit Blutbestandteilen und Proteinen verhindern. Dadurch kommt es zu einer reduzierten opsonierungsbedingten Aufnahme durch das RES und infolgedessen zu einer maßgeblich verlängerten Blutzirkulationsdauer. Damit einhergehend zeigen PEGylierte Transportsysteme eine niedrigere Immunogenität, ein geringeres Risiko für Hämolyse und Embolien. Zusätzlich wird die Wasserlöslichkeit der Transportsysteme erhöht, während die Abschirmung zur erhöhter Stabilität während Lagerung und Anwendung führt.^[32] Polymere mit allen diesen Eigenschaften verfügen über ein so genanntes Tarnkappen (engl. *Stealth*)-Verhalten.^[32] Die große Anforderung an abgeschirmte Polyplexmizellen ist allerdings die minimale unspezifische Wechselwirkung mit Blutkomponenten bei gleichzeitig maximaler Wechselwirkung mit der Zellwand der Zielzelle für eine hohe Zellaufnahme (C) und effiziente endosomale Freisetzung (D).

(C) Die Zellaufnahme erfolgt über Wechselwirkungen des Vektors mit der Zellmembran der Zielzelle. Da die Zellmembran negativ geladen ist, ist es von Vorteil, wenn die Vektoroberfläche positive Ladungen trägt. Die Zellaufnahme verläuft hauptsächlich über die Endozytose, meist über Clathrin- oder Caveolin-abhängige Mechanismen, Phagozytose oder Makropinozytose.^[3,11] Dabei stülpt sich ein Teil der Zellmembran über den beladenen Vektor, um durch Abschnürung dieses Vesikels in der Zelle, das sogenannte Endosom zu bilden.^[38] Die genauen endozytotischen Mechanismen hängen von der jeweiligen Zelle, Art und Größe des Vektors, der Hydrophobizität und weiteren Spezifika ab.^[23,38] Wie bereits erwähnt, führt der Stealth-Effekt und die damit einhergehende Abschirmung der kationischen Oberflächenladung zu einer geringeren Zellaufnahme. Ein möglicher Lösungsansatz hierfür ist die Einführung von biospaltbaren Linkersystemen, wie Disulfid^[23] und Esterbrücken^[36] zwischen dem Stealth-Polymer und des kationischen Polymerblockes. Dementsprechend würde die abschirmende Hülle als Reaktion auf pH- oder Redoxpotential-Änderungen abgespalten werden um so eine höhere Wechselwirkung zu gewährleisten. Die Einführung eines spaltbaren Linkers kann zusätzlich die Zytotoxizität absenken, da die kürzeren Polymersegmente besser ausgeschieden oder gegebenenfalls abgebaut werden könnten. Ein weiterer Vorteil von spaltbaren Linkern in der Polymerstruktur ist die effizientere Freisetzung der DNA aus dem Komplex. Dieser Punkt ist wichtig für eine anschließende Genexpression. Neben Oberflächenladung, gibt es weitere Kriterien für eine begünstigte Zellaufnahme, wie Größe, Form und Oberflächenfunktionalisierung mit zellenpenetrierenden Proteinen (CCP), hydrophoben Resten und Targeting Liganden. Zu zellpenetrierenden Peptiden zählen unter anderem Oligoarginin, HIV-TAT, Penetratin und Transportan.^[3,39,40] Mithilfe dieser Peptide kann der Komplex direkt in das Zytoplasma gelangen und entgeht so dem endozytotischen Mechanismus. Hydrophobe Funktionalisierungen der Komplexhülle durch aromatische Systeme^[41] oder hydrophobe Alkylketten^[42] und Aminosäuren^[43]

verstärken die Wechselwirkungen mit der Zellmembran und begünstigen damit den Zelleintritt. Im Zusammenhang mit der zellulären Aufnahme spielen Aspekte der Selektivität sowie Spezifität eine wichtige Rolle. Die selektive und spezifische Zellaufnahme kann durch Funktionalisierungen des Komplexes mit so genannten Targeting Molekülen, die mit Rezeptoren an der Oberfläche der Zielzellen interagieren, gewährleistet werden. Zu solchen Molekülen zählen unter anderem Wachstumsfaktoren, Antikörper, Zucker, Vitamine und zyklische Peptide.^[44,45] Mithilfe solcher Liganden kann die Zellspezifität *in vitro* 100- bis 1000-fach erhöht werden.^[3]

(D) Im Endosom selbst herrschen deutlich abweichende Bedingungen vor. Der pH-Wert beträgt innerhalb des Endosoms 5 und ist durch die Aktivität der ATP-abhängigen Protonenpumpen in der endosomalen Membran bedingt.^[11] Das weitere Absinken des pH-Wertes bzw. die anschließende Verschmelzung mit dem Lysosom können Verdauungsenzyme, wie Nukleasen im Vesikel aktivieren, die ebenfalls in das Zytoplasma gelangen können.^[3,11] Aus diesem Grund muss die DNA zum einen ausreichend durch den Vektor geschützt werden und zum anderen rechtzeitig aus dem Endosom in das Zytoplasma (pH 7.2) freigesetzt werden. Für den Mechanismus des endosomalen Austritts durch nicht-virale Vektoren wurden mehrere Hypothesen aufgestellt. Der von Behr et al. publizierte Protonenschwamm-Effekt (engl. *proton sponge effect*) erlangte die größte Bedeutung.^[46] Abbildung 4 soll das Prinzip des Protonenschwamm-Effektes anschaulich verdeutlichen.

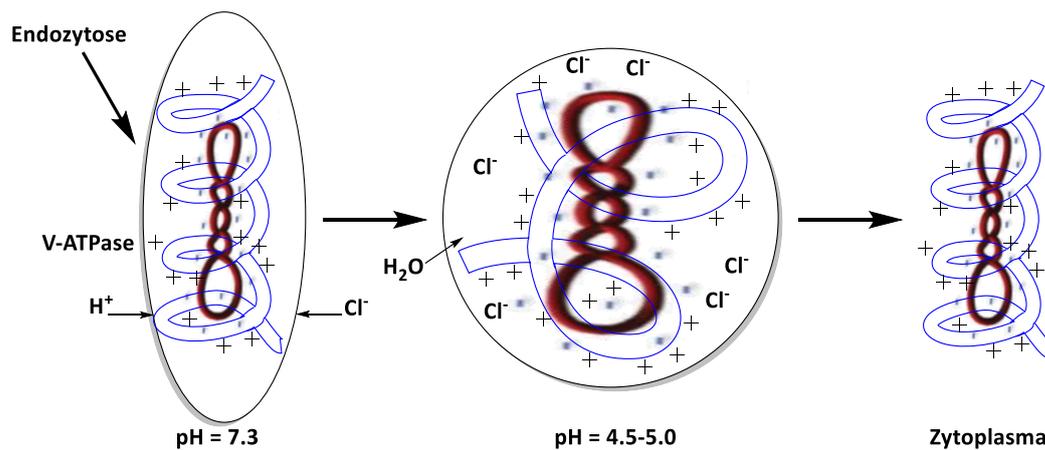


Abbildung 4 Prinzip des Protonen-Schwamm-Effektes von pH-sensitiven Polymeren im Endosom.^[46]

Der Protonenschwamm-Effekt ist besonders stark bei dem pH-sensitiven Polymer, Poly(ethylenimin) (PEI) ausgeprägt. Nach Aufnahme der Polyplexmizellen in das Endosom strömen Protonen durch die ATPase-vermittelte Protonenpumpe in das Endosom und senken folglich den pH-Wert von 7.3 auf 5.0. Aufgrund der hohen Anzahl an Aminogruppen im PEI resultiert eine gute Pufferkapazität indem bei physiologischen Bedingungen nicht protonierte Aminogruppen nun zu Ammoniumgruppen protoniert werden. Dadurch wird zum einen das pH-Optimum zur Aktivierung der lysosomalen Nukleasen nicht erreicht und zum anderen führt die Protonierung zu elektrostatischen Abstoßungen und damit zur Aufweitung des Polymers. Aufgrund der Elektronenneutralität und Osmolarität kommt es zu einem zusätzlichen Einstrom von Chlorid-Ionen und Wasser in das Endosom. Die genannten Effekte und der zusätzliche osmotische Druck führen letztendlich zur Perforation der endosomalen Membran und infolgedessen zur Freisetzung des Komplexes in das Zytosol.^[22,46] Der endosomale Austritt stellt neben den Eintritt in den Nukleus den limitierenden Schritt dar. Die Rate der endosomalen Freisetzung beträgt nur 2% und begründet damit die niedrige Gentransfektionseffizienz von nicht-viralen Vektoren.

(E) Die letzte Hürde des Gentransfers ist der Eintritt der Nukleinsäure in den Zellkern für eine erfolgreiche Expression des Proteins. Das Zytoplasma hat aufgrund der hohen Proteinkonzentration eine hohe Viskosität, weswegen große Moleküle nur sehr langsam diffundieren können.^[47] Deswegen ist der Eintritt der Plasmid-DNA in den Zellkern aufgrund ihrer Größe stark limitiert und sie ist daher anfälliger für den Abbau durch Endonukleasen im Zytoplasma.^[11] Sphärische und stark kondensierte Nukleinsäuren dagegen haben eine höhere Mobilität im Zytoplasma.^[23] Der Eintritt in den Nukleus sich teilender Zellen ist weniger problematisch, da dieser während der Mitose (Zellteilung) ablaufen kann. Bei primären, sich nicht teilenden Zellen, werden Kernlokalisationssequenzen benötigt. Diese können aus basischen Peptidsequenzen bestehen und erlauben den aktiven Transport in den Zellkern. Statistisch gesehen, schafft es jedoch nur eine Plasmid-DNA von insgesamt 1 000 Plasmiden in den Zellkern einzudringen.^[11] Davon ausgenommen sind DNA-Moleküle mit so genannten *nuclear localization sequences* (NLS). Diese werden von bestimmten Proteinen, den so genannten Importinen erkannt und aktiv in den Zellkern transportiert.^[11] Ein weiterer Grund für die geringe Gentransfektionseffizienz von nicht-viralen Vektoren ist die hohe Komplexstabilität und infolgedessen die geringfügige Freilassung der Nukleinsäuren zur erfolgreichen Genexpression. Im extrazellulären Raum ist eine hohe Stabilität der Polyplexmizellen zwar wünschenswert, jedoch ist eine Dissoziation des Komplexes im intrazellulären Raum Voraussetzung für den Eintritt der Nukleinsäure in den Zellkern.^[48] Es wurden daher verschiedene Konzepte entwickelt um die Stabilität des Vektors umzukehren, dazu gehören insbesondere die hydrolytische^[49] oder reduktive^[50] Spaltung des Polymers. Dabei wird die verminderte Komplexierungskraft bei geringerem Molekulargewicht des Vektors ausgenutzt.^[47,51]

Abbildung 5 fasst die bekannten Strategien für die Entwicklung von Polykationen zur Überwindung der fünf Hindernisse (A-E) anschaulich zusammen.^[3,29]

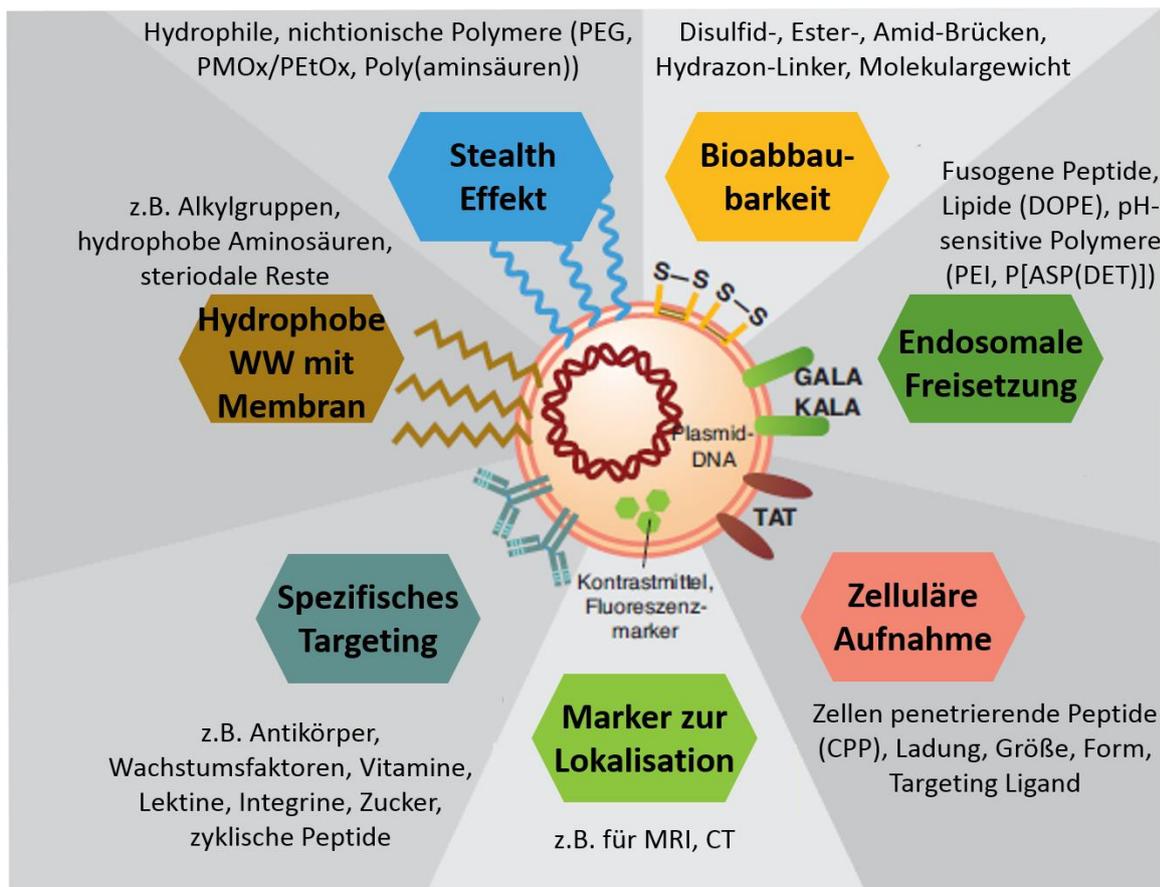


Abbildung 5 Lösungsansätze zur Modifikation nicht-viraler kationischer Vektoren für einen erfolgreichen Gentransfer.^[29]

Abgesehen von den beschriebenen fünf Hürden, müssen noch weitere Aspekte wie Toxizität, Bioabbaubarkeit, einfache Herstellung der Vektoren berücksichtigt werden. Bisher wurde allerdings von keinem Polymer berichtet, der alle Anforderungen für einen effizienten Gentransfer mit minimaler Zytotoxizität erfüllt. Es wurden jedoch eine Reihe vielversprechender Polymere publiziert, die im Folgenden vorgestellt werden sollen.

2.4.1 Poly(ethylenimin) (PEI)

Das am besten untersuchte Polykation für die Anwendung als nicht-viraler Vektor ist das Poly(ethylenimin) (PEI), wobei der erste Bericht von *Behr et al.* im Jahr 1995 publiziert wurde.^[52] Die meisten *in vitro* und *in vivo* Studien^[52] befassen sich mit PEI oder mit PEI-

Derivaten.^[3,53] PEI ist nicht nur der „Goldstandard“ für den Gentransfer mit nicht-viralen Vektoren, sondern auch das beste Beispiel für das *charge dilemma*. Es zeichnet sich durch eine sehr hohe Transfektionseffizienz und eine ebenso hohe Zelltoxizität aus.^[54] Die hohe kationische Ladungsdichte führt zur akuten Toxizität durch Destabilisierung der Kernmembran und zur verzögerten Toxizität durch Schädigung der mitochondrialen Membran, was in beiden Fällen zu Nekrose und Zelltod führt.^[54] Die nicht degradierbare Polymerstruktur kann sich in der Zellmembran einlagern, was folglich ebenfalls zu Nekrose führen kann.^[51] Es wurde die Effizienz von linearen und verzweigten PEI-Polymeren und damit einhergehend der Effekt der Molmasse der Polymere studiert.^[55] Die höchste Transfektionsrate wurde für verzweigte PEI (bPEI) mit einer molaren Masse von 25 kDa beobachtet. Das verzweigte PEI (bPEI) verfügt über unterschiedlich hoch substituierte Amingruppen (primär, sekundär, tertiär) und ist infolgedessen in der Lage über einen breiten Bereich den pH-Wert zu puffern, was nicht nur zu einem effizienten endosomalen Austritt^[56] sondern auch zu einer stabilen Komplexbildung mit Nukleinsäuren führt.^[57] Allerdings liegt die Zellviabilität bei 40%.^[55] Das ist eine der Gründe, warum die Anwendung von PEI *in vivo* limitiert ist. Die hohe positive Ladungsdichte induziert nicht-spezifische Wechselwirkungen mit Blutkomponenten und führt durch Aggregation der Erythrozyten zu Embolien und Thrombose. Eine gute Lösung für das *charge dilemma* liefert die Abschirmung mit hydrophilen, nichtionischen Polymeren, was im folgenden Abschnitt näher betrachtet werden soll.

2.4.2 Lösung für das *charge dilemma* – Abschirmung mit Stealth-Polymeren

Um nicht-spezifische Wechselwirkungen mit Biomakromolekülen zu verhindern und damit die Entfernung durch das retikuloendotheliale System (RES) zu vermeiden, werden so genannte Stealth-Polymere genutzt, um die positive Ladungsdichte der Polyplexmizellen abzuschirmen. Dafür eignen sich insbesondere Blockcopolymere, bestehend aus einem kationischen Block für die Komplexbildung der Nukleinsäuren und einem hydrophilen,

nichtionischen und biokompatiblen Block für eine effiziente Abschirmung. Die Arbeiten von *Wagner et al.*^[58,59] und *Kataoka et al.*^[22,60] haben hervorragend verdeutlicht, dass Polyplexmizellen für *in vivo* Anwendungen mit einer biokompatiblen Schale modifiziert werden müssen. Durch diese Hülle können unspezifische Wechselwirkungen mit Serumproteinen vermieden werden, die pDNA wird vor extra- und intrazellulärem Abbau geschützt und unspezifische Immunreaktionen durch Stimulierung der *toll like* Rezeptoren können umgangen werden.^[61–63] Solche Blockkationomere sind in der Lage mit der negativ geladenen Plasmid-DNA (pDNA) Komplexe mit einer Größe unter 100 nm zu bilden^[62,64–66], die aufgrund ihrer Schale-Kern-Architektur eine exzellente kolloidale Stabilität unter physiologischen Bedingungen zeigen. Durch diese einzigartige Abschirmung findet keine Einschränkung der Transfektionsaktivität in Gegenwart von Serumproteinen statt.^[67,68] Vielmehr zeichnen sich solche Komplexe durch eine höhere Blutzirkulationsdauer und den verbesserten Transport in Leber und Tumoren aus.^[69–71] Polymere mit diesen Eigenschaften sind beispielsweise PEG und PMOx/PEtOx.^[22,58–60]

Poly(2-oxazoline) – eine gute Alternative zu PEG

Polymere mit Stealth-Eigenschaften zeichnen sich im Bereich der biomedizinischen Anwendungen vor allem durch ihre Biokompatibilität aus. Das am meisten verwendete Polymer ist Poly(ethylenglycol) (PEG). In Hinblick auf die Anwendung in der Gentherapie ist es vorteilhaft, dass PEG sowohl von der US-amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) als auch von der *Europäischen Arzneimittelagentur* (EMA) zugelassen ist.^[32] Aufgrund seiner Stealth-Eigenschaften zeigt es eine verlängerte Blutzirkulation und eine verminderte RES-Aufnahme. Weiterhin kann es durch passives Targeting *via* EPR-Effekt im Tumorgewebe angereichert werden. Die Herstellung von PEG ist kostengünstig und einfach. Seit neuesten Erkenntnissen steht PEG jedoch im Verdacht Hypersensitivitäten hervorzurufen, vermutlich aufgrund der Akkumulation im Körper. Das kann unter anderem die Bildung von Antikörpern anregen.^[3] Nachteilig ist auch, dass die Polyetherstruktur leicht von Sauerstoff angegriffen werden kann, was zu anschließendem Peroxidabbau und damit

verbunden toxischen und oxidativen Nebenprodukten führt, die sogar Immunreaktionen verursachen können.^[32,72] Weiterhin ist der menschliche Körper nicht in der Lage PEG abzubauen.^[32] Ein weiterer Nachteil bei der Verwendung von PEG ist die stark eingeschränkte chemische Vielseitigkeit. Die Polymerstruktur liefert nur limitierte Möglichkeiten für die Einführung von Funktionalitäten. Aufgrund der genannten Nachteile von PEG werden alternative Polymere für therapeutische Anwendungen intensiv gesucht. Diese sollen sowohl die positiven Eigenschaften von PEG aufweisen als auch die Nachteile ausgleichen. Dabei kommen zwei Klassen von hydrophilen Polymeren mit biokompatiblen Eigenschaften in Frage; die natürlichen und synthetischen Polymere. Zu den natürlichen Polymeren zählen unter anderem Heparin^[73], Dextran^[74], Chitosan^[75] und Hyaluronsäure^[76,77], deren Vorteile vor allem die Bioabbaubarkeit ist. Synthetische Polymere hingegen können lediglich hydrolytisch oder reaktiv abgebaut werden. Die Hauptvorteile von synthetischen Polymeren im Gegensatz zu Natürlichen liegt auf der vielfältigen chemischen Funktionalisierung, dem kontrollierten Aufbau von Polymerarchitekturen und der besseren Reproduzierbarkeit.^[77] Erwähnenswert sind hierbei Poly(aminosäuren), die synthetisch hergestellt werden und biodegradierbare Eigenschaften haben. Nicht bioabbaubare synthetische Polymere sind beispielsweise Poly(glycerol), Poly(acrylamid), Poly(vinylpyrrolidon), Poly(N-(2-hydroxypropyl)methacrylamid) und Poly(2-oxazoline).^[32] Die Stoffklasse der Poly(2-oxazoline) wurde in den 1960er Jahren entdeckt (Abbildung 6).^[78-80]

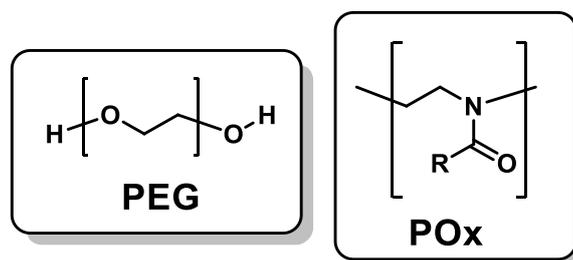


Abbildung 6 Gegenüberstellung der Strukturformel von Poly(ethylenglycol) (PEG) und Poly(2-oxazolin) (POx)

Die lebende kationische Ringöffnungspolymerisation von 2-Oxazolinen ermöglicht es Polymere mit einem niedrigen PDI-Wert nahe eins, definierten Molmassen und Blocklängenverhältnissen herzustellen. Aufgrund der einfachen chemischen Funktionalisierung des Grundbausteins lässt sich ein breites Spektrum an Eigenschaften abdecken. Endgruppengruppenfunktionalitäten können während des Kettenstarts und –abbruchs eingeführt werden, während die Seitenketten des Polymers durch die Wahl der 2-Oxazolin-Monomere variiert werden können.^[81,82] Übersichtsartikel von *Kobayashi*^[81], *Aoi* und *Okada*^[83] fassen die Synthese- und Polymerisationsmechanismen zahlreicher 2-Oxazolin-Monomere hervorragend zusammen. An dieser Stelle soll auch auf Übersichtsartikel zur Funktionalisierung der Seitenketten und Endgruppen^[84] sowie zur Synthese und Eigenschaften von Block-, Gradienten- und statistischen Copolymeren^[85] verwiesen werden.

In den letzten Jahren fand vor allem das hydrophile Poly(2-methyl-2-oxazolin) (PMOx) sowie das hydrophile Poly(2-ethyl-2-oxazolin) (PEtOx) großes Interesse für die Anwendung in der Biomedizin, da es eine vielversprechende Alternative zu PEG ist.^[86] Den ersten Nachweis für die Bioverträglichkeit von PMOx erbrachte *Goddard* et al. im Jahr 1989 mithilfe von intravenösen Injektionen in Mäuse.^[87] PMOx wurde, ohne eine nachweisbare Anreicherung in Organen oder Gewebe, direkt ausgeschieden. *Zalipsky* et al führten ebenfalls *in vivo* Studien in Ratten und Mäusen durch. Sie injizierten dafür Liposome mit einer PMOx- und PEtOx-Hülle und beobachteten eine erhöhte Blutzirkulationsdauer, sowie eine Anreicherung hauptsächlich in Leber, Niere und Milz.^[88,89] Diese Beobachtung lieferte den eindeutigen Nachweis für die Bioverträglichkeit und die Stealth-Eigenschaften von PMOx- und PEtOx. Weiterhin berichteten *Viegas* et al.^[90], dass eine wiederholte intravenöse Injektion von PEtOx (50 mg/kg Körpergewicht) in Ratten, keinen Einfluss auf die Funktion von Nieren, Leber und Milz hatte. Zudem zeigten mit PMOx behandelte Oberflächen ähnlich proteinabweisende Eigenschaften wie PEG.^[91,92] *Veronese* et al. untersuchten die Hämokompatibilität von PEtOx mit Molmassen von 5, 10 und 20 kDa bei einer Konzentration von 5 mg/mL. Sie konnten bei der Injektion von 20 kDa PEtOx alle zwei

Tage über zwei Wochen keine Toxizität beobachteten.^[93] Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Ergebnisse und andere direkte Vergleichsstudien, von beispielsweise *Textor et al*^[94] verdeutlichen, dass die Bioverträglichkeit, Bioverteilung und das Stealth-Verhalten von PMOx und PEtOx nachgewiesen ist.

Im Gegensatz zu PEG, lassen sich Poly(2-oxazoline) (POx) aufgrund des lebenden Polymerisationsmechanismus hervorragend copolymerisieren. Damit ist die Synthese von amphiphilen Polymeren, die in Wasser spontan Aggregate, wie Mizellen ausbilden, leicht zugänglich. Mizellen und Nanopartikel sind insbesondere als Nanotransportsysteme für den Wirkstofftransport interessant. *Hsiue et al* synthetisierten das Blockcopolymer PEtOx-*b*-PLA (Poly(milchsäure)), welches in Wasser Mizellen mit einem Durchmesser von 170 nm bildete und damit als Nanocontainer für den hydrophoben Anti-Krebswirkstoff Doxorubicin (DOX) diente.^[95] Es gibt zahlreiche Beispiele für die Anwendung von POx-Polymeren als Wirkstoffkonjugate oder Wirkstoff-Transportsysteme, aber bisher sind nur wenige Literaturbeispiele für die Verwendung von POx-basierenden Polymeren für den Gentransfer bekannt.^[77,96] Vielmehr dient PEtOx für die Herstellung des polykationischen linearen PEI durch kontrollierte Hydrolyse.^[97] *Hsiue* und Mitarbeiter entwickelten den Ansatz von *Park et al.* weiter und verwendeten ein Blockcopolymer aus PEtOx und PEI für den Gentransfer. Sie starteten mit der Hydrolyse der Seitenketten eines linearen PEtOx-Homopolymers, was sie *via* Disulfid-Linker an ein anderes PEtOx-Polymer koppelten. Das Blockcopolymer kondensierte die pDNA zwar in einem höheren N/P-Verhältnis als bPEI, aber es lieferte eine gute Transfektionseffizienz in HeLa-Zellen bei gleichzeitig reduzierter Toxizität.^[98] *Schubert et al.* synthetisierten amphiphile Blockcopolymere auf Basis von POx für den Transfer von DNA.^[99–102] Dabei bilden sich im Gegensatz zu kationischen Blockcopolymeren so genannte Polyplexe anstelle von Polyplexmizellen aus. Abbildung 7 soll die Unterschiede verdeutlichen.

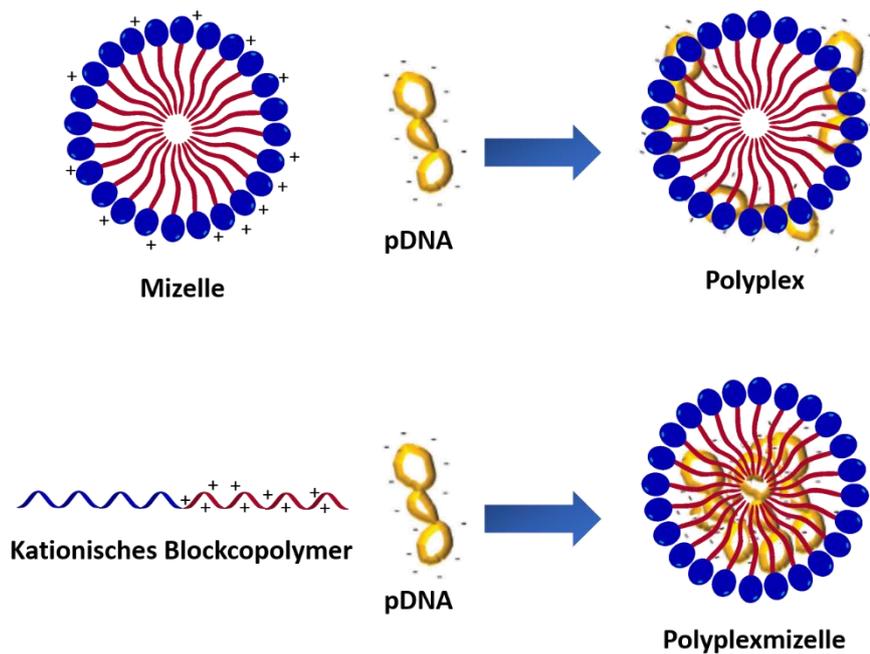


Abbildung 7 Schematische Darstellung von Polyplex (oben) vs. Polyplexmizelle (unten).^[29]

Ein Blockcopolymer, welches aus einem hydrophilen und kationischen Segment besteht, formt mit negativ geladener pDNA durch elektrostatische Wechselwirkungen so genannte Polyplexmizellen, wobei sich die DNA im Kern befindet und der hydrophile Teil die Schale bildet. *Kataoka* et berichteten als erste von diesem Konzept im Jahr 1990 anhand des Polymers PEG-*b*-P[Asp(DET)].^[103,104] Amphiphile Blockcopolymere, bestehend aus einem hydrophilen und hydrophoben Segment, sind in der Lage durch spontane Selbstorganisation in Wasser Mizellen zu bilden. Diese vorgeformten Mizellen eignen sich ebenfalls für den Transport von pDNA. Diese Art von Komplexen werden Polyplexe genannt.^[29] Beispiele sind das amphiphile Blockcopolymer, bestehend aus dem hydrophilen P(EtOx₁₅₅-*b*-NonOx₇₅) für die Stealth-Eigenschaften und dem kationischen P(NonOx₅₂-*b*-AmOx₁₈₄) für die Komplexierung der DNA. Im Vergleich zu PEI konnte die Zytotoxizität gesenkt werden bei gleichzeitiger verbesserter Transfektionseffizienz.^[100]

Für eine erfolgreiche *in vivo* Anwendung stehen allerdings noch zahlreiche Untersuchungen von PMOx und PEtOX aus, um beispielsweise den Verbleib und mögliche Abbauege zu

ermitteln. In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, dass durch den enzymatischen Abbau der Amidbindungen bzw. bei der Hydrolyse von Poly(2-oxazolinen) das kationische PEI gebildet werden kann.^[105] Wie bereits erwähnt, kann PEI abhängig von Molmasse, Verzweigungsgrad und der Zahl der kationischen Ladungen Erythrozytenaggregation und Hämolyse verursachen.^[97,106] Obwohl PMOx und PEtOx ein ähnliches Verhalten wie PEG aufweisen, müssen weitere Untersuchungen zur Immunaktivierung und mechanischen Stabilitäten vorgenommen werden, um Poly(2-oxazoline) als potentielle Alternative für PEG besser einschätzen zu können. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das gleiche Stealth-Verhalten im Vergleich zu PEG, aber die maßgeblich bessere chemische Stabilität von PMOx und PEtOx gute Argumente für die Substitution von PEG sind. Das Hauptargument in Bezug auf die Entwicklung eines multifunktionalen nicht-viralen Vektors, ist die einfache Variierbarkeit der Monomere sowie die leichte Einführung von chemischen Funktionalitäten.

Obwohl die Abschirmung der kationischen Ladungen eine Lösung für das *charge dilemma* darstellt, führt es wiederum zu einer neuen Problemstellung. Es konnten zwar unspezifische Interaktionen reduziert und damit die Bioverträglichkeit erhöht werden, aber es wird auch gleichzeitig die Interaktion mit der Zellmembran für eine hohe Zellaufnahme *via* adsorptionsvermittelter Endozytose maßgeblich gehemmt. Die Transfektionseffizienz leidet durch die Abschirmung der kationischen Ladungen, da dadurch auch zusätzlich der endosomale Austritt nicht effizient genug ist. Es wurden mehrere Strategien entwickelt um dieses Dilemma zu überwinden. Eine Strategie beruht auf der Ausnutzung der biologischen Umgebung, indem Säure-labile oder reduktiv-spaltbare Linker in die Polymerstruktur eingeführt werden. Diese Polymere werden als stimuliresponsiv bezeichnet. Eine Alternative liefert die Modifikation der hydrophilen Hülle mit Molekülen für eine Rezeptor-vermittelte Endozytose. Beide Lösungsansätze sollen im Folgenden diskutiert werden.

2.4.3 Stimuliresponsive Polymere mit einem spaltbaren Disulfid-Linker

Wie bereits erwähnt führt die Abschirmung der kationischen Ladungen durch Polymere mit Stealth-Eigenschaften zu verringerter Zellaufnahme und Freisetzung aus dem Endosom als auch zur reduzierten Freilassung der DNA aus dem Komplex.^[3] Aus diesem Grund ist man bemüht die abschirmende Hülle vor oder während des Zelleintritts abzuspalten. Zu diesem Zweck kann ein reduktiv-spaltbarer Disulfid-Linker in die Polymerstruktur zwischen dem hydrophilen und kationischen Polymerblock eingeführt werden. In diesem Zusammenhang sollen nur ein paar Literaturbeispiele genannt werden. *Zentel et al.*^[107] entwickelte ein Blockkationomer mit einem Disulfid-Linker zwischen dem kationischen Poly(L-lysin) und dem hydrophilen Poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamid *via* RAFT-Polymerisation. Durch die Einführung der Disulfid-Brücke konnte er die Gentransfektionseffizienz um ein Fünffaches erhöhen, ohne die Zytotoxizität zu steigern.^[107] *Zhong et al.*^[108] verwendete ein Triblockcopolymer, bestehend aus dem kationischen Poly(2-dimethylaminoethylmethacrylat), welches durch einen Disulfid-Linker von beiden Seiten an das hydrophile PEG-Polymer gebunden war. Er erzielte eine 28-fache Steigerung der Gentransfektionseffizienz im Vergleich zu dem nicht spaltbaren Referenzpolymer.^[108] Ein weiteres publiziertes Beispiel, ist das von *Kataoka et al.* synthetisierte Poly(ethylenglycol)-SS-Poly(*N*-[*N*-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl]aspartamid) (PEG-SS-[PAsp(DET)])-Blockkationomer. Durch die Einführung der Disulfid-Brücke wurde die Gentransfektionsaktivität um das Dreifache gesteigert.^[109,110] Um dem Mechanismus der PEG-Abspaltung während des Gentransfers *in vitro* aufzuklären, benutzte *Kataoka et al.* eine ³²P-radiogelabelte DNA und beobachtete die Zellaufnahme in HeLa-Zellen.^[109] Die Komplexe aus PEG-SS-P[Asp(DET)] und PEG-*b*-P[Asp(DET)] wurden zu 0.5% in die Zellen aufgenommen, während das P[Asp(DET)]-Homopolymer 2-4% Zellaufnahme zeigte. Vermutlich ist das auf die höhere Zellaufnahme durch die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den positiven Ladungen des Komplexes mit P[PAsp(DET)] und den negativen Ladungen der Plasmamembran zurückzuführen. Da es keinen Unterschied bei der Zellaufnahme der PEG-*b*-P[Asp(DET)]- und PEG-SS-P[Asp(DET)]-Mizellen gab, wurde

davon ausgegangen, dass die PEG-Hülle nicht im extrazellulärem Raum gespalten wurde. Mit Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)-Aufnahmen konnte festgestellt werden, dass der endosomale Austritt der PEG-SS-P[PAsp(DET)]-Mizellen schneller und effizienter war, als der PEG-*b*-P[PAsp(DET)]-Mizellen. Dieses Ergebnis machte deutlich, dass die reduktive Spaltung der Disulfid-Brücke während des endozytotischen Weges, vermutlich im Endosom, abläuft.^[109] Kataoka zeigte die Steigerung der Gentransfektionseffizienz durch Einführung einer Disulfidgruppe nicht nur *in vitro*, sondern mithilfe eines peritonealen Krebsmodells auch *in vivo*. Er stellte fest, dass PEG-SS-P[PAsp(DET)]-Mizellen eine höhere Genexpression in Tumoren hatten als die PEG-*b*-P[PAsp(DET)]-Mizellen, während die Bioverteilung der Komplexe identisch blieb. Bei der Komplexierung der Plasmid-DNA mit der Codierung für den menschlichen Tumornekrosefaktor α (hTNF- α) wurde mit PEG-SS-P[Asp(DET)]-Mizellen eine fünffach höhere Anti-Tumor-Aktivität in Tumoren erreicht als mit den unspaltbaren Polyplexmizellen. Dabei wurde weder hepatische, noch renale Toxizität beobachtet.^[110] Durch die Einführung eines reduktiv-spaltbaren Linkers in die Schale-Kern-Architektur der Polyplexmizelle wurde erfolgreich die Gentransfektionseffizienz *in vivo* und *in vitro* gesteigert, ohne dabei die Zytotoxizität zu erhöhen. Dabei bleibt es zu erwähnen, dass bioreduktiv-spaltbare Disulfid-Linker insbesondere für die Anwendung in der Krebstherapie eine Rolle spielen, da Krebszellen eine erhöhte intrazelluläre Gluthathion-Konzentration haben als gesunde Zellen.^[111]

Die zweite Alternative um das Dilemma der Abschirmung zu entgehen ist die Einführung eines Liganden, der eine Rezeptor-vermittelte und damit einen sowohl spezifischen als auch selektiven Gentransport ermöglicht. Diese Strategie soll im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

2.4.4 Zellspezifisches Targeting – aktiver und passiver Gentransport

In diesem Abschnitt der Einleitung sollen die unterschiedlichen Targeting-Formen für den Gentransport in Zellen beschrieben werden. Das bekannteste Prinzip des passiven

Targetings beruht auf dem so genannten *Enhanced Permeability Retention* (EPR)-Effekt (Abbildung 8).^[112,113]

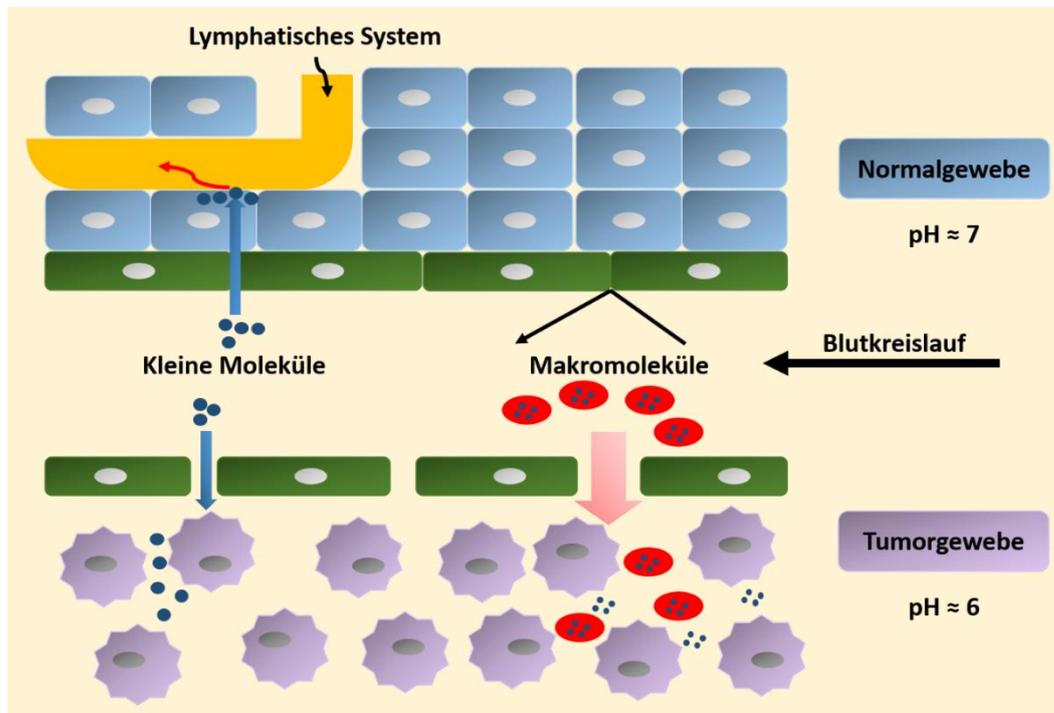


Abbildung 8 Schematische Darstellung des EPR-Effektes.^[114]

Die Anreicherung von Makromolekülen und der selektive Transport sind aufgrund der erhöhten Durchlässigkeit und einer geringen Lymphdrainage des Tumorgewebes möglich. Im Gegensatz zu gesundem Gewebe, benötigt das Tumorgewebe eine erhöhte Versorgung mit Nährstoffen, was zu einem raschen Wachstum von Blutgefäßen führt, deren Endothelzellschicht teilweise lückenhaft und porös ist. Das macht die Diffusion sowohl kleiner als auch großer Moleküle in das Tumorgewebe möglich, wobei Makromoleküle aufgrund der geringen lymphatischen Ausscheidung zurückgehalten und somit passiv angereichert werden. Dabei beeinflussen zahlreiche Parameter, wie Molekulargewicht, Ladung, Konformation und Hydrophobizität der Nano- und Makromoleküle die Bioverteilung und Aufnahme in das Tumorgewebe.^[114] Allgemein gilt, dass Moleküle mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa und einer neutralen Ladung eine lange Plasmahalbwertszeit besitzen.^[115,116] Der Eintritt in die Zelle erfolgt *via* Endozytose, wobei

zwischen Rezeptor- oder adsorptiv-vermittelter oder Flüssigphasen-Endozytose unterschieden wird (Abbildung 9).^[117]

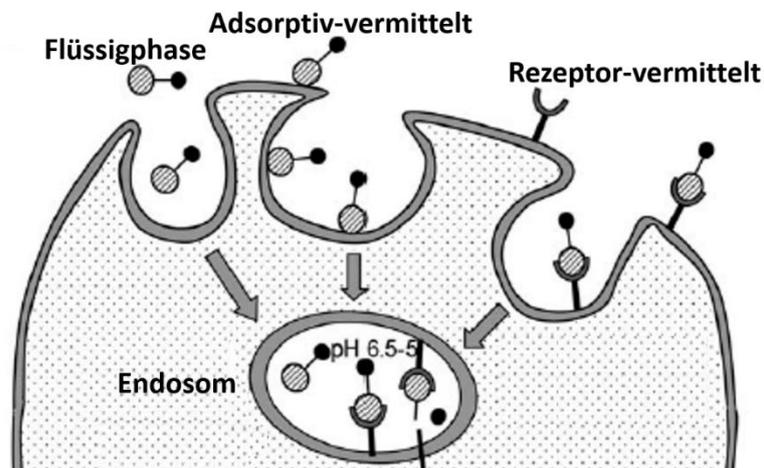


Abbildung 9 Endozytotische Wege für die zelluläre Aufnahme von Nano- und Makromolekülen.^[114]

Die adsorptiv-vermittelte Endozytose ist eine passive Form der zellulären Aufnahme, wobei Eigenschaften wie Größe, Form und Oberflächenladung der Partikel eine große Rolle für eine ausreichende Interaktion mit der Zellmembran spielen. Dabei stehen vor allem elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem Partikel und der Zellmembran im Vordergrund. Da jedoch die meisten Zelltypen über eine negativ geladene Zelloberfläche verfügen, fehlt bei der Zellaufnahme jegliche Spezifität. Diese ist insbesondere für die *in vivo* Anwendung der Gentherapie von großer Bedeutung. Bei der intravenösen Gabe kommen die Vektoren mit vielen unterschiedlichen Zelltypen in Berührung. Für eine hohe Wirksamkeit des therapeutischen Gens in der Zielzelle ist eine spezifische Aufnahme erstrebenswert. Hierfür kann der Vektor mit einem Liganden (Schlüssel) modifiziert werden, der die Interaktion mit einem zellspezifischen Rezeptor (Schloss) auf der Zelloberfläche der Zielzellen vermittelt. Dieses Konzept wird als *aktives* oder *cell surface Targeting* bezeichnet.^[118] Die Liganden können dabei niedermolekulare Substanzen wie Zucker, Vitamine, Peptide, Antibiotika oder Makromoleküle wie Proteine, Polysaccharide und Nukleinsäuren, so genannte Aptamere, sein. Tumorzellen haben die Eigenschaft, dass aufgrund ihrer erhöhten metabolischen Aktivität bestimmte Rezeptoren auf der

Zelloberfläche überexprimiert vorliegen. Deswegen bieten sich vor allem Wachstumsfaktoren und Vitamine als Liganden für das Adressieren von soliden Tumoren an.^[118] Ganz gleich ob die Endozytose adsorptiv- oder Rezeptor-vermittelt abläuft, beim Eintritt in das Endosom fällt der pH-Wert von pH 7.2-7.4 auf pH 6.5-5.0 ab. Deswegen ist der Gentransport besonders effektiv, wenn ein aktiver Ligand mit einem pH-sensitiven Polymer kombiniert wird, das eine verbesserte Freisetzung aus dem Endosom gewährleistet. Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass Transferrin gekoppeltes PEI zielgerichtet in Tumoren angereichert wird und in den Zielzellen eine effiziente Expression des therapeutisch wirksamen Transgenprodukts ausführt.^[119] Da der endosomale Austritt die limitierende Größe für einen effizienten Gentransport darstellt, soll dieser Aspekt im folgenden Kapitel näher diskutiert werden.

2.4.5 Endosomalen Austritt effizienter gestalten – Poly(aspartat) (PAsp)

Der endosomale Austritt ist der wichtigste Schritt für eine hohe Gentransfektion. Dabei muss das Polymersystem der Herausforderung gerecht werden, die endosomale Membran zu durchbrechen ohne die zytoplasmatische und mitochondriale Membran zu destabilisieren. Polyplexmizellen aus Poly(ethylenimin) (PEI) sind dafür bekannt effizient aus dem Endosom freigesetzt zu werden. Verantwortlich dafür ist die hohe Pufferkapazität, die durch die unterschiedlichen pK_s-Werte der Amin-Gruppen im Polymer hervorgerufen werden. Im physiologischen pH-Bereich liegt nur jedes dritte Stickstoff-Atom protoniert vor. Durch Abfall des pH-Wertes im Endosom werden auch die restlichen Amin-Gruppen protoniert, sodass eine gute Puffer-Kapazität vorliegt und es zu dem so genannten Protonenschwamm-Effekt führt. Durch das Abfangen der einströmenden Protonen und dem anschließenden Chloridionen- und Wasser-Einstrom kommt es zum Platzen des Endosoms und damit zur erfolgreichen Freisetzung des Komplexes in das Zytoplasma. Eine gute Pufferkapazität des Polymers ist sehr wichtig, da ein stetiger Abfall des pH-Wertes zusätzlich lysosomale Enzyme, wie Nukleasen, Proteasen, Esterasen, Lipasen und Phosphatasen aktivieren würde, die zum Abbau des Komplexes führen würden.^[46] Allerdings

ist eines der größten Nachteile von PEI die akute Zytotoxizität, bedingt durch die erhöhte Wechselwirkung zwischen der hohen positiven Ladungsdichte des Polymers und der Zytoplasma- und mitochondrialen Membran. Daher ist die Entwicklung eines alternativen Polykations erstrebenswert. Dieses sollte gleichermaßen gute Pufferkapazitäten aufweisen und gleichzeitig eine reduzierte akute und bestenfalls kumulative Toxizität gewährleisten können. *Kataoka* et al. konnten ein solches alternatives Polykation darstellen, welches aus einem bioabbaubaren Poly(aspartat) (PAsp)-Rückgrat und einer kationischen Diethylentriamin (DET) Seitenkette besteht.^[22,120–122] Abbildung 10 zeigt die Polymerstrukturen von linearem PEI und P[Asp(DET)] in einer direkten Gegenüberstellung.

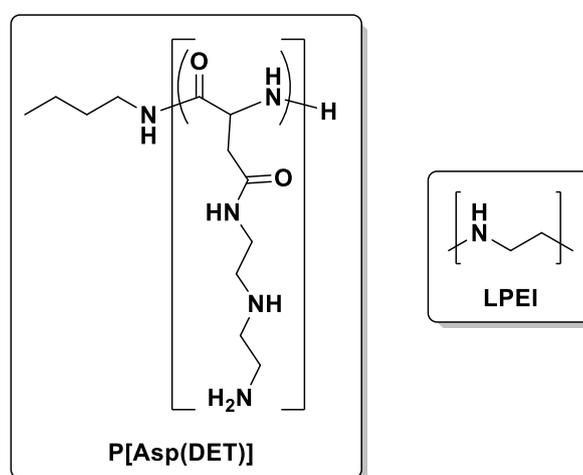


Abbildung 10 Polymerstrukturen von P[Asp(DET)] und linearem PEI.

Kataoka et al. fanden in Studien mit PEI heraus, dass die geradzahligen Aminoethylen-Einheiten wie DET und Triethylenpropanamin (TEP) eine erhöhte Pufferkapazität bei einem pH-Wert von 5.5, bedingt durch die unterschiedlichen pK_S-Werte der Amin-Gruppen, aufweisen (Abbildung 11).^[22]

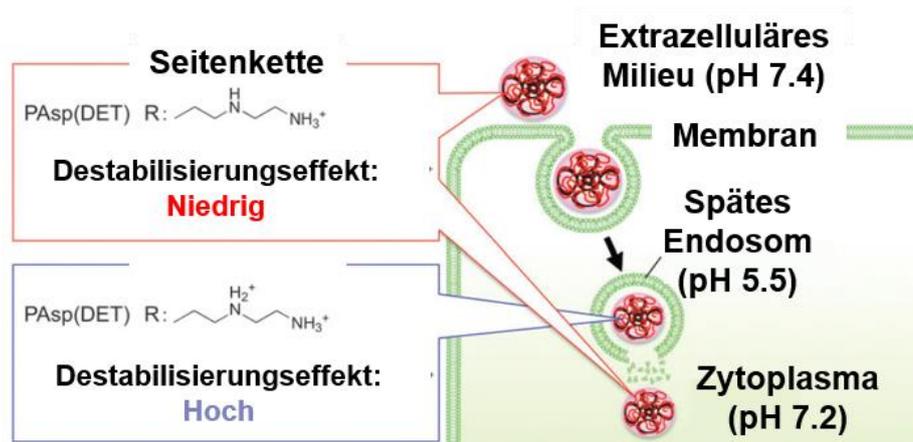


Abbildung 11 Protonierte Struktur von Polyplexmizellen aus P[Asp(DET)] in Abhängigkeit der pH-Änderung in der zellulären Umgebung.^[22]

Der Wechsel von der einfach positiv geladenen DET-Seitenkette im extrazellulärem Milieu zu der zweifach positiv geladenen in endosomaler Umgebung, sind der Schlüssel für einen effizienten endosomalen Austritt. Während die einfache Protonierung im extrazellulärem Milieu und im Zytoplasma keine destabilisierende Wirkung auf die Zellmembran bzw. Zytoplasmamembran ausübt, bewirkt die zweifache Protonierung durch destabilisierende Effekte und den Protonen-Schwamm-Effekt einen effizienten endosomalen Austritt bei gleichzeitiger niedriger Zytotoxizität. Weiterhin wird durch die Biodegradierbarkeit des PAsp-Rückgrats zusätzlich die kumulative Toxizität herabgesenkt.^[122] Durch eine zusätzliche PEGylierung wurden biokompatible nicht-virale Vektoren mit Durchmesser von 20-50 nm ausgebildet, die sich für den Gentransport bewährt haben.^[123] Andere geeignete Alternativen für PEI sind unter anderem Poly-L-Succinimid^[124], Poly-L-Glutaminsäure^[125] und Chitosan^[126], die hier nur kurz genannt werden sollen. Mit diesen Polymeren wurden zum 25-K-PEI vergleichbar hohe Transfektionsraten bei deutlich niedrigerer Zelltoxizität erreicht.

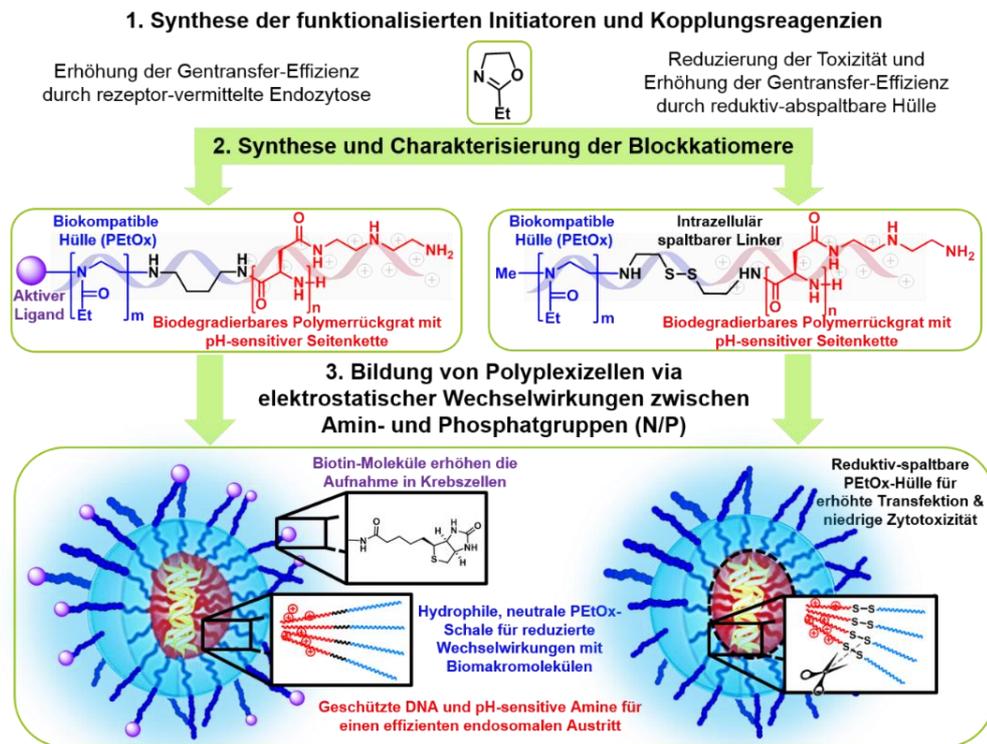
2.5 Klinische Studien

Im Jahr 1990 wurde die erste Gentherapie an einem Patienten durchgeführt. Amerikanische Wissenschaftler verabreichten einem vierjährigen Mädchen, welches mit

einem Adenosindeaminase (ADA)-Mangel geboren wurde, die erste Infusion autologer T-Lymphozyten, in die ein funktionsfähiges ADA-Gen eingebracht worden war. Die angeborene Immunstörung verläuft meist tödlich, da das Immunsystem nicht in der Lage ist selbstständig Krankheitserreger zu bekämpfen. Dank der verabreichten Gentherapie ist Ashanti DeSilva heute 33 Jahre alt und lebt ein fast normales Leben. Seitdem wurden ca. 1 700 klinische Studien durchgeführt mit mehr als 10 000 Patienten.^[5] Im Jahr 2011 wurde von 92 Studien weltweit berichtet. Davon waren 59.6% in der klinischen Phase I und nur 3.6% in der klinischen Phase III. Die meisten Studien untersuchten virale Vektoren (67%) und Krebserkrankungen (65%), wobei vorwiegend Antigene und suizidale Gene verwendet wurden.^[3,5] Das erste Medikament in der EU, das auf Gentransfer basiert, wurde im Jahr 2012 zugelassen und heißt *Glybera*. Es ist ein Mittel für Patienten mit einem Lipoprotein-Lipase-Mangel. Es wurde ein adeno-assoziiertes Virus als Vektor verwendet, um eine funktionsfähige Kopie von Lipoprotein-Lipase-Gene in Muskelzellen einzuschleusen.^[3,5] *Glybera* wurde von der Firma *GlaxoSmithKline* in London entwickelt und für 1 Million US-Dollar pro Behandlung zu Verfügung gestellt. Es wurde bisher nur ein einziger Patient damit behandelt. Die Fettkonzentration in seinem Blut konnte erfolgreich innerhalb von 3-12 Wochen reduziert werden.^[5] Die Firma *Spark Therapeutics* entwickelte im Jahr 2013 in Philadelphia eine Gentherapie namens *Luxturna*, die ebenfalls auf der Verwendung von adeno-assoziierten Viren basiert und gegen eine seltene Form von Blindheit wirkt.^[5] *Luxturna* wurde im Jahr 2017 von der FDA (Food and Drug Administration) zugelassen. In klinischen Phasen konnten mehr als 21 Patienten mit einer einzelnen Behandlung geholfen werden. Dabei erfolgt die Injektion direkt in das Auge des Patienten. Die Kosten dieser Therapie betragen 425 000 US-Dollar pro Auge.^[5] Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Gentherapie ein großes Potential zur Behandlung von Krebskrankheiten und monogenen Krankheiten hat. Allerdings ist die Verwendung von viralen Vektoren sehr kostenintensiv, was die Nutzung und Anwendbarkeit stark limitiert. Aus diesem Grund soll in der vorliegenden Arbeit ein nicht-viraler Vektor auf Basis von kostengünstigen und gut reproduzierbaren Polymeren entwickelt werden.

3 Aufgabenstellung und Zielsetzung

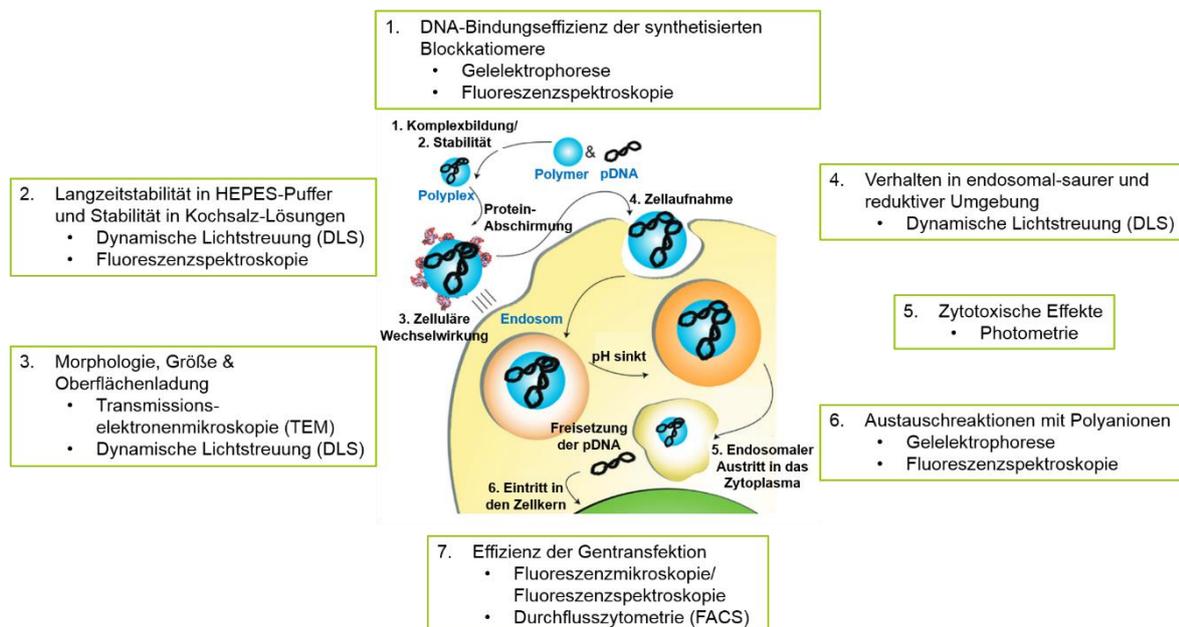
Das Hauptziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Blockkationers, welches als nicht-viraler Genvektor für Plasmid-DNA (pDNA) dient und eine minimale Zytotoxizität neben maximaler Gentransfektionseffizienz liefert. Biokompatibilität und Biodegradierbarkeit des Polymersystems sind Voraussetzung für eine niedrige Zytotoxizität. Aus diesem Grund sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit biokompatible Blockkationere auf der Basis von hydrophilen Poly(2-oxazolin)en, welche mit dem bioabbaubaren Poly(aspartamid) (PAsp)-Block kombiniert werden, synthetisiert und charakterisiert werden. In Hinblick auf eine hohe Gentransfereffizienz ist ein effektiver endosomaler Austritt entscheidend. Aus diesem Grund soll der Poly(aspartamid) (PAsp)-Block mit einer pH-sensitiven *N*-(2-Aminoethyl)-2-aminoethyl (DET)-Seitenkette, welche Puffereigenschaften in endosomal-saurer Umgebung hat, modifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollen zunächst anhand strukturell eindeutig definierter Blockkationere mit der Struktur $\text{PMOx}_n\text{-}b\text{-P[Asp(DET)]}_m$ Struktur-Eigenschaftsbeziehungen untersucht werden, die im Kapitel 4 näher beschrieben werden. Dabei sollen nicht nur die optimalen Polymereigenschaften, wie Molmasse und Blocklänge, sondern auch das optimale N/P-Verhältnis ermittelt werden. Dabei steht N für die Anzahl der kationischen Amine im Blockkationier, während P die Anzahl der Phosphatgruppen der pDNA ist. Darüber hinaus sollen im Kapitel 4 die Zusammenhänge zwischen unterschiedlichen DNA-Sequenzen und Konzentrationen und den Eigenschaften der Polyplexmizellen untersucht werden. Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Gentransfereffizienz signifikant zu steigern ohne die Zytotoxizität zu erhöhen. Um dieses Ziel zu erreichen, werden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt (Schema 1).



Schema 1 Schematische Darstellung der Zielsetzung die Gentransfereffizienz zu verbessern ohne die Zytotoxizität zu erhöhen.

Der erste Ansatz, welcher in Kapitel 5 detailliert vorgestellt wird, beschäftigt sich mit der Einführung eines biosplaltbaren Disulfid-Linkers in die Polymerstruktur. Das Ziel ist es ein Blockkatiomer mit der Struktur $\text{PEtOx}_n\text{-SS-P[Asp(DET)]}_m$ zu synthetisieren, welches mit pDNA eine Polyplexmizelle mit einer reaktiv absplaltbaren PEtOx-Hülle formt. Dadurch soll die Zytotoxizität reduziert werden und vor allem die Gentransfereffizienz durch Abspaltung der abschirmenden PEtOx-Palisade maßgeblich erhöht werden. Der zweite Ansatz, welches das Kapitel 6 umfasst, befasst sich mit der Steigerung der Gentransfereffizienz durch Einführung eines aktiven Targeting-Liganden in die Polymerstruktur, um die Zellaufnahme der Polyplexmizellen durch Vitamin-spezifische Rezeptoren gewährleisten zu können. Das Ziel ist es hierbei ein Biotin-funktionalisiertes Blockkatiomer mit der Struktur $\text{Biotin-PEtOx}_n\text{-b-P[Asp(DET)]}_m$ zu synthetisieren, welches mit pDNA Biotin-funktionalisierte Polyplexmizellen bilden soll. Dabei soll Biotin als aktiver Ligand zum einen den Gentransport spezifischer machen und zum anderen die Gentransfereffizienz aufgrund

Rezeptor-vermittelter Aufnahme erhöhen. In allen Teilbereichen dieser Arbeit sollen die Blockkationere aufgrund der protonierbaren Amine in der DET-Seitenkette durch einfaches Mischen mit der pDNA-Lösung, Polyplexmizellen mit verschiedenen N/P-Verhältnissen bilden. Die gebildeten Polyplexmizellen sollen eine geeignete Schale-Kern-Mizellenstruktur aufweisen mit einer hydrophilen Poly(2-oxazolin)-Hülle, welche die kationische Ladungsdichte abschirmen und somit die Wechselwirkung mit Biomakromolekülen und Serumproteinen reduzieren soll. Im Kern der Polyplexmizelle soll die DNA effizient vor Nuklease-Angriffen geschützt werden. Als weiteres Ziel dieser Arbeit, sollen die gebildeten Polyplexmizellen hinsichtlich der bekannten biologischen Barrieren für nicht-virale Genvektoren^[29] (A-E) charakterisiert werden (Schema 2).



Schema 2 Schematische Darstellung der einzelnen Untersuchungen der Polyplexmizellen nach den bekannten biologischen Barrieren (A-E) für nicht-virale Genvektoren.

In Hinblick auf eine effiziente DNA-Komplexierung (A), sollen die synthetisierten Blockkationere auf ihre Bindungseffizienz und zytotoxischen Effekte charakterisiert werden. Um Aufschlüsse über eine optimale Zellaufnahme (C) treffen zu können, sollen die Morphologie, Größe und Oberflächenladung der Polymer/pDNA-Komplexe untersucht werden. Zusätzlich sollen die Langzeitstabilitäten in HEPES-Puffer und gegen Salz-

induzierte Aggregationen in 50 mM und 150 mM Kochsalz-Lösung studiert werden (**B**). In Hinblick auf die unterschiedliche physiologische Mikroumgebung innerhalb des Gentransports im Körper, soll das Verhalten der Polyplexmizellen in endosomal-saurer und reduktiver Umgebung untersucht werden. Für eine erfolgreiche Genexpression (**D-E**), soll die Freisetzung der DNA aus dem Komplex und die Effizienz der Gentransfektion ermittelt werden.

4 Biokompatible PMOx-b-P[Asp(DET)] Blockkatiomere für den Gentransport

4.1 Einleitung

Ein großer Nachteil bei der Verwendung von Viren in der Gentherapie, sind die hohen Kosten und die aufwendige Herstellung. Daher besteht ein großes Interesse daran, die Entwicklung von nicht-viralen Genvektoren voranzutreiben. So wurden über die letzten Jahre Genvektoren auf Basis von verschiedenen Polymerarchitekturen wie Homopolymeren^[127], Copolymeren^[101,128,129] und Blockcopolymeren^[107,130–132] entwickelt und untersucht. Der „Goldstandard“ ist bisher das Poly(ethylenimin) (PEI). Aufgrund der hohen kationischen Ladungsdichte ist PEI in der Lage die DNA effektiv zu verpacken und in hoher Effizienz in Zellen zu transfizieren. Die hohe Ladungsdichte bringt jedoch auch Nachteile mit sich, wie eine hohe Zytotoxizität und nicht-spezifische Wechselwirkungen mit Biomakromolekülen, welche *in vivo* zu Aggregatbildungen und somit zu Gefäßverschlüssen und Thrombosebildungen führt.^[127] Ein möglicher Ansatz zur Reduzierung der Zytotoxizität ist die Abschirmung der kationischen Ladungen durch Einführung eines hydrophilen und neutral geladenen Polymerblockes, wie Polyethylenglycol (PEG).^[131]

Hinsichtlich der Entwicklung einer geeigneten Polymerstruktur in dieser Dissertationsarbeit, besteht der erste Polymerblock aus einem hydrophilen, neutral geladenen Polymer wie Poly(2-methyl/2-ethyl-2-oxazolin)^[132,133] und einem zweitem Polymerblock, welcher kationisch geladen ist. Letzterer Polymerblock ist in der Lage die DNA durch elektrostatische Wechselwirkungen im Kern zu verpacken. Bekannte Polymere sind Poly(ethylenimin) (PEI)^[127], Poly-L-Lysin (PLL)^[107,130,132], Poly(2-(Dimethylamino)ethylmethacrylat)^[131] oder Poly[N-(2-Aminoethyl)-2-aminoethyl]aspartamid (P[Asp(DET)])^[134]. Die meisten solcher Blockkatiomere erfordern eine mehrstufige und aufwändige Synthesepipeline und -durchführung. Aus diesem Grund soll in diesem Abschnitt der Arbeit eine einfache, dreistufige Syntheseroute mit kommerziell erwerblichen Edukten vorgestellt werden. Des Weiteren soll die Abschirmung

der kationischen Ladungen durch das ebenfalls hydrophile und neutral geladene Polymer, Poly(2-methyl-2-oxazolin) (PMOx) erfolgen. Da neueste Studien gezeigt haben, dass PEG vermehrt allergische Reaktionen hervorrufen kann^[37,135,136], gibt es großes Interesse nach einem angemessenen Ersatzpolymer. Polymere auf Basis von Poly(2-oxazolin) rücken deswegen immer mehr in den Vordergrund, vor allem in Hinblick auf biomedizinische Anwendungen.^[37,135] Sie verfügen ähnlich wie das PEG über Stealth-Eigenschaften und sind biokompatibel. Die Eigenschaften der Poly(2-oxazolin) können durch den Einsatz der Monomere, Initiatoren und Terminierungsreagenzien in einer lebenden Polymerisation beliebig eingestellt werden.^[96] Bisher gibt es in der Literatur jedoch nur wenige Beispiele für die Verwendung von Poly(2-oxazolin)-basierten Blockkationeren als nicht-virale Genvektoren.^[132–134] Oft wird dabei nur eine einzige Polymerarchitektur untersucht, sodass es kaum Daten über die Einflüsse verschiedener Polymerzusammensetzungen auf den Gentransport gibt.

4.2 Zielsetzung

In diesem Abschnitt der Arbeit sollen anhand einer einfachen dreistufigen Synthese, vier verschiedene Blockkationere synthetisiert werden, die sich in den molaren Massen und Blocklängenverhältnissen unterscheiden. Die daraus gebildeten Polyplexmizellen sollen im Anschluss hinsichtlich ihrer DNA-Bindungseffizienz, Komplexgröße, Oberflächenladung und der Gentransfereffizienz untersucht werden. Alle Blockkationere sollen aus einem hydrophilen und neutral geladenen Poly(2-methyl-2-oxazolin) (PMOx) bestehen, das mit dem biodegradierbaren Poly(aspartat) (PAsp), welches mit der DET-Seitenkette modifiziert vorliegt, kombiniert werden soll (Abbildung 12).

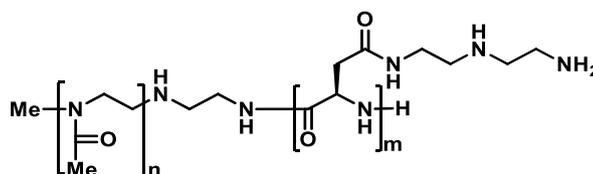


Abbildung 12 Zielstruktur der biokompatiblen Blockkationere.

Um sich von der bisher veröffentlichten Syntheseroute für $\text{PMOx}_n\text{-}b\text{-P[Asp(DET)]}_m$ ^[134] abzuheben, sollen die Blockkatiomere in einer einfachen Synthese mit kommerziell erhältlichen Edukten und in guten Gesamtausbeuten hergestellt werden. Dazu sollen aufwändige und nicht-quantitative polymeranaloge Reaktionen umgangen werden. In diesem Abschnitt wird vor allem die Polymerarchitektur hervorgehoben. Zwei der Polymere sollen deshalb unterschiedliche molare Massen besitzen, sodass eines eine größere und das andere eine kleinere Molmasse als 10 kDa aufweisen. Die beiden verbleibenden Polymere sollen sich in den Blocklängenverhältnissen des hydrophilen PMOx- und des kationischen P[Asp(DET)]-Polymersegmentes unterscheiden. Alle hier synthetisierten Blockkatiomere werden mittels ¹H-NMR- und IR-Spektroskopie, sowie GPC-Analysen vollständig charakterisiert. Alle vier Blockkatiomere mit der Struktur $\text{PMOx}_n\text{-}b\text{-P[Asp(DET)]}_m$ sollen biokompatibel sein und in der Lage sein die negativ geladene DNA durch elektrostatische Wechselwirkungen im Kern zu verpacken. Die daraus resultierenden Polyplexmizellen sollen eine biokompatible Schale-Kern Struktur besitzen (Abbildung 13).

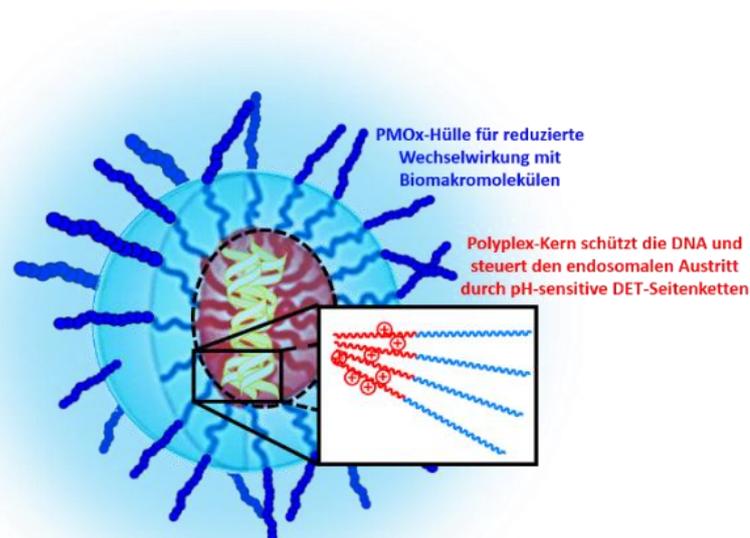


Abbildung 13 Schematische Darstellung der Polyplexmizelle aus dem Blockkatiomer $\text{PMOx}_n\text{-}b\text{-P[Asp(DET)]}_m$.

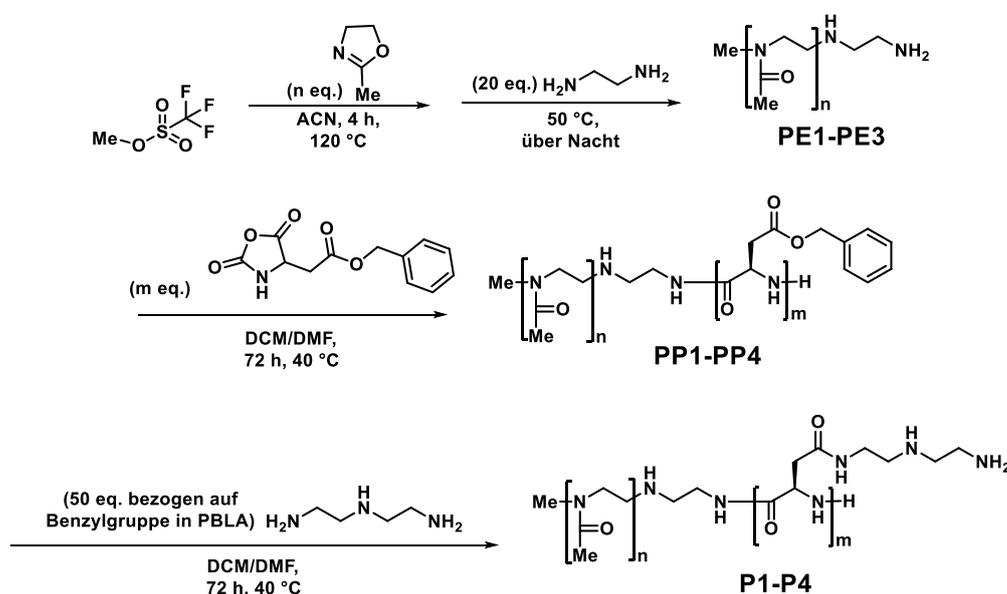
Die hydrophile PMOx-Hülle soll die kationische Ladungsdichte abschirmen und somit die Wechselwirkung mit Biomakromolekülen und Serumproteinen reduzieren. Weiterhin soll durch eine neutrale PMOx-Schale die Zytotoxizität minimiert werden. Im Kern der Polyplexmizelle, soll die DNA effizient vor Nuklease-Angriffen geschützt werden. Die pH-empfindlichen DET-Seitenketten sollen außerdem aufgrund ihrer puffernden Eigenschaften, den endosomalen Austritt induzieren und somit zu einer hohen Gentransfektionseffizienz beitragen. Anhand der unterschiedlichen Polymerarchitekturen soll analysiert werden, welche Polymereigenschaften einen Effekt auf die Bildung und Eigenschaften der daraus gebildeten Polyplexmizellen haben. Die vier Blockkationere sollen dabei auf ihre Bindungseffizienz an die DNA und eine mögliche Zytotoxizität untersucht werden. Die gebildeten Polyplexmizellen sollen weiterhin auf Stabilität, Größe, Oberflächenladung, Morphologie und Gentransfektionseffizienz untersucht werden. Dabei liegt der Fokus nicht nur auf der Polymerarchitektur, sondern auch auf dem N/P-Verhältnis und dessen Einfluss auf die zuvor genannten Eigenschaften der Polyplexmizellen. Die Ermittlung eines optimalen N/P-Verhältnisses und einer optimalen Polymerstruktur soll für weiterführende Arbeiten genutzt werden. Ein weiteres Ziel in diesem Abschnitt, ist die Untersuchung der Einflüsse unterschiedlicher DNA-Sequenzen und Konzentrationen. Dabei werden für die Bildung der Polyplexmizellen jeweils peGFP und pCherry in den Konzentrationen 100 ng/μL und 200 ng/μL verwendet.

4.3 Ergebnisse und Diskussion

4.3.1 Synthese und Charakterisierung der Blockkationere PMOx-b-P[Asp(DET)]

Es wurden vier Blockkationere basierend auf dem hydrophilen Poly(2-methyl-2-oxazolin) (PMOx) und des bioabbaubaren Poly(aspartat)s (PAsp), welches mit der kationischen Diethylentriamin (DET)-Seitenkette modifiziert vorliegt, synthetisiert. Die erste Stufe der Synthese ist die Darstellung der PMOx_n Homopolymere. *Huwyl*er und Mitarbeiter

synthetisierten hierfür ein Phthalimidethyltriflat, um einerseits die Polymerisation von MO_x zu initiieren und andererseits durch anschließende polymeranaloge Reaktion eine endständige primäre Amin-Gruppe zu generieren.^[134] Im Gegensatz dazu verwendeten wir das kommerziell erhältliche Methyltrifluormethansulfonat (Methyltriflat, MeOTf) als Initiator und generierten direkt eine primäre Amin-Gruppe durch Terminierung mit Ethylendiamin. Bei Verwendung von MeOTf als Initiator konnten die Polymere schneller in größeren Mengen reproduzierbar hergestellt werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass wir die fünf-stufige Synthese von *Huwyler*^[134] um zwei Synthesestufen verkürzen konnten. Die Blockkatiomere **P1-P4** wurden in einer dreistufigen Synthese nach Schema 3 hergestellt.



Schema 3 Syntheschema zur Darstellung der Blockkatiomere PMO_x_n-b-P[Asp(DET)]_m (**P1-P4**).

Unsere Syntheseroute des Blockkatiomers beinhaltet lediglich die Aminolyse des Poly(β -benzyl-L-aspartat)s (PBLA) mit DET als eine polymeranaloge Reaktion. In vorangegangenen Studien^[137] wurde jedoch festgestellt, dass diese polymeranaloge Reaktion nach 48 h quantitativ ist. Da es sich hierbei um lebendige Polymerisationsmechanismen handelte, wurden die vier Blockkatiomere mit definierten Blocklängen und molaren Massen mit einer engen Molmassenverteilung ($\text{\textcircled{D}}$) synthetisiert. In dem folgenden Abschnitt werden die einzelnen Syntheseschritte detailliert beschrieben.

Synthese und Charakterisierung der Amin-endständigen Makroinitiatoren Poly(2-methyl-2-oxazolin) PE1-PE3. Die drei PMOx_n Homopolymere **PE1-PE3** wurden in einer kationisch, ringöffnenden Polymerisation hergestellt. Bei allen drei Polymerisationen wurde Methyltriflat als Initiator verwendet. Da es sich um eine lebende Polymerisation handelt, wurden die Wiederholungseinheiten der PMOx_n Homopolymere über das Monomer zu Initiator Verhältnis eingestellt. Die Polymerisationen wurden 4 h bei 120 °C in Acetonitril durchgeführt. Ethylendiamin wurde als Terminierungsreagenz in einem 20-fachen Überschuss eingesetzt, um eine primäre Amin-Gruppe als Endgruppe zu generieren, welche ohne weitere Modifikation in der darauffolgenden nukleophil ringöffnenden Polymerisation genutzt werden konnte. Die Kernresonanzspektroskopie (¹H-NMR) ist eine geeignete Methode, um das zahlenmittlere Molekulargewicht (M_n) von Polymeren zu bestimmen. Aus dem Flächenverhältnis charakteristischer Signale der Monomereinheiten in Bezug auf das Referenzsignal des Initiators, wurde auf die Zusammensetzung der Homopolymere PMOx_n geschlossen. Damit wurde sowohl der Polymerisationsgrad, als auch die Molmassen der Polymere mithilfe der ¹H-NMR und der Endgruppenanalyse bestimmt (Abbildung 14A).

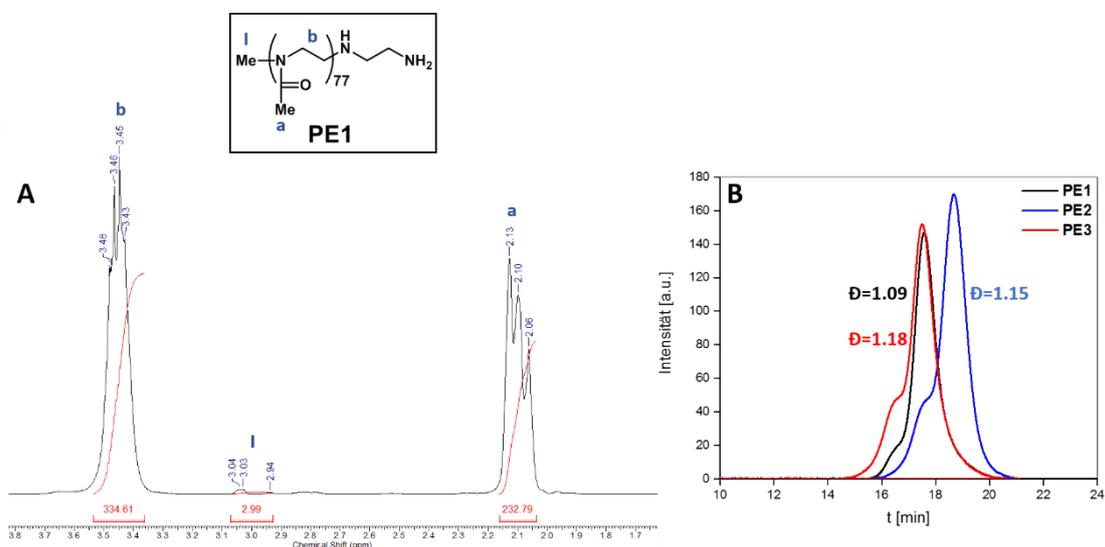


Abbildung 14 (A) ¹H-NMR Spektrum von **PE1** in CDCl₃; (B) GPC-Chromatogramme und Polydispersitätsindizes von **PE1-PE3**.

Das Signal im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von **PE1** bei 3.04-2.94 ppm wurde eindeutig der Methyl-Endgruppe zugeordnet, die von dem Initiator Methyltriflat generiert wurde. Dieses Referenzsignal *l* entspricht genau 3 Protonen. Durch das Referenzieren der Integrale der Signale *a* und *b*, wurde auf 77 Repetiereinheiten des 2-Methyl-2-oxazolins im Homopolymer **PE1** geschlossen. Daraus wurde eine zahlengemittelte Molekularmasse von ca. 6.6 kDa berechnet. Die Polymerisationsgrade und die molaren Massen der drei Homopolymere **PE1-PE3** werden in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2 Analytischen Daten der Homopolymere PMOx_n **PE1-PE3**.

No.	n ^{a)}	M _n ^{a)} [g/mol]	M _n ^{b)} [g/mol]	Đ ^{b)}	Ausbeute [%]
PE1	77 (70)	6 628	7 520	1.09	74
PE2	46 (40)	3 990	5 410	1.15	80
PE3	82 (70)	7 053	9 380	1.18	71

a) Polymerzusammensetzung und Molmassen wurden über $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie in CDCl_3 und Endgruppenanalyse bestimmt, die theoretisch eingesetzten Äquivalente sind in Klammern angegeben;
 b) Molmassen M_n und Polydispersitätsindex Đ wurden über die GPC-Analyse bestimmt (PMMA Standards in DMF, 5 mg/mL LiBr).

Es wurden Poly(2-methyl-2-oxazoline) mit einer Wiederholungseinheit von 77 (**PE1**), 46 (**PE2**) und 82 (**PE3**) erhalten. Die Polymere **PE1** und **PE3** hatten ähnliche molare Massen von ca. 7 kDa, während **PE2** mit ca. 4 kDa eine kleinere Molmasse aufwies. Die mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie ermittelten Molekularmassen und Polymerisationsgrade der Polymere **PE1-PE3** weichen etwas von den theoretischen Werten ab. Die Genauigkeit der ermittelten Polymerisationsgrade über die $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie hängt von der Integration des Initiatorsignals ab. Das Initiatorsignal liefert jedoch eine deutlich geringere Intensität im Vergleich zu den Polymersignalen. Zusätzlich kommt es zu einem hohen Signal-Rausch-Verhältnis durch die Ausbildung von relativ langen Polymerketten. Aus diesem Grund ist es notwendig, mit hohen Polymerkonzentrationen, längeren Relaxationszeiten und hohen Magnetfeldstärken (500 MHz) zu messen. Das zahlengemittelte Molekulargewicht der Homopolymere, welche über die GPC bestimmt wurde, weicht etwas von den mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum kalkulierten Molmassen ab. Diese Abweichung lässt sich darauf zurückführen, dass die GPC-Analyse eine Relativmethode ist und die Kalibrierung mit

Polymethylmethacrylat (PMMA) Standard nur eingeschränkt vergleichbar ist in den Lösungseigenschaften von Poly(2-methyl-2-oxazolin)en. Viel wichtiger als die zahlengemittelte molare Masse sind die Polydispersitätsindices, die die GPC-Analyse liefert. Anhand der Werte kann ermittelt werden, ob die Polymerisation nach einem lebenden Mechanismus abgelaufen ist. Alle drei Polymerisationen liefen erfolgreich nach einem lebenden Mechanismus ab, da die Polydispersitätsindices (\bar{M}_w/\bar{M}_n) eine enge Molmassenverteilung von 1.09-1.18 aufzeigten (Abbildung 14B). Die Werte repräsentieren eine monomodale Verteilung, sodass jegliche Nebenreaktionen ausgeschlossen wurden. Alle drei Homopolymere wurden durch Fällen aus kaltem Diethylether und anschließender Dialyse gegen Wasser gereinigt und nach der Gefriertrocknung in guten Ausbeuten als farblose Feststoffe erhalten.

Synthese und Charakterisierung der Blockcopolymeren PP1-PP4. Die Homopolymere **PE1-PE3** tragen endständige primäre Amine und fungieren in der lebenden, nukleophil ringöffnenden Polymerisation von β -Benzyl-L-Asparaginsäure-N-Carboxyanhydrid (BLA-NCA) als Makroinitiatoren. Das Homopolymer **PE1** bzw. **PE2** wurden als Initiatoren für die Synthese des Blockcopolymeren **PP1** bzw. **PP2** verwendet. Der Makroinitiator **PE3** wurde sowohl für die Synthese des Blockcopolymeren **PP3**, als auch für **PP4** eingesetzt. Der Erfolg der Blockcopolymerisation, d.h. die Molmasse und Polymerzusammensetzung wurden wieder mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie ermittelt. Die neuen Signale mit der chemischen Verschiebung von 2.60 (*b*), 2.81 (*b*), 4.61 (*d*), 5.00 (*e*), 7.27 (*f*) und 8.16 ppm (*g*) in dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von PMOx₈₂-*b*-PBLA₂₄ (**PP4**) zeigen die erfolgreiche Blockcopolymerisation (Abbildung 15).

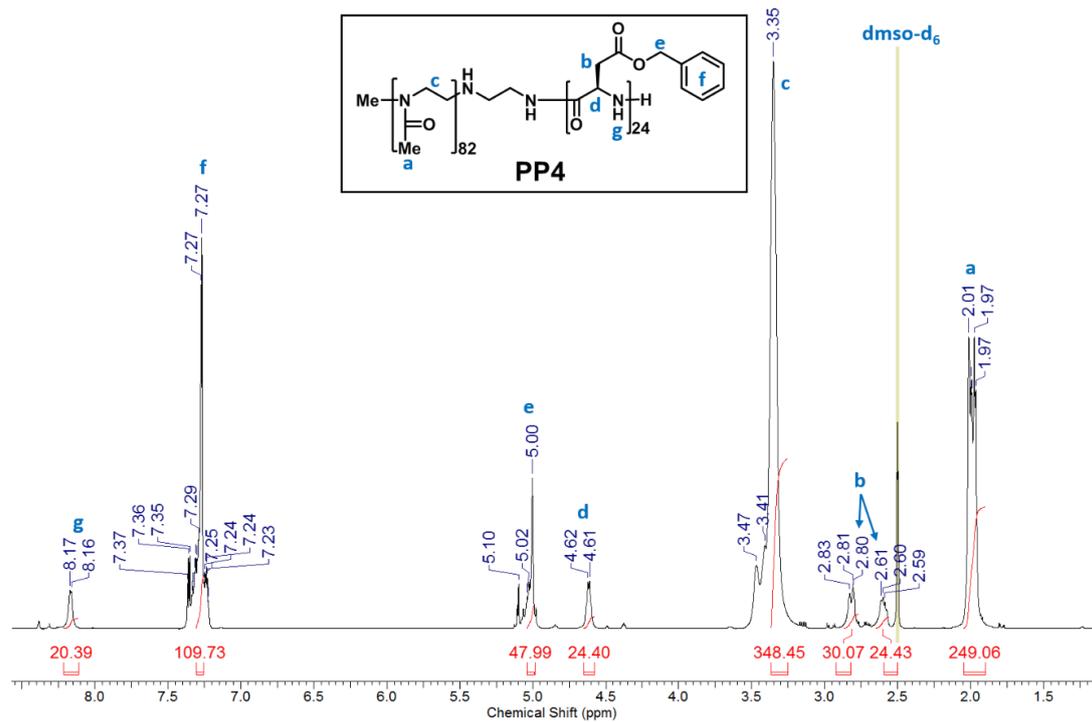


Abbildung 15 ¹H-NMR-Spektrum des Blockcopolymeres PMOx₈₂-b-PBLA₂₄ (**PP4**) in DMSO-d₆.

Der Polymerisationsgrad der Blockcopolymeren wurde aus den charakteristischen Signalen der Monomereinheiten kalkuliert. Das Signal *a* mit 250 Protonen wurde als Referenzsignal betrachtet. Somit ergibt sich für das Integral des charakteristischen Signals *d* 24 Repetiereinheiten des BLA-NCA. Die molaren Massen wurden basierend auf der Kalkulation der Wiederholungseinheiten berechnet. Der Erfolg der Blockcopolymerisation wurde weiterhin mittels GPC- und IR-Analysen belegt (Abbildung 16).

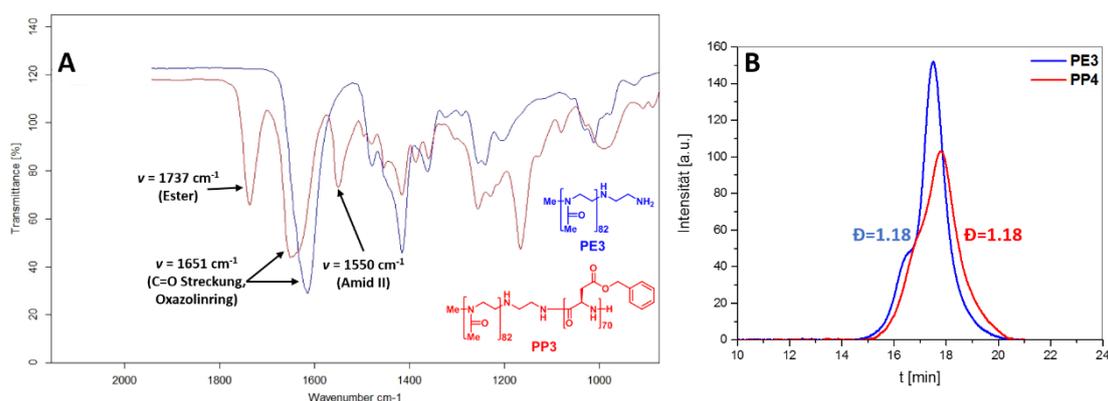


Abbildung 16 (A) IR-Spektren des Makroinitiators **PE3** (blau) und des Blockcopolymeres **PP3** (rot); (B) GPC-Chromatogramme des Makroinitiators **PE3** (blau) und des Blockcopolymeres **PP4** (rot).

Es wurden Banden der Ester (1737 cm^{-1})- und der Amidgruppe (1550 cm^{-1}) im IR-Spektrum der Blockcopolymeren **PP1-PP3** gefunden, was eine erfolgreiche Blockcopolymerisation zusätzlich belegte (Abbildung 16A). Die Polydispersitätsindizes (\mathfrak{D}) von 1.18-1.33 bestätigten eine erfolgreiche lebende Polymerisation mit einer engen Molmassenverteilung (Abbildung 16B). Die analytischen Daten der vier Blockcopolymeren wurden in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3 Analytische Daten der Blockcopolymeren PMOx_n-b-PBLA_m **PP1-PP4**.

No.	n ^{a)}	m ^{a)}	n/m	M _n ^{a)} [g/mol]	M _n ^{b)} [g/mol]	\mathfrak{D} ^{b)}	d _h ^{c)} [nm]	Ausbeute [%]
PP1	77 (70)	30 (35)	2.6	12 845	11 769	1.32	131.8 ± 12.7	82
PP2	46 (40)	14 (20)	3.3	6 885	7 092	1.25	46.7 ± 2.4	96
PP3	82 (70)	70 (70)	1.2	21 558	13 742	1.33	225.8 ± 7.4	85
PP4	82 (70)	24 (30)	3.4	12 026	10 620	1.18	122.7 ± 11.5	78

a) Polymerzusammensetzung und Molmasse wurden über ¹H-NMR-Spektroskopie in DMSO-d₆ und Endgruppenanalyse bestimmt, die theoretisch eingesetzten Äquivalente sind in Klammern angegeben; b) Molmasse M_n und Polydispersitätsindex \mathfrak{D} wurden über die GPC-Analyse bestimmt (PMMA Standards in DMF, 5 mg/mL LiBr); c) Der hydrodynamische Durchmesser d_h wurde über DLS Messungen einer 1 mM Polymerlösung in Wasser bestimmt.

Da für alle vier Blockcopolymeren die kalkulierten Polymerisationsgrade für PBLA nur sehr wenig von den theoretisch eingesetzten Äquivalenten abweichen, wurde davon ausgegangen, dass die Homopolymere **PE1-PE3** die Polymerisation von BLA-NCA gut initiiert haben. Außerdem wurden alle vier Blockcopolymeren, nach Reinigung durch Fällen

aus kaltem Ether und anschließender Trocknung im Vakuum, in sehr guten Ausbeuten von 78-96% als farblose Feststoffe erhalten. Aufgrund des eingeführten hydrophoben PBLA-Polymerblocks verfügen die synthetisierten Blockcopolymeren über amphiphile Eigenschaften und bilden in Wasser oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) mizellare Strukturen aus. Die Größen der gebildeten Aggregate wurden mittels der dynamischen Lichtstreuung (DLS) ermittelt. Die gemessenen hydrodynamischen Durchmesser von 47-226 nm deuten auf die Bildung von größeren Aggregaten anstelle von Mizellen hin. Anhand der Größen ist erkennbar, dass die Länge des hydrophoben Blocks PBLA einen Einfluss auf die Aggregatgröße hat. So betrug der hydrodynamische Durchmesser (d_h) 46.7 ± 2.4 nm für das Polymer **PP2** mit dem kürzesten PBLA-Block von nur 14 Wiederholungseinheiten. Das Polymer **PP3** mit 70 Wiederholungseinheiten bildete dagegen Aggregate mit einem Durchmesser (d_h) von 225.8 ± 7.4 nm aus. Zusammenfassend wurden vier amphiphile Blockcopolymeren der Architektur PMO_x_n-b-PBLA_m mit Molmassen von 7-22 kDa hergestellt. Die Blocklängenverhältnisse n/m betragen dabei 1.2, 2.6 und 3.4.

Synthese und Charakterisierung der Blockkatiomere P1-P4. Die amphiphilen Blockcopolymeren **PP1-PP4** wurden in einer polymeranalogen Aminolyse mit Diethylentriamin (DET) zu kationischen Blockcopolymeren funktionalisiert. Dabei wurden sie mit einem 50-fachen Überschuss an DET in Bezug auf die Benzylgruppe in PBLA-Segment umgesetzt. Durch den großen Überschuss sollen intermolekulare Aminolyse-Reaktionen vermieden werden. Die erfolgreiche Umsetzung zu den Blockkatiomeren **P1-P4** konnte mittels ¹H-NMR in D₂O gezeigt werden (Abbildung 17A).

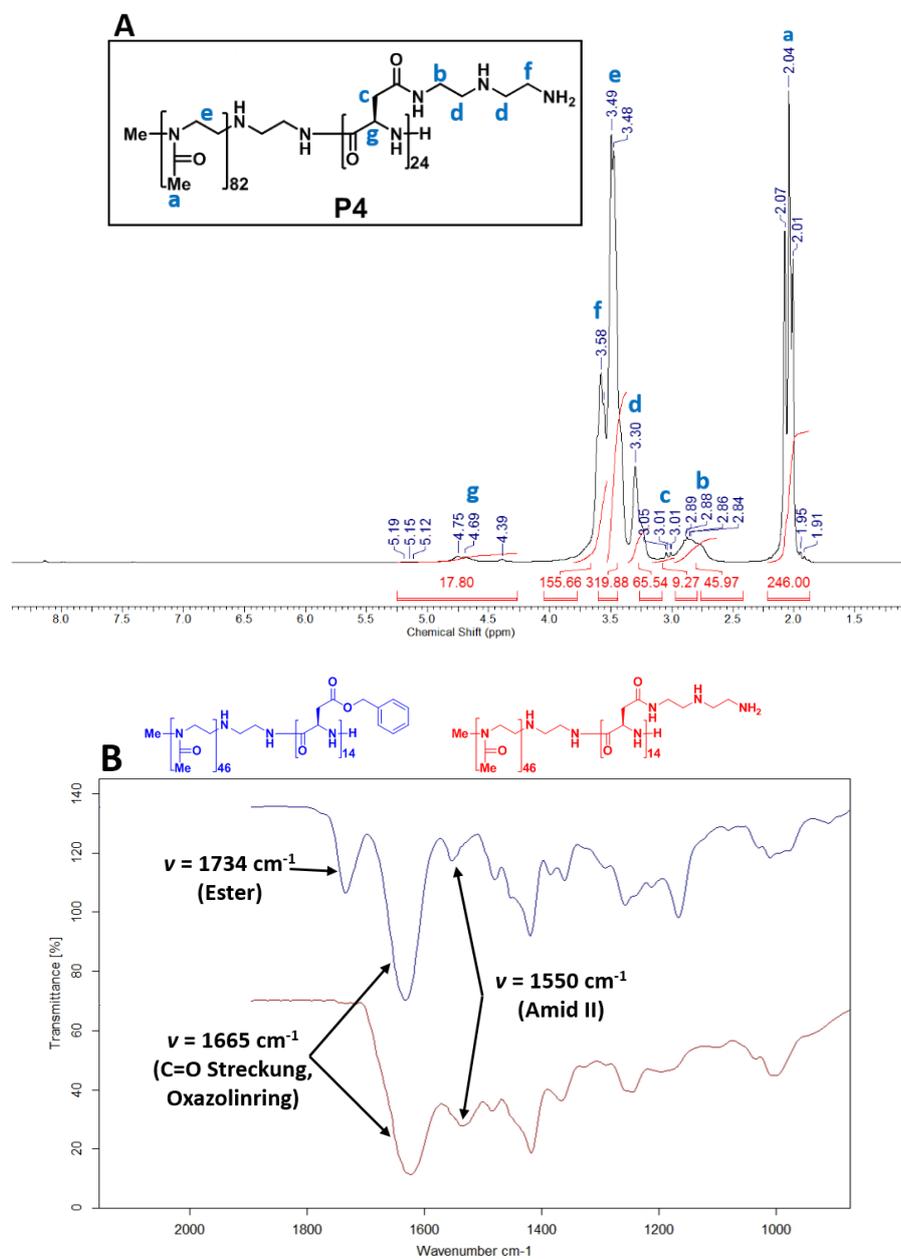


Abbildung 17 (A) ^1H -NMR-Spektrum des Blockkationers **P4** in D_2O ; (B) IR-Spektren des Blockcopolymers **PP2** (blau) und des Blockkationers **P2** (rot).

Der Erfolg der Reaktion konnte unter anderem anhand der fehlenden Signale im aromatischen Bereich der Benzylgruppen (PBLA) festgestellt werden. Des Weiteren wurden die neuen Signale mit der chemischen Verschiebung von 2.86 (*b*), 3.30 (*d*) und 3.58 ppm (*f*) dem mit DET modifizierten PAsp-Segment zugewiesen. Einen weiteren Beleg für die

erfolgreiche Aminolyse zeigte das IR-Spektrum. Die Abbildung 17B zeigt den Vergleich des Blockcopolymers **PP2** mit dem Blockkatiomer **P2**. Die Bande bei 1734 cm^{-1} , welche charakteristisch für die Ester-Funktion des Blockcopolymers ist, konnte im IR-Spektrum des Blockkatiomers nicht beobachtet werden. Die Bande für die C=O-Streckung des PMOx, sowie die Amid II-Bande waren auch nach der Aminolyse vorhanden. Tabelle 4 fasst die analytischen Daten der vier Blockkatiomere **P1-P4** noch einmal zusammen.

Tabelle 4 Analytischen Daten der Blockkatiomere PMOx_n-b-P[Asp(DET)]_m **P1-P4**.

No.	n ^{a)}	m ^{a)}	n/m	M _n ^{a)} [g/mol]	M _n ^{b)} [g/mol]	Đ ^{b)}	Ausbeute [%]
P1	77 (70)	30 (35)	2.6	12 696	8 496	1.12	80
P2	46 (40)	14 (20)	3.3	6 820	4 579	1.22	54
P3	82 (70)	70 (70)	1.2	17 807	9 653	1.04	99
P4	82 (70)	24 (30)	3.4	11 907	11 397	1.08	60

a) Polymerzusammensetzung und Molmasse wurden über ¹H-NMR-Spektroskopie in D₂O und Endgruppenanalyse bestimmt, die theoretisch eingesetzten Äquivalente sind in Klammern angegeben; b) Molmasse M_n und Polydispersitätsindex Đ wurden über die GPC-Analyse bestimmt (PMMA Standards in DMF/5 mg/mL LiBr);

¹H-NMR Spektroskopie wurde benutzt um die Polymerzusammensetzung, sowie die molare Masse zu ermitteln. Die GPC Analyse lieferte monomodale Molmassenverteilungen mit Polydispersitätsindices (Đ) im Bereich von 1.04-1.22. Die vier Blockkatiomere wurden mittels Dialyse gegen 10 mM HCl und anschließend gegen VE-Wasser gereinigt und in guten bis sehr guten Ausbeuten als farblose Feststoffe 54-99% erhalten.

In der Literatur wurde bereits ein ähnliches Polymersystem von *Huwlyer* und Mitarbeiter^[134] veröffentlicht. Hierbei handelte es sich jedoch um eine fünf-stufige Synthese mit Verwendung von Hydrazin als Reduktionsmittel. Sie synthetisierten ein Blockkatiomer bestehend aus 90 PMOx Einheiten und 50 P[Asp(DET)] Einheiten. Das Polymer hatte eine molare Masse von über 18 kDa. Aufgrund der geringen Löslichkeit in gängigen organischen Lösungsmitteln, wurde das Polymer lediglich mittels ¹H-NMR und IR, aber nicht mit GPC-Analysen untersucht. Des Weiteren wurde in Vergleich zu unserer Arbeit, nur ein einziges Polymer in der Anwendung als nicht-viraler Genvektor untersucht und charakterisiert. In dieser Arbeit wurden mithilfe der lebenden Polymerisationsart vier

Blockkatiomere mit definierten Blocklängen, Blocklängenverhältnissen und molaren Massen hergestellt. Die Blockkatiomere **P1** und **P4** wurden als nahezu identisch angesehen. Sie hatten eine ähnliche molare Masse von ca. 12 kDa und eine ähnliche Zusammensetzung mit einem Blocklängenverhältnis hydrophil zu kationisch (n/m) von 2.6 bzw. 3.4. Polymer **P4** diente somit lediglich als Ersatz für **P1**. Polymere **P2** und **P4** hatten das gleiche Blocklängenverhältnis von hydrophil zu kationisch (n/m) von 3.3 bzw. 3.4. Die molare Masse von **P2** betrug jedoch 7 kDa und hatte damit nahezu die halbe molare Masse von **P4**. Aus diesem Grund wurden Polymere **P2** und **P4** speziell hinsichtlich des Einflusses der molaren Masse auf die Komplexbildung, Stabilität und Transfektionseffizienz untersucht und verglichen. Weiterhin wurden die Blockkatiomere **P3** und **P4** miteinander verglichen, um den Einfluss der Blocklängenverhältnisse von hydrophil zu kationisch zu untersuchen. **P4** verfügte jedoch über 24 P[Asp(DET)] Einheiten, während **P3** 70 kationische Segmente hatte. Beide Polymere hatten eine Molmasse größer als 10 kDa. Entsprechend der Literatur ist bereits bekannt, dass eine optimale Molmasse für lineare Polymere, die als nicht-virale Genvektoren angewendet werden sollen, über 10 kDa liegen sollte.^[29]

4.3.2 Bildung und Charakterisierung der Polyplexmizellen aus den Blockkatiomeren P1-P4

Die synthetisierten Blockkatiomere **P1-P4** wurden als nicht-virale Transfektionsreagenzien bzw. Genvektoren für den Transport von pDNA untersucht. Durch elektrostatische Wechselwirkungen der Polymere **P1-P4** mit der negativ geladenen DNA ist die Bildung von Polyplexmizellen möglich, die zunächst untersucht wurde. Die Blockkatiomere PMOx_n-b-P[Asp(DET)]_m tragen in der DET Seitenkette protonierbare Amine mit pK_s Werten von 9.1 (sekundäres Amin) und 6.3 (primäres Amin), welche unter physiologischen Bedingungen bei einem pH-Wert von 7.4 protoniert vorliegen. Dementsprechend wurden die Polyplexmizellen durch einfaches Mischen der DNA- und PMOx_n-b-P[Asp(DET)]_m Polymerlösungen mit verschiedenen N/P Verhältnissen gebildet. Dabei steht N für die

Anzahl der kationischen Amine im Blockkatiomer, während P die Anzahl der Phosphatgruppen der Plasmid-DNA (pDNA) angibt. Alle Untersuchungen richteten sich nach den bekannten biologischen Barrieren und Hindernissen für nicht-virale Genvektoren.^[29] So stellt die effiziente Verpackung der DNA die erste Hürde dar. Die gebildeten Polyplexmizellen sollten stabil gegenüber Proteinen und Enzymen sein und außerdem eine geeignete Abschirmung gegenüber nicht-spezifischen Wechselwirkungen mit Biomakromolekülen liefern. Aus diesem Grund wurde zunächst die Bindungseffizienz der Blockkatiomere **P1-P4** an die DNA untersucht. Die Polyplexmizellen wurden dabei in den N/P-Verhältnissen von 0.2-300 gebildet, um den Einfluss des zunehmenden N/P-Verhältnisses zu ermitteln. Im Anschluss wurde die Stabilität der Polyplexmizellen sowohl in HEPES-Puffer, als auch in isotonischen Medien über eine gewisse Zeitdauer überprüft. Des Weiteren wurde die Größe, Morphologie und die Oberflächenladung der Komplexe studiert, um einen Hinweis über die Zellaufnahme bzw. die zelluläre Wechselwirkung treffen zu können. Da neben maximaler Gentransfektionseffizienz eine minimale Zytotoxizität gewünscht ist, wurden zytotoxische Effekte der Polymere und Polyplexmizellen ermittelt. Als letzter Aspekt der Charakterisierung wurde die Effizienz des Gentransfers analysiert. Die Fähigkeit eine hohe Anzahl an Zellen zu transfizieren, ist eines der wichtigsten Aspekte bei der Entwicklung von nicht-viralen Genvektoren. Bei den Charakterisierungen der Polyplexmizellen wurden die Einflüsse der unterschiedlichen molaren Massen, Blocklängenverhältnisse und Länge des kationischen Segmentes untersucht. Außerdem wurde sowohl das peGFP, als auch pCherry verwendet, um Einflüsse der unterschiedlichen DNA-Sequenzen zu studieren. Beide Plasmide bestanden aus 4,7 Kilo-Basenpaaren (kb). Die Plasmide wurden in einer Konzentration von 100 ng/μL und 200 ng/μL eingesetzt, um den Effekt der Konzentration zu untersuchen.

Untersuchung der DNA-Bindungseffizienz der synthetisierten Blockkatiomere P1-P4. Die Bindungseffizienz beschreibt die Fähigkeit der Blockkatiomere die DNA durch elektrostatische Wechselwirkungen im Kern vollständig zu verpacken. Eine vollständige Komplexierung der DNA ist der erste Schritt für eine effiziente Gentransfektion. Die

Bindungseffizienz der Blockkationere **P1-P4** wurde in zwei unabhängigen Experimenten untersucht. Einerseits wurde die Gelelektrophorese verwendet, um die Migration der freien DNA im Agarosegel zu visualisieren. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes an das mit den Proben beladene Agarose-Gel, wandern die DNA-Polymer-Komplexe in Abhängigkeit ihrer Größe und Ladungsdichte. Mithilfe von MIDORI^{Green} Advance, welcher in der DNA interkaliert ist, kann die Migration doppelsträngiger DNA sichtbar gemacht werden, da der Farbstoff nach Anregung mit UV-Licht ein charakteristisches Fluoreszenzsignal mit einer Wellenlänge von ca. 530 nm emittiert. Zusätzlich wurde das SYBR Green Ausschluss-Assay durchgeführt, um den Anteil der freien DNA durch die Messung der Fluoreszenzintensität zu bestimmen. Für die Untersuchung der Bindungseffizienz anhand der Gelelektrophorese wurde das Polymer **P1** sowohl mit pCherry (4.7 kb), als auch mit peGFP (4.7 kb) jeweils in der Konzentration 200 ng/μl und mit den N/P-Verhältnissen von 0.2 bis 300 komplexiert. Dadurch konnte nicht nur der Effekt der zunehmenden N/P-Verhältnisse, sondern auch der DNA-Sequenzen untersucht werden. Die Proben wurden auf einem 1 Gew.-%-igen Agarosegel bei einer Spannung von 120 V und für eine Dauer von 20 Minuten aufgetrennt (Abbildung 18A).

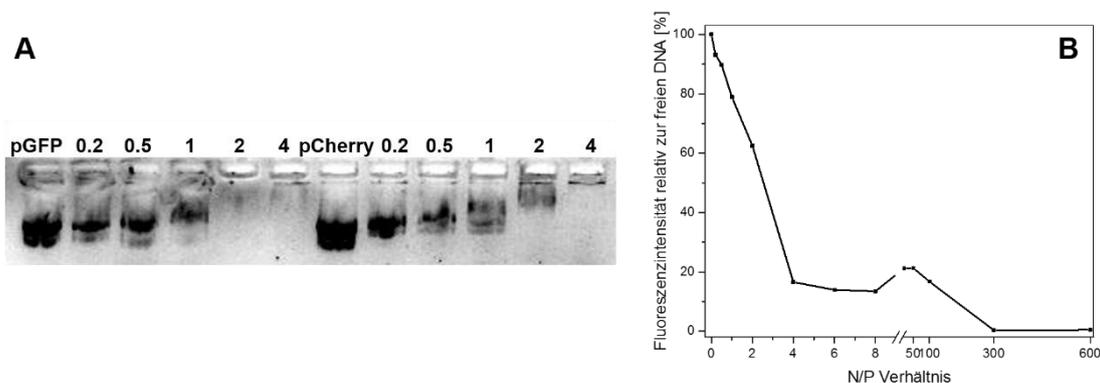


Abbildung 18 (A) Gelelektrophorese der Polyplexmizellen aus **P1**/peGFP (links) und **P1**/pCherry (rechts) jeweils in der Konzentration 200 ng/μl; (B) SYBR Green Ausschluss-Assay mit **P1**/peGFP-Nanokomplexen in der Konzentration 200 ng/μl.

Als Positivkontrolle wurde jeweils native Plasmid-DNA, peGFP und pCherry, verwendet. Die pDNA kommt im Wesentlichen in drei verschiedenen Konformationen vor, die in der Gelelektrophorese unterschieden werden können. Es wird zwischen der superspiralisierten

(engl. *supercoiled*), der entspannt zirkulären (engl. *nicked circled*) und der linearen Form unterschieden. Die superspiralisierte Form der pDNA ist wesentlich kleiner als die anderen beiden Konformationen und wandert deshalb am weitesten im Agarosegel. Für die Bestimmung der Komplexierungskraft wurde nun die Migration der pDNA in Abhängigkeit des N/P Verhältnisses verglichen. Während der Kondensation durch das Blockkatiomer findet eine Ladungsneutralisierung der DNA statt, sodass nur freie oder nicht vollständig komplexierte DNA im elektrischen Feld wandern könnte. In **Abbildung 18A** ist deutlich zu sehen, dass die Migration der DNA mit zunehmenden N/P-Verhältnis abnimmt. Das Blockkatiomer **P1** zeigte bei einem N/P Verhältnis von 2-4 geringe bzw. gar keine Migration der DNA. Das bedeutet, dass bei einem N/P-Verhältnis von 4 die DNA bereits vollständig komplexiert ist, sodass aufgrund der Ladungsneutralisation und der Komplexgröße nahezu keine Migration mehr möglich ist. Anhand dieses Ergebnisses wurde weiterhin angenommen, dass weder die Konzentration der Plasmide, noch die DNA-Sequenz signifikante Auswirkungen auf die Bindungseffizienz der DNA darstellen. Da die Gelelektrophorese für alle vier Blockkatiomere **P1-P4** mit der Plasmid-DNA peGFP (200 ng/μL) nahezu identisch war, wurde angenommen, dass weder die molare Masse, noch das Blocklängenverhältnis bzw. die Länge des kationischen Segmentes eine große Rolle für die Bindungseffizienz spielen. Die Bindungseffizienz des Blockkationers **P3** wurde zudem in einem SYBR Green Ausschluss-Assay untersucht. SYBR Green ist ein bekannter Fluoreszenzfarbstoff, der eine hohe Fluoreszenzintensität zeigt, solange er in der Doppelstrang-Helix der DNA interkaliert vorliegt. Durch die Kondensation der DNA mit einem Transfektionsreagenz, wie die Blockkatiomere **P1-P4**, wird die Interkalation des Farbstoffs in der Doppelstrang-Helix verhindert, sodass die Fluoreszenzintensität abnimmt.^[138,139] Wegen dieser Eigenschaften wurde SYBR Green verwendet, um die Komplexierung der DNA in Abhängigkeit des N/P-Verhältnisses zu evaluieren. Als Negativkontrolle wurde die Polymerlösung mit SYBR Green gemischt und untersucht. Als Positivkontrolle diente die DNA-Lösung in Gegenwart des Fluoreszenzfarbstoffs. Die gemessenen Werte wurden auf die Positivkontrolle referenziert. Wie in **Abbildung 18B** zu

sehen ist, nimmt die Fluoreszenzintensität mit steigendem N/P-Verhältnis und damit mit der sukzessiven Komplexierung der DNA ab. Das erste Minimum mit nahezu 16% relativer Fluoreszenzintensität wurde bei einem N/P-Verhältnis von 4 erreicht. Im Bereich von $N/P = 4-100$ ändert sich die Fluoreszenzintensität kaum. Aufgrund dieses Ergebnisses, wurde davon ausgegangen, dass ab einem N/P-Verhältnis von 4 die DNA vollständig komplexiert vorliegt. Diese Messungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Gelelektrophorese. Hierbei war ebenfalls ab $N/P = 4$ keine DNA-Bande mehr zu sehen. Bei sehr hohen N/P-Verhältnissen von $N/P = 100-300$ wurde ein zweiter Abfall bzw. ein zweites Minimum beobachtet. Der Grund hierfür könnte an zusätzlichen Quenching-Effekten liegen, die durch die hohe positive Ladungsdichte zustande kommen. Im Vergleich dazu kondensiert das gängig verwendete Polymer Poly(ethylenimin) (bPEI, 25 kDA) die DNA bereits ab einem N/P-Verhältnis von 1.5-2.0.^[134,140] Dieser Unterschied lässt sich dadurch erklären, dass das Rückgrat des Polymers PEI ausschließlich aus kationischen Aminen besteht. Das Rückgrat des hier verwendeten Polymersystems $\text{PMOx}_n\text{-b-P[Asp(DET)]}_m$ besteht vorwiegend aus Amid-Gruppen, die nicht mit der DNA wechselwirken können. Somit ist die relative Anzahl der geladenen Amingruppen kleiner als bei PEI. Im Vergleich zu einem ähnlichen Polymersystem, welches von *Huwyler* und Mitarbeiter im Jahr 2015 publiziert wurde^[134], erhalten wir ähnliche Ergebnisse. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass weder die molare Masse noch die Polymerzusammensetzung der Polymere **P1-P4** einen Einfluss auf die Bindungseffizienz haben. Des Weiteren spielt die Sequenz und Konzentration der verwendeten Plasmide mit einer Größe von 4.7 Kilo-Basenpaare keine Rolle. Auf Basis dieser Ergebnisse wurden weiterführende Analysen mit Polyplexmizellen vorwiegend mit einem N/P-Verhältnis größer als 4 und der Plasmid-DNA peGFP ($c = 200 \text{ ng}/\mu\text{L}$) durchgeführt.

Untersuchung der Polyplexmizellen hinsichtlich ihrer Langzeitstabilität und Stabilität in isotonischen Medien. Die Erhaltung der Bioaktivität während der Langzeitlagerung ist eine weitere wichtige Herausforderung bei der Verwendung von $\text{PMOx}_n\text{-b-P[Asp(DET)]}_m$ als nicht-virale Genvektoren. Aus diesem Grund wurde die Lagerstabilität der Polyplexmizellen

in HEPES-Puffer (10 mM) bei einem physiologischen pH-Wert von 7.4 in einem Zeitraum von 3 Wochen untersucht. Darüber hinaus wurde die Stabilität der Polyplexmizellen gegenüber zwei verschiedenen hoch konzentrierten Kochsalzlösungen untersucht. Diese Umgebung kommt den *in vivo* Bedingungen deutlich näher, als die Untersuchungen in reinen Puffermedien, da sowohl im Blut (135-145 mM NaCl-Konzentration) als auch im Zytosol (10-15 mM NaCl-Konzentration) eine Salzkonzentration vorliegt. Darüber hinaus werden Therapeutika in der Gentherapie häufig intravenös in einer Kochsalzlösung verabreicht, sodass auch hierbei eine Stabilität der Komplexe nötig ist. Die Polyplexmizellen wurden dabei in einer 0.05 M und einer 0.15 M wässrigen Natriumchlorid-Lösung gelagert. Um die Stabilität der Polyplexmizellen zu ermitteln, wurde die Partikelgröße analysiert, welche aus DLS-Messungen bei 25 °C erhalten wurde. Ein Zerfall oder eine Aggregation der Nanokomplexe würde sich in einer Änderung des hydrodynamischen Durchmessers äußern. Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse, wurden bei diesen Messungen Polyplexmizellen aus dem Polymer **P3** und den N/P-Verhältnissen 8 und 300 untersucht. Dabei wurde der hydrodynamische Durchmesser in einem Zeitraum von 21 Tagen verfolgt. Abbildung 19A zeigt, dass die **P3**/peGFP-Komplexe sowohl mit einem kleinen N/P-Verhältnis von 8, als auch mit dem großen N/P-Verhältnis von 300, in einem Zeitraum von 21 Tagen in HEPES-Puffer (pH 7.4) stabil waren.

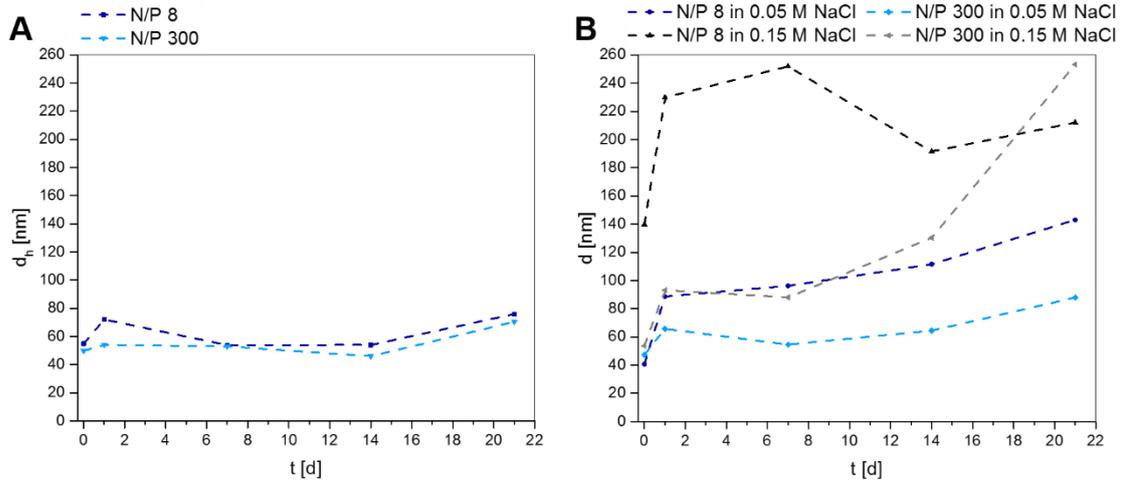


Abbildung 19 DLS-Messungen zur Untersuchungen der (A) Langzeitstabilität (HEPES-Puffer (pH 7.4) und (B) Stabilität der Polyplexmizellen **P3**/peGFP in Kochsalz-Lösungen (0.05 M und 0.15 M NaCl).

Der hydrodynamische Durchmesser der Nanokomplexe fluktuierte nur leicht um die Größe von 70 nm. Abbildung 19B zeigt die Stabilität der **P3**/peGFP-Komplexe in 0.05 M und 0.15 M wässriger Natriumchlorid-Lösung. Innerhalb der 21 Messtage wurde bei der Lagerung in der niedrig konzentrierten Kochsalzlösung (0.05 M) für das N/P-Verhältnis von 300 keine und für N/P = 8 nur geringe Abweichungen im hydrodynamischen Durchmesser beobachtet. Die Größe nimmt für N/P = 300 von 50 nm bis 70 nm und für N/P = 8 bis 100 nm zu. In isotonischer Kochsalzlösung zeigten die Polyplexmizellen mit einem kleinen N/P-Verhältnis von 8 ein Aggregationsverhalten, sodass nach einem Tag Komplexe mit einer Größe von 230 nm gebildet wurden. Polyplexmizellen mit einem größerem N/P Verhältnis von 300 aggregierten erst ab dem 14. Tag und zeigten moderate Größen von 120 nm Durchmesser. Die Tendenz der Polyplexmizellen in Kochsalz-Lösungen zu aggregieren hängt mit der verringerten intramolekularen Abstoßung der DET-Seitenkette bedingt durch den Ladungsausgleich zusammen. Die elektrostatische Abstoßung der Polyplexmizellen wird durch die Abschirmung der zugegebenen Salz-Ionen reduziert, sodass der Komplex zu großen Partikeln aggregiert.^[141] Der Effekt der Abschirmung durch Natriumchlorid-Ionen ist bei einem hohen N/P-Verhältnis schwächer, da hier ein höherer Überschuss an freien kationischen Amin-Gruppen vorliegt.

Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Polyplexmizellen ab einem N/P-Verhältnis von 8 bis zu 21 Tagen lagerstabil in HEPES-Puffer bei pH 7.4 sind. Die Stabilität in Kochsalzlösungen hängt stark von dem N/P-Verhältnis und der Salzkonzentration ab. Am stabilsten sind Polyplexmizellen, die bei einem hohen N/P-Verhältnis gebildet wurden. Es lässt sich annehmen, dass bei höheren N/P-Verhältnissen auch eine höhere Anzahl freier positiver geladener Amingruppen vorliegt, sodass eine höhere repulsive Wechselwirkung zwischen den Polyplexmizellen besteht. Dadurch neigen sie weniger zu einem Aggregationsverhalten.

Studien zur Morphologie, Größe und Oberflächenladung der Polyplexmizellen aus den Blockkationomeren P1-P4. Die Form und Größe der gebildeten Polyplexmizellen wurde mittels TEM-Analyse bestimmt. Dafür wurden Polyplexmizellen aus dem Blockkationomer **P2** und einem N/P Verhältnis von 8 gebildet. Abbildung 20 zeigt uniforme und sphärische Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 40 nm.

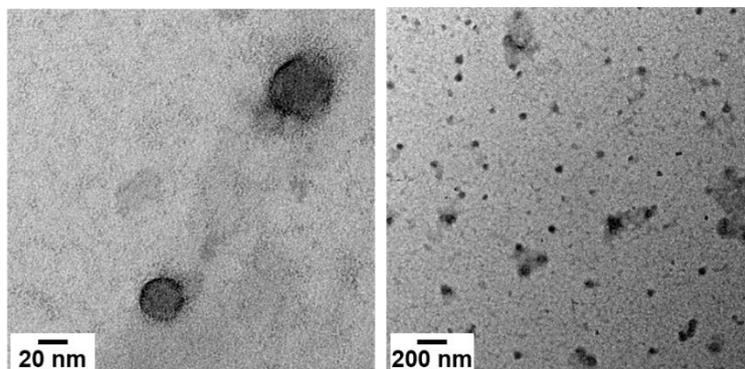


Abbildung 20 TEM-Aufnahmen der Polyplexmizellen **P3**/peGFP mit N/P = 8. Die Aufnahmen wurden von Frau Monika Meuris im Arbeitskreis von Prof. J. Tiller angefertigt.

Es sollte erwähnt werden, dass die TEM-Analyse eine qualitative Methode ist, da sie nur eine limitierte Anzahl von Polyplexmizellen charakterisieren kann. Um Informationen über die Größenverteilung der Komplexe zu bekommen, wurden DLS-Messungen durchgeführt. Zunächst sollte anhand des Blockkationomers **P2** der Einfluss der Plasmidkonzentration und -sequenz untersucht werden. Dafür wurden die beiden Plasmide pCherry (4.7 kb) und peGFP (4.7 kb) jeweils in den Konzentrationen 100 ng/μL und 200 ng/μL mit **P2**

komplexiert. Abbildung 21 zeigt den Vergleich der hydrodynamischen Durchmesser mit steigendem N/P-Verhältnis.

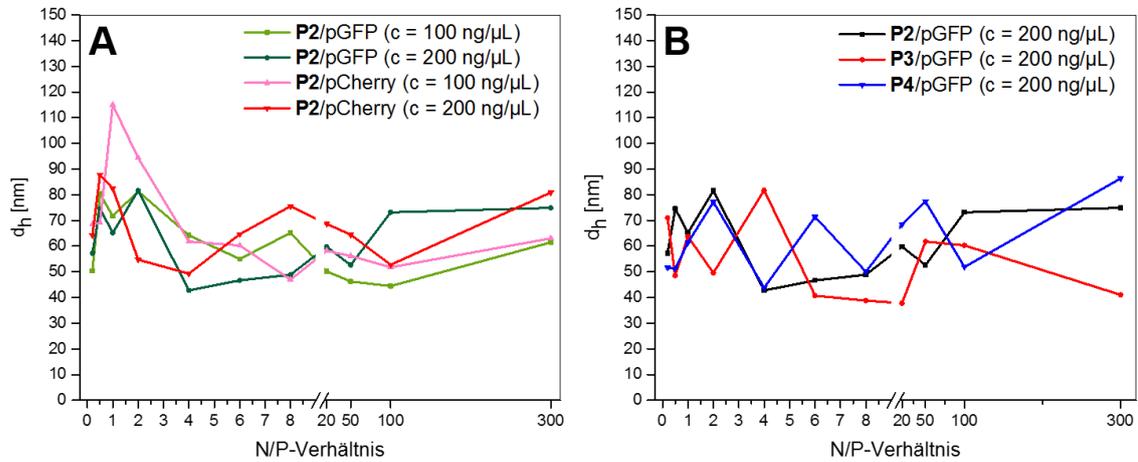


Abbildung 21 (A) Hydrodynamischer Durchmesser der P2/pDNA-Komplexe in Abhängigkeit des N/P-Verhältnisses; (B) Hydrodynamischer Durchmesser der Polyplexmizellen P2-P4/pDNA in Abhängigkeit des N/P-Verhältnisses.

Die DLS Messungen zeigen deutlich, dass ab einem N/P Verhältnis von 4, wenn das Plasmid vollständig vom Blockkatiomer komplexiert vorliegt, die hydrodynamischen Durchmesser sich nur wenig unterscheiden und um die Größe von ca. 70 nm fluktuieren. Bei dem Vergleich der Kurven konnte kein großer Einfluss der Plasmidsequenz oder -konzentration festgestellt werden (Abbildung 21B). Aus diesem Grund wurde für die weiteren Charakterisierungen mit der Plasmid-DNA peGFP in der Konzentration von 200 ng/μL gearbeitet. Um den Effekt der Polymerzusammensetzung und der molaren Masse zu untersuchen, wurden die Größen der Polyplexmizellen aus den drei unterschiedlichen Blockkatiomeren P2-P4 miteinander verglichen (Abbildung 21B). Es wurde vorerst angenommen, dass wie bei den amphiphilen Blockcopolymeren PMOx_n-b-PBLA_m (PP1-PP4), die Größe des zweiten Polymerblockes (PAsp) einen Einfluss auf die Partikelgröße hat. Allerdings wurden keine signifikanten Änderungen der gebildeten Komplexe beobachtet. Unabhängig von der Polymerarchitektur fluktuieren die hydrodynamischen Durchmesser um den Wert von ca. 70 nm. Deswegen wurden die weiteren Untersuchungen nicht für alle Blockkatiomere P1-P4 diskutiert. Die mit den DLS-Messungen ermittelten Größen

stimmten gut mit der Größenbestimmung mittels der TEM-Analyse überein. Hierbei soll angemerkt sein, dass die ermittelten Größen mittels DLS die hydrodynamischen Größen in Lösung darstellen, während die Proben in der TEM-Analyse trocken vorliegen. Die gesamte Größenverteilung befindet sich im idealen Größenbereich, um passiv über den EPR-Effekt in das Tumorgewebe aufgenommen zu werden.^[142] Das ist ein großer Vorteil im Vergleich zu den von *Huwyler* und Mitarbeiter publizierten Ergebnisse^[134]. Diese erhielten mit einer ähnlichen Polymerstruktur für ein N/P-Verhältnis von 20, Polyplexmizellen mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 200 nm.

Neben der Größe, wurde auch die Oberflächenladung der Polyplexmizellen ermittelt. Die Interaktion zwischen der negativ geladenen Zellmembran und der Polyplexmizellen ist entscheidend für eine gute Zellaufnahme und damit auch für eine effiziente Gentransfektion. Es ist bekannt, dass ein leicht positives Zetapotential die Zellaufnahme fördert, während eine zu hohe positive Ladungsdichte die Zytotoxizität erhöht.^[29] Die Oberflächenladung wurde anhand von DLS-Messungen des Zetapotentials in Abhängigkeit des N/P-Verhältnisses ermittelt. Dabei wurde der Fokus auf den Einfluss der unterschiedlichen Polymerarchitektur der Blockkationere **P2-P4** gelegt (Abbildung 22).

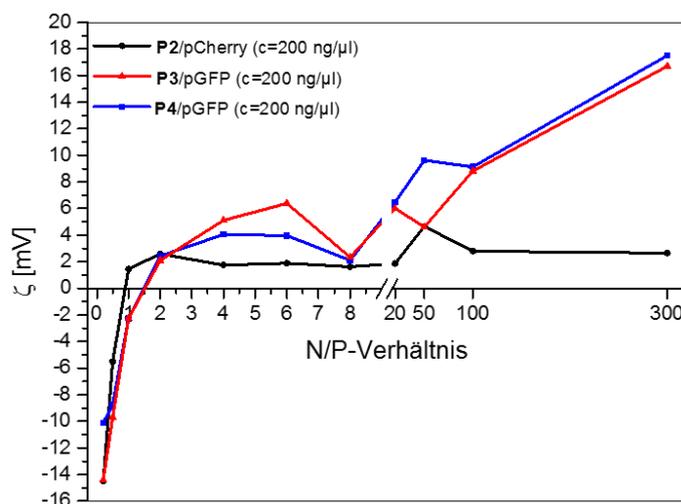


Abbildung 22 Messungen des Zetapotentials der Polyplexe in Abhängigkeit der N/P-Verhältnisse.

Beobachtet man den Verlauf der Graphen, zeigen alle drei Kurven ein ähnliches Verhalten. Das Zetapotential nimmt mit steigendem N/P Verhältnis von -14 mV bis zu +18 mV zu. Für ein N/P-Verhältnis kleiner als 1 zeigten alle Polyplexmizellen negative Zetapotentiale. Das ist auf die überschüssigen negativen Ladungen der Phosphat-Gruppen der Plasmid-DNA zurückzuführen. Bei einem N/P-Verhältnis von 1-2 ist das Zetapotential für alle untersuchten Polyplexmizellen nahezu null, was auf einen Ladungsausgleich der Phosphat-Gruppen durch die Kondensation der DNA schließen lässt. Das Zetapotential erreicht für alle drei Polymere ab einem N/P Verhältnis von 2 eine leicht positive Oberflächenladung (~ 2 mV) und fluktuiert in diesem leicht positiven Potential bis zu einem N/P Verhältnis von 8. Dies deutet auf die Abschirmung durch die neutral geladene PMOx-Schale hin und bestätigt die gewünschte Kern-Schale-Architektur der gebildeten Polyplexmizellen. Diese leicht positive Oberflächenladung im Bereich von N/P = 2-8 ist bevorzugt für *in vitro* und *in vivo* Anwendungen. Nanokomplexe mit einem geringen positiven Zetapotential zeigen eine geringe Zytotoxizität und verbleiben länger in der Blutlaufbahn. Stark positiv geladene Nanopartikel hingegen sind toxisch aufgrund ihrer unspezifischen Wechselwirkung mit der Plasmamembran und werden in Fall von intravenöser Gabe schnell in der Lunge eingelagert.^[29] Die Polyplexmizellen aus dem Blockkationer **P2**, welches ein Blocklängenverhältnis von 3.3 und eine molare Masse von 7 kDa hat, bleibt auch bei hohen N/P-Verhältnissen leicht positiv geladen. Da das Polymer **P2** den kürzesten kationischen Polymerblock von nur 14 P[Asp(DET)]-Wiederholungseinheiten besitzt, wurde angenommen, dass dieser Bestandteil einen Einfluss auf das Zetapotential hat. Weiterhin hat **P2** im Gegensatz zu den anderen beiden Polymeren eine molare Masse kleiner als 10 kDa. Das Zetapotential der Nanokomplexe mit **P3** und **P4** stieg ab N/P = 8 stark an und erreichte ein positives Zetapotential von ca. 18 mV bei einem N/P-Verhältnis von 300. Es wurde angenommen, dass dieser Effekt auf einen großen Überschuss an freien kationisch geladenen Amin-Gruppen der Blockkationere **P3** und **P4** beruht. Beide Polymere hatten eine Molmasse von über 10 kDa.

Untersuchungen zur Zytotoxizitäten des Blockkatiomers P3 in Abwesenheit und als Komplex mit der DNA. Bei der Entwicklung nicht-viraler Genvektoren ist es wichtig die Balance zwischen hoher Gentransfektionsrate und minimaler Zytotoxizität zu wahren. Die Zytotoxizität des Blockkatiomers **P3** und der Polyplexmizellen aus **P3** wurden in einem MTT-Assay mit HEK293 Zellen untersucht (Abbildung 23).

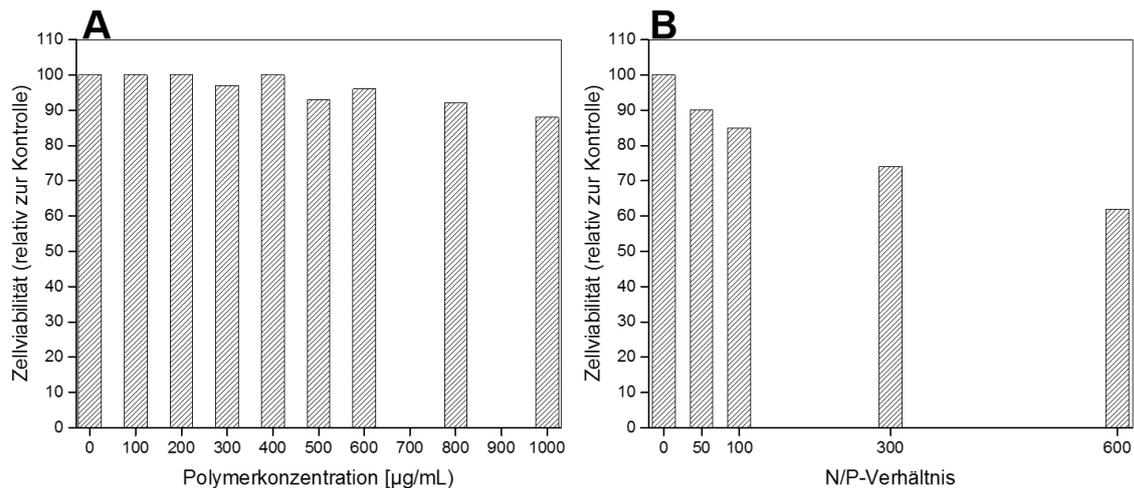


Abbildung 23 Zellviabilität der HEK293 Zellen nach Inkubation mit (A) **P3** und (B) **P3**/pDNA-Komplexen bestimmt mithilfe des MTT-Assays.

Das Blockkatiomer **P3** zeigte selbst in hohen Konzentrationen von 1 mg/mL keine zytotoxischen Effekte bei HEK293 Zellen. Die mit **P3** gebildeten Polyplexmizellen zeigten eine leichte Abnahme der Zellviabilität mit steigendem N/P Verhältnis, welche jedoch keine toxischen Effekte verursachte. Lediglich die Zellviabilität bei einem N/P Verhältnis von 600 lag unter der 70%-Grenze und ist somit nach den „Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizitäten (ISO 10993-5:2009)“ als zelltoxisch einzustufen. Dieses Ergebnis könnte im Zusammenhang mit dem positiven Zetapotential (~18 mV) der Nanokomplexe zusammenhängen. Unsere erzielten Ergebnisse stimmen gut mit den publizierten Ergebnissen von *Huwylar* und Mitarbeiter^[134] überein. Diese verglichen die Zellviabilität des Blockkatiomers PMO_{x90}-b-P[Asp(DET)]₅₀ (M = 18 kDa) mit dem „Goldstandard“ bPEI (25 kDa). Die Zellviabilität für das Blockkatiomer PMO_{x90}-b-P[Asp(DET)]₅₀ (M = 18 kDa) betrug über 80% bei einer Konzentration von 163 µg/mL. Die damit gebildeten Polyplexmizellen wiesen ebenfalls eine

Zellviabilität von über 80% für alle N/P-Verhältnisse von 10 bis 300 auf. Die untersuchten bPEI-pDNA-Komplexe hingegen zeigten lediglich eine 10%-ige Zellviabilität bei einem N/P-Verhältnis von 300. Die Zellviabilität wurde schon bei einer Konzentration von 11 µg/mL bPEI stark beeinträchtigt (~20%).^[134]

Untersuchung der qualitativen Gentransfektionseffizienz mittels Fluoreszenzmikroskopieanalyse. Für die qualitative Untersuchung der Gentransfektionseffizienz wurden *in vitro* Transfektionsexperimente mit HEK293 Zellen durchgeführt. Als Modellplasmid wurde pEGFP verwendet, welches für die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (Abkürzung GFP; engl. *green fluorescent protein*) kodiert ist. Bei einer erfolgreichen Transfektion wird in der Zelle das GFP exprimiert, wodurch die entsprechenden Zellen grün fluoreszieren. Dadurch lassen sich GFP-positive bzw. transfizierte Zellen leicht von den anderen Zellen unterscheiden. Anhand der qualitativen Fluoreszenzmikroskopieanalyse können Rückschlüsse auf die Effizienz der Blockkationomere **P2-P4** als nicht virale Genvektoren gezogen werden. Zunächst wurde der Einfluss des N/P-Verhältnisses, sowie der Polymerarchitektur auf die Transfektion der HEK293 Zellen studiert. Dazu wurden die Zellen mit den Polyplexmizellen, die in unterschiedlichen N/P-Verhältnissen mit den Blockkationomeren **P2-P4** gebildet wurden, versetzt und anschließend für 48 Stunden inkubiert. Abbildung 24 zeigt die repräsentativen Mikroskopiebilder der HEK293 Zellen nach 48 h Inkubationszeit.

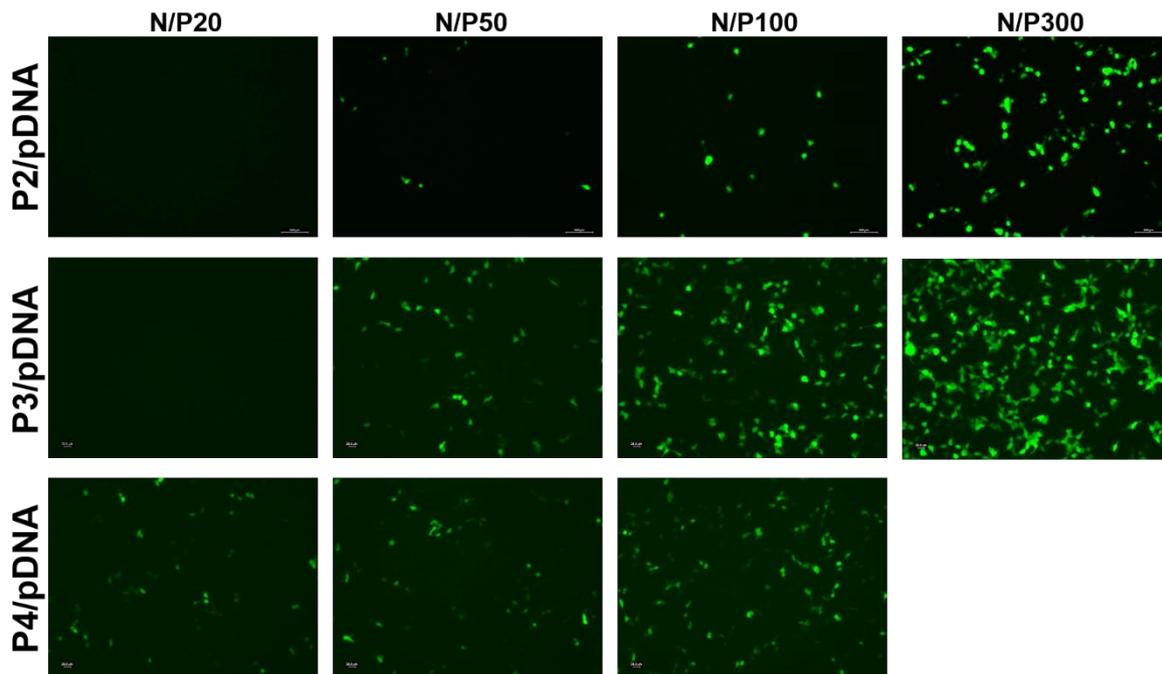


Abbildung 24 Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen der transfizierten HEK293 Zellen mit den Polyplexmizellen aus den Blockkatiomeren **P2-P4** mit den N/P-Verhältnissen 20-300 nach 48 h Inkubation.

Allgemein lässt sich sagen, dass die Transfektionsrate in HEK293 Zellen für alle Polyplexmizellen mit steigendem N/P Verhältnis von 20 bis 300 zunimmt. Die höchste Anzahl an GFP-positiven Zellen wurde bei einem N/P Verhältnis von 300 für das Polymer **P3** beobachtet. Vergleicht man diese Transfektionseffizienz mit der Effizienz des Polymers **P4** hinsichtlich des Blocklängenverhältnisses zwischen dem hydrophilen und kationischen Polymerblock, so lassen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen. Lediglich bei einem kleinen N/P Verhältnis von 20 transfiziert das Polymer **P4** bereits, während das Polymer **P3** erst ab N/P = 50 Transfektion zeigte. Es wurde daher angenommen, dass weder das Blocklängenverhältnis noch die Länge des kationischen Segments P[Asp(DET)] einen signifikanten Einfluss auf die Transfektionsrate hat, sondern vielmehr die molare Masse des Blockkatiomers. Diese Annahme wurde durch den Vergleich von **P2** mit **P4** unterstrichen. Es fällt deutlich auf, dass das Polymer **P2**, welches die kleinste molare Masse von 7 kDA besitzt, die geringste Transfektionseffizienz aufwies. Eine erhöhte Transfektion wurde erst bei einem N/P-Verhältnis von 300 beobachtet.

Ein Problem während der Gentransfektion stellt häufig die Gegenwart von Serumproteinen dar. Diese sind anionisch geladen und können durch unspezifische Wechselwirkungen mit den Polykationeren die Transfektion inhibieren. Solche Wechselwirkungen sind stärker mit hoch kationisch geladenen Komplexen. Sie resultieren in der Adsorption der negativ geladenen Proteine auf der Oberfläche der Polyplexmizellen und inhibieren so die Transfektion. Vor allem bei dem häufig verwendeten Poly(ethylenimin) (PEI) ist die Reduzierung der Gentransfektionseffizienz durch Serumproteine im Zellmedium bekannt.^[128] Aus diesem Grund ist eine Schale-Kern-Struktur, mit einem hydrophilen Polymer, wie PEG oder PMOx, wünschenswert. Dadurch kommt es einerseits zu einer Abschirmung der positiven Ladungen und andererseits zu einer hydrophilen Schale, welche die unspezifischen Wechselwirkungen mit Serumproteinen und deren Adsorption verhindert. Um den Einfluss des Zellmediums auf die Effizienz der Gentransfektion zu bestimmen, wurden die HEK293 Zellen mit den Polyplexmizellen in unterschiedlichen Medien transfiziert. Dabei wurde als Zellmedium serumfreies *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), DMEM mit 10% Fötale Bovines Serum (FBS) und DMEM mit 10% FBS, 5% L-Glutamin und 5% Penicillin-Streptomycin (DMEM komplett) verwendet. Es wurde die Fluoreszenzintensität der GFP-positiven Zellen nach 48 Stunden Inkubationszeit gemessen. Abbildung 25 zeigt die Ergebnisse für **P3**/pDNA-Komplexe mit den N/P-Verhältnissen 20-300 in serumfreien DMEM und in DMEM mit 10% FBS.

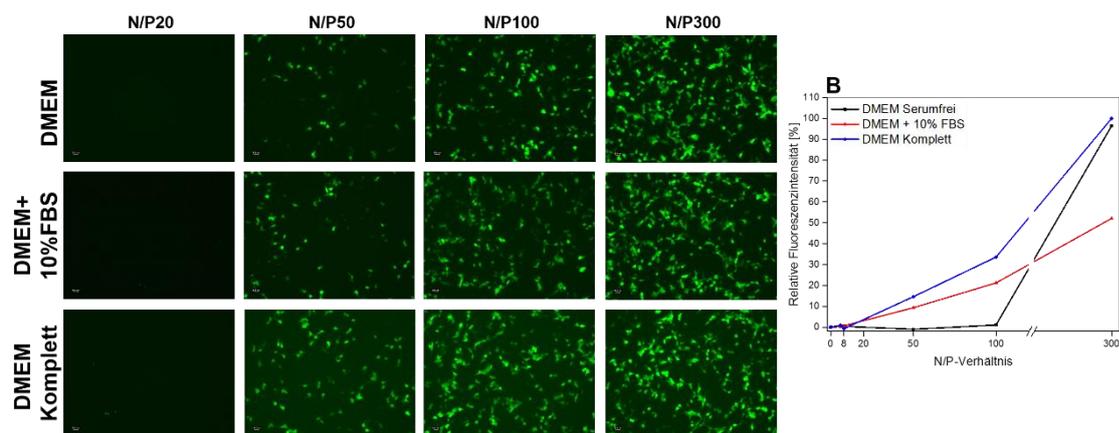


Abbildung 25 (A) Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen und (B) relative Fluoreszenzintensitäten der GFP-positiven Zellen transfiziert mit **P3**/pDNA-Komplexen in serumfreien DMEM und mit DMEM mit 10% FBS.

Bei einem N/P-Verhältnis von 20 findet in allen drei Fällen noch keine Transfektion statt. Für $N/P = 50$ und $N/P = 100$ wurden GFP-positive Zellen beobachtet, wobei in dem Zellmedium mit 10% Serum eine höhere Anzahl an transfizierten Zellen festgestellt wurde. Dieses Ergebnis wird sowohl durch die Mikroskopiebilder, als auch durch die Messung der Fluoreszenzintensität bestätigt (Abbildung 25). Das könnte daran liegen, dass das Zellwachstum durch den Serumgehalt angehoben wird und somit die Zelldichte höher ist. Diese Ergebnisse demonstrieren deutlich die Abschirmung durch die neutral-geladene und hydrophile PMOx-Schale und bestätigen darüber hinaus die Kompatibilität der Polyplexmizellen in serumhaltigem Zellmedium. Im Gegensatz dazu zeigen PEI-25/DNA-Komplexe eine geringere Transfektionseffizienz in Gegenwart von Serumproteinen.^[128] Dieses Verhalten wird auf die hohe kationische Ladung der Komplexe zurückgeführt, die durch Adsorption der Serumproteine zu einer eingeschränkten Endozytose und somit zur inhibierten Gentransfektion führt. In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, dass PEGylierte Blockkationere ebenfalls keine Reduktion in der Gentransfektion in Anwesenheit von Serumproteinen zeigen.^[128] Die PEGylierung der Schale führt jedoch zu einer verringerten Gentransfektion durch verringerte Wechselwirkungen mit der Zellmembran. Dieses Verhalten wird auch als PEG-Dilemma bezeichnet.^[22]

4.4 Zusammenfassung

Es wurden vier Blockkationere (**P1-P4**) in einer einfachen dreistufigen Synthese in guten Ausbeuten synthetisiert. Die Blockkationere wurden mit definierten Molmassen und Blocklängenverhältnissen, ausgehend von kommerziell erhältlichen Edukten, in einer lebenden Polymerisation dargestellt. Es wurde im Vergleich zu dem bekannten Literaturbeispiel, welches von *Huwyler* und Mitarbeiter^[134] publiziert wurde, nur auf eine polymeranaloge Aminolyse-Reaktion, welche nach 48 h quantitativ verläuft, zurückgegriffen (Schema 3). Alle vier Blockkationere wurden vollständig mittels ¹H-NMR, IR- und GPC-Analysen charakterisiert. Abbildung 26 zeigt die erfolgreich synthetisierten Blockkationere und ihre analytischen Daten.

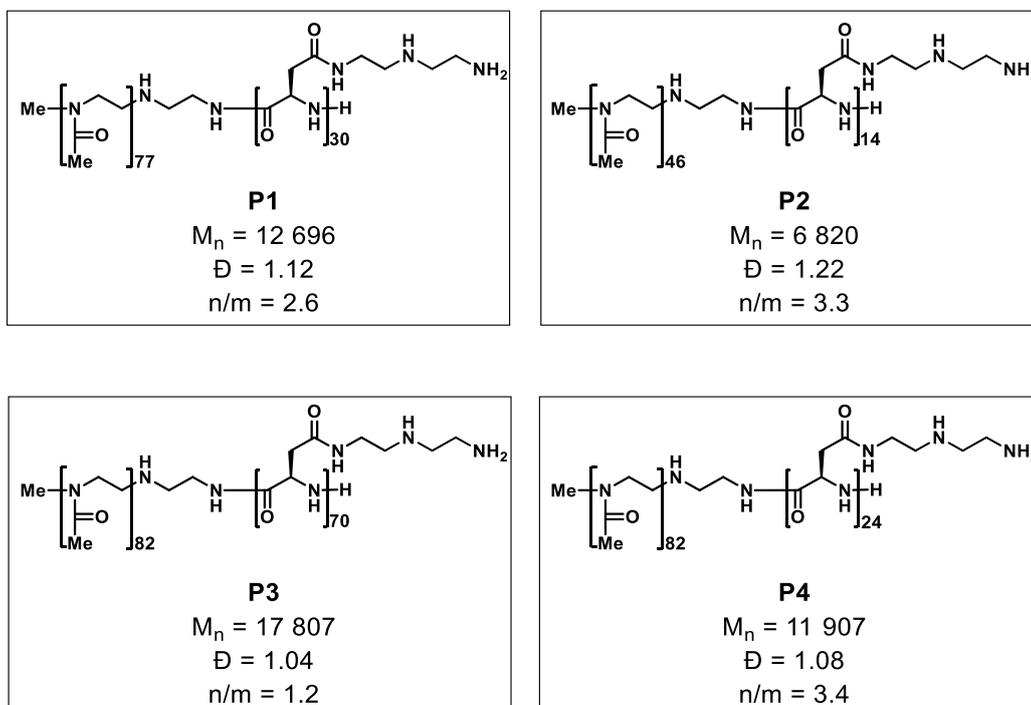


Abbildung 26 Zusammenfassende Übersicht der erfolgreich synthetisierten Blockkationere **P1-P4** und ihre analytischen Daten.

Sie unterschieden sich in den molaren Massen (M_n), der Wiederholungseinheiten in den hydrophilen (n) und kationischen Blöcken (m), sowie in den Blocklängenverhältnissen (n/m). Alle vier Blockkationere waren in der Lage die DNA effizient im Kern zu

komplexieren und stabile Polyplexmizellen auszubilden. Dabei wurden zwei verschiedene Plasmid-Sequenzen peGFP und pCherry jeweils mit der Größe von 4.7 kB verwendet. Die Konzentration der DNA wurde dabei zwischen 100 und 200 ng/ μ L variiert. Abbildung 27 zeigt die zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse mit den Polyplexmizellen aus **P1-P4**.

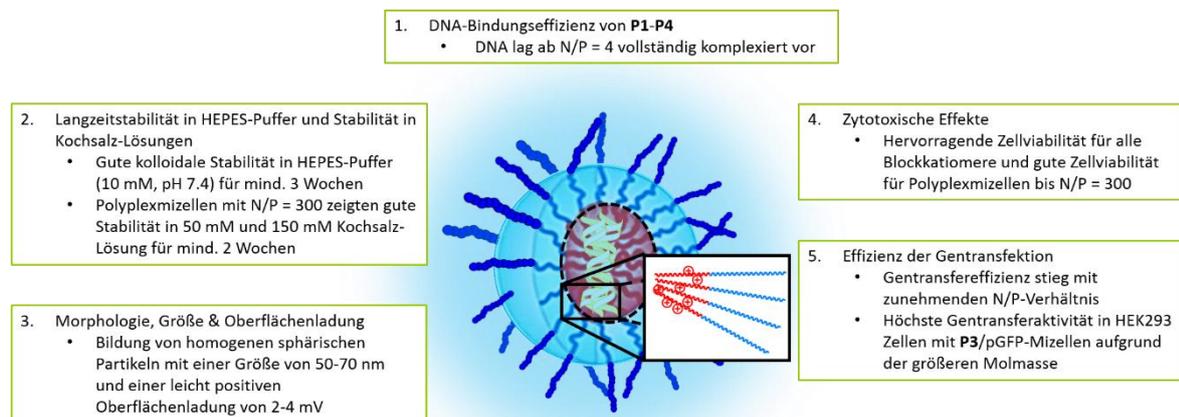


Abbildung 27 Zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse mit den Polyplexmizellen aus den Blockkatiomeren **P1-P4**.

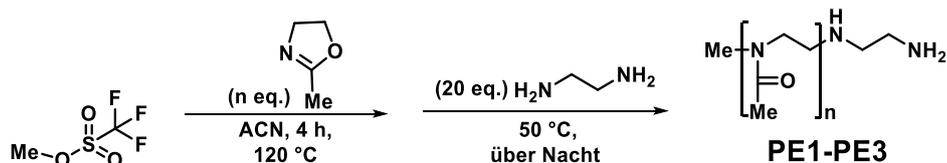
Bei den Untersuchungen der Bindungseffizienz mittels Gelelektrophorese (Abbildung 18A) und der Größe mittels DLS-Messungen (Abbildung 21A) wurde festgestellt, dass weder die DNA-Sequenz noch die DNA-Konzentration einen Effekt auf die Bildung der Polyplexmizellen und deren Eigenschaften hatte. Die synthetisierten Blockkatiomere **P1-P4** bildeten mit der Plasmid-DNA uniforme, sphärische Nanokomplexe mit einer Größe von 50-70 nm und einer leicht positiv geladenen Oberfläche. Die gebildeten Polyplexmizellen waren vor allem bei hohen N/P-Verhältnissen von 100 und 300 bis zu 21 Tagen stabil in HEPES-Puffer und in isotonischen Kochsalz-Lösungen. Sowohl die Blockkatiomere, als auch die gebildeten Polyplexmizellen mit der DNA zeigten keine zytotoxischen Effekte in HEK293 Zellen. Betrachtet man die Einflüsse durch die unterschiedliche Polymerarchitektur der Blockkatiomere **P1-P4** so stellt man fest, dass die Polymerarchitektur weder auf die Bindungseffizienz noch auf die Morphologie und Größe einen Einfluss hatte. Einen signifikanten Einfluss schien die molare Masse der Blockkatiomere zu spielen. So zeigten

die Polyplexmizellen aus den Blockkationeren **P3** und **P4**, welche eine große molare Masse über 10 kDa besaßen, ein positiveres Zetapotential ab $N/P = 20$, als das Blockkationere **P2** ($M \approx 7$ kDa) (Abbildung 22). Die molare Masse und möglicherweise die damit verbundene positivere Oberflächenladung der Polyplexmizellen wirkten sich auch auf die Gentransfektionseffizienz in HEK293 Zellen aus. Dabei zeigte das Polymer **P4** ($M \sim 12$ kDa) bereits ab einem N/P-Verhältnis von 20 GFP-positive Zellen. Das Polymer **P3** ($M \sim 18$ kDa) hatte die höchste Transfektionsrate für $N/P = 50-300$, während das Polymer **P2** ($M \sim 7$ kDa) nur bei einem sehr hohen N/P-Verhältnis von 300 transfizierte Zellen zeigte (Abbildung 24). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Blockkationere mit einer molaren Masse über 10 kDa und in einem N/P-Verhältnis über 50 sich besonders vorteilhaft auf die Eigenschaften der gebildeten Polyplexmizellen mit pDNA auswirken. Die Länge des hydrophilen und kationischen Polymerblockes und das daraus resultierende Blocklängenverhältnis scheinen dabei eine untergeordnete Rolle zu spielen.

4.5 Experimentelles

4.5.1 Synthesevorschriften der Blockkationere P1-P4

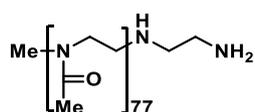
Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Darstellung der Poly(2-methyl-2-oxazoline) (PE1-PE3)



Zu 2-Methyl-2-oxazolin (70 eq. / 40 eq.) in trockenem Acetonitril (1 ml pro 3 mmol) wurde bei 0 °C Methyltriflat (1 eq.) hinzugegeben und die Lösung in einem zuvor temperierten Ölbad bei 120 °C für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde zur Termination der Polymerisation Ethylendiamin (20 eq.) zugegeben und bei 50 °C über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Chloroform aufgenommen und mit K_2CO_3 versetzt. Die Suspension wurde 2 h bei Raumtemperatur

gerührt und anschließend der Feststoff abfiltriert. Das Polymer wurde anschließend aus eiskaltem Diethylether gefällt und zentrifugiert. Das Lösungsmittel wurde anschließend abdekantiert und das Polymer am Hochvakuum getrocknet. Das Rohpolymer wurde mittels Dialyse (MWCO = 1000) gegen VE-Wasser gereinigt. Nach 48 h dialysieren, wurde das Wasser mittels Gefriertrocknung entfernt. Das Polymer wurde in wenig Chloroform gelöst, aus eiskaltem Diethylether gefällt und vom Fällungsreagenz abzentrifugiert. Nach anschließender Trocknung unter Hochvakuum, wurde das Polymer als farbloser Feststoff erhalten.

Synthese von Poly(2-methyl-2-oxazolin)₇₇-NH₂ (PE1)

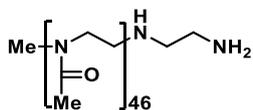


$M_{n,NMR}$	= 6628
$M_{n,GPC}$	= 7518
\bar{D}	= 1.09
Ausbeute	= 74%

Methyltriflat	55.30 μ L (0.5 mmol, 1 eq.)
2-Methyl-2-oxazolin	3.00 mL (35.0 mmol, 70 eq.)
Ethylendiamin	0.67 mL (10.0 mmol, 20 eq.)
Acetonitril	12.00 mL

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 2.06-2.13 (m, 232H, CH₃), 2.93-3.03 (m, 3H, CH₃), 3.43-3.48 (m, 334H, CH₂-CH₂). (OCW-IP-17c)

Synthese von Poly(2-methyl-2-oxazolin)₄₆-NH₂ (PE2)

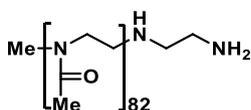


$M_{n,NMR}$	= 3990
$M_{n,GPC}$	= 5410
\bar{D}	= 1.15
Ausbeute	= 80%

Methyltriflat	193.30 μL (1.8 μmol , 1 eq.)
2-Methyl-2-oxazolin	6.00 mL (0.07 mmol, 40 eq.)
Ethylendiamin	2.4 mL (0.036 mmol, 20 eq.)
Acetonitril	20.00 mL

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 2.08-2.14 (m, 138H, CH_3), 2.95-3.06 (m, 3H, CH_3), 3.45-3.48 (m, 182H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$). (OCW-IP-30a_Me)

Synthese von Poly(2-methyl-2-oxazolin)₈₂-NH₂ (PE3)

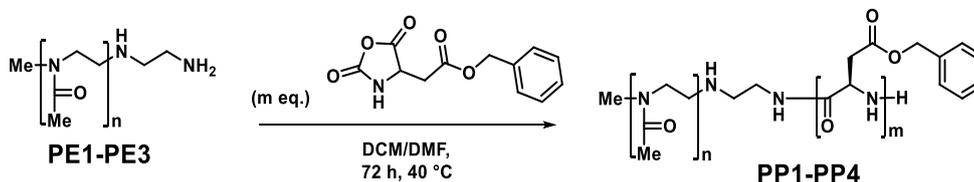


$M_{n,NMR}$	= 7053
$M_{n,GPC}$	= 9379
\bar{D}	= 1.18
Ausbeute	= 71%

Methyltriflat	110.48 μL (1.1 μmol , 1 eq.)
2-Methyl-2-oxazolin	6.00 mL (0.07 mmol, 70 eq.)
Ethylendiamin	1.30 mL (0.02 mmol, 20 eq.)
Acetonitril	20.00 mL

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 2.08-2.15 (m, 246H, CH_3), 2.96-3.07 (m, 3H, CH_3), 3.46-3.50 (m, 351H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$). (OCW-IP-30b_Me)

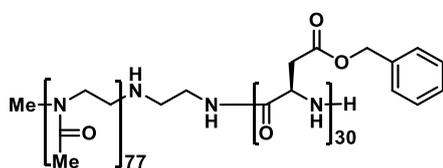
Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Herstellung der Blockcopolymerere PMOx-*b*-PBLA (PP1-PP4)



Zunächst wurde der Makroinitiator PMOx-NH₂ in 5 ml trockenem DCM gelöst und für 2 h bei Raumtemperatur mit K₂CO₃ gerührt. Parallel wurde das Monomer BLA-NCA in einer

Mischung aus trockenem DCM (5.0 ml) und trockenem DMF (0.5 ml) gelöst. Nachdem die Lösung des Makroinitiators zur Lösung des Monomers hinzugegeben wurde, wurde die Lösung für 72 h bei 40 °C gerührt. Das Polymer wurde durch direktes Fällern der Polymerisationslösung aus eiskaltem Diethylether gereinigt, indem es vom Fällungsreagenz abzentrifugiert wurde und der Fällungsprozess mehrere Male wiederholt wurde. Nach anschließender Trocknung des Polymers unter Hochvakuum, wurde das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Synthese von PMOx₇₇-b-PBLA₃₀ (PP1)

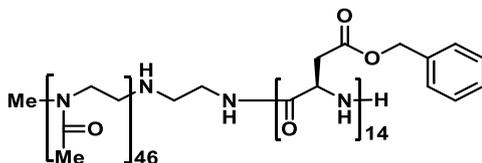


$M_{n,NMR}$	= 12845
$M_{n,GPC}$	= 11769
\bar{D}	= 1.32
Ausbeute	= 82%

PE1	188.85 mg (0.03 mmol, 1 eq.)
BLA-NCA	248.85 mg (1.00 mmol, 35 eq.)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 1.96-2.01 (m, 231H, CH_{3,PMOx}), 2.56-2.63 (m, 31H, CH₂-C=O_{PBLA}), 2.80-2.83 (m, 33H, CH₂-C=O_{PBLA}), 2.98-3.16 (m, 3H, CH₃), 3.37 (bs, 1469H, CH₂-CH_{2,PMOx}), 4.60-4.61 (m, 30H, CH_{PBLA}), 5.00 (bs, 57H, CH₂-C₆H_{5,PBLA}), 7.26 (bs, 147H, C₆H_{5,PBLA}), 8.18-8.20 (m, 23H, NH_{PBLA}). (OCW-IP-28)

Synthese von PMOx₄₆-b-PBLA₁₄ (PP2)

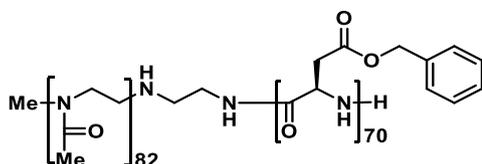


$M_{n,NMR}$	= 6885
$M_{n,GPC}$	= 7092
\bar{D}	= 1.25
Ausbeute	= 96%

PE2	412.48 mg (0.10 mmol, 1 eq.)
BLA-NCA	500.44 mg (1.51 mmol, 20 eq.)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 1.96-2.01 (m, 138H, CH_3, PMOx), 2.60-2.63 (m, 19H, $\text{CH}_2\text{-C=O}_{\text{PBLA}}$), 2.80-2.83 (m, 20H, $\text{CH}_2\text{-C=O}_{\text{PBLA}}$), 3.32-3.46 (m, 477H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2, \text{PMOx}$), 4.59-4.62 (m, 14H, CH_{PBLA}), 5.00 (bs, 30H, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5, \text{PBLA}$), 7.26 (bs, 65H, $\text{C}_6\text{H}_5, \text{PBLA}$), 8.18-8.20 (m, 10H, NH_{PBLA}). (OCW-IP-31)

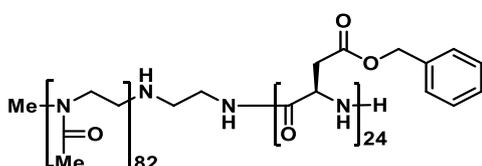
Synthese von PMOx₈₂-*b*-PBLA₇₀ (PP3)



$M_{n, \text{NMR}}$	= 21558
$M_{n, \text{GPC}}$	= 13742
\bar{D}	= 1.33
Ausbeute	= 85%

PE3	300.00 mg (0.04 mmol, 1 eq.)
BLA-NCA	742.15 mg (2.98 mmol, 70 eq.)

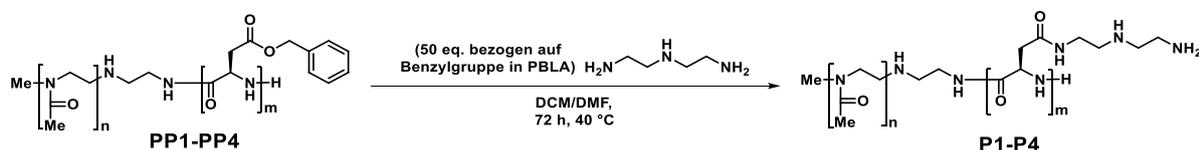
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 1.97-2.01 (m, 246H, CH_3, PMOx), 2.60-2.62 (m, 68H, $\text{CH}_2\text{-C=O}_{\text{PBLA}}$), 2.81-2.83 (m, 77H, $\text{CH}_2\text{-C=O}_{\text{PBLA}}$), 3.35 (bs, 823H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2, \text{PMOx}$), 4.61-4.62 (m, 70H, CH_{PBLA}), 5.00 (bs, 137H, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5, \text{PBLA}$), 7.26 (bs, 302H, $\text{C}_6\text{H}_5, \text{PBLA}$), 8.15-8.17 (m, 60H, NH_{PBLA}). (OCW-IP-36)

Synthese von PMOx₈₂-b-PBLA₂₄ (PP4)


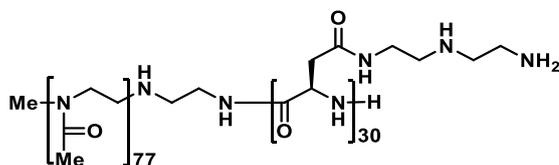
$M_{n,NMR}$	= 12026
$M_{n,GPC}$	= 10620
\bar{D}	= 1.18
Ausbeute	= 78%

PE3	300.00 mg (0.04 mmol, 1 eq.)
BLA-NCA	318.06 mg (1.28 mmol, 30 eq.)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 1.97-2.01 (m, 249H, CH_{3,PMOx}), 2.57-2.61 (m, 24H, CH₂-C=O_{PBLA}), 2.80-2.83 (m, 30H, CH₂-C=O_{PBLA}), 3.35 (bs, 348H, CH₂-CH_{2,PMOx}), 4.61-4.62 (m, 24H, CH_{PBLA}), 5.00 (bs, 48H, CH₂-C_{6H₅,PBLA}), 7.27 (bs, 110H, C_{6H₅,PBLA}), 8.16-8.17 (m, 20H, NH_{PBLA}). (OCW-IP-39)

Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Herstellung der Blockkatiomere PMOx-b-P[Asp(DET)] (P1-P4)


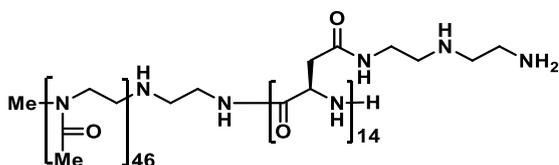
Das Blockcopolymer wurde in trockenem DMF (10 ml pro 0.01 mmol Polymer) gelöst und anschließend mit Diethylentriamin (DET) (50.00 eq. bezogen auf die Benzylesterfunktionen des Polymers) versetzt. Dann wurde die Reaktion für 72 h bei 40 °C gerührt. Anschließend wurde zu der Lösung tropfenweise 15-30 ml 10%ige Essigsäure bei 0 °C zugegeben. Das Polymer wurde durch 72 h Dialyse gegen 0.01 M HCl-Lösung und VE-Wasser gereinigt und durch Lyophilisieren getrocknet. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Synthese von PMOx₇₇-b-P[Asp(DET)]₃₀ (P1)

$M_{n,NMR}$	= 12696
$M_{n,GPC}$	= 8496
\bar{D}	= 1.12
Ausbeute	= 80%

PP1	173.1 mg (0.01 mmol, 1 eq.)
DET	2.18 mL (20.21 mmol, 1500 eq.)

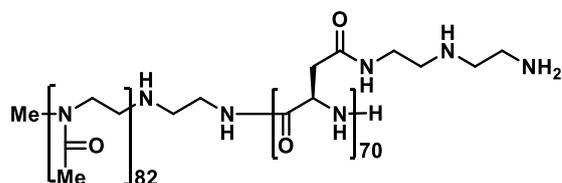
¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ (ppm) = 2.03-2.09 (m, 231H, CH_{3,PMOx}), 2.87-2.92 (m, 51H, NH-CH_{2,DET}), 3.31 (bs, 70H, CH₂-NH_{2,DET}), 3.47-3.51 (m, 342H, CH₂-CH_{2,PMOx}), 3.57-3.63 (m, 122, CH₂-NH-CH_{2,DET}), 4.71 (bs, 4H, CH_{PAsp}). (OCW-IP-29)

Synthese von PMOx₄₆-b-P[Asp(DET)]₁₄ (P2)

$M_{n,NMR}$	= 6820
$M_{n,GPC}$	= 4579
\bar{D}	= 1.22
Ausbeute	= 54%

PP2	300.00 mg (0.04 mmol, 1 eq.)
DET	3.30 mL (30.45 mmol, 700 eq.)

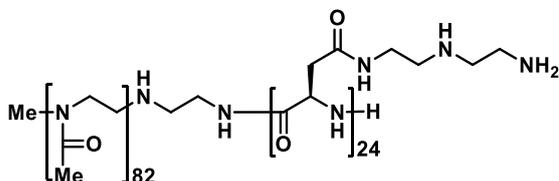
¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ (ppm) = 2.00-2.06 (m, 132H, CH_{3,PMOx}), 2.87-2.92 (m, 31H, NH-CH_{2,DET}), 3.29 (bs, 30H, CH₂-NH_{2,DET}), 3.47-3.48 (m, 179H, CH₂-CH_{2,PMOx}), 3.57 (bs, 72, CH₂-NH-CH_{2,DET}), 4.70 (bs, 10H, CH_{PAsp}). (OCW-IP-34)

Synthese von PMO_x82-b-P[Asp(DET)]₇₀ (P3)


$M_{n,NMR}$ = 17807
 $M_{n,GPC}$ = 9653
 \bar{D} = 1.04
 Ausbeute = 99%

PP3	400.00 mg (0.02 mmol, 1 eq.)
DET	7.00 mL (65.10 mmol, 3500 eq.)

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ (ppm) = 2.03-2.09 (m, 246H, CH_{3,PMOx}), 2.87-2.89 (m, 130H, NH-CH_{2,DET}), 3.30 (bs, 149H, CH₂-NH_{2,DET}), 3.45-3.51 (m, 489H, CH₂-CH_{2,PMOx}), 3.59 (bs, 203, CH₂-NH-CH_{2,DET}). (OCW-IP-37)

Synthese von PMO_x82-b-P[Asp(DET)]₂₄ (P4)


$M_{n,NMR}$ = 11907
 $M_{n,GPC}$ = 11397
 \bar{D} = 1.08
 Ausbeute = 60%

PP3	250 mg (0.02 mmol, 1 eq.)
DET	2.39 mL (22.08 mmol, 1200 eq.)

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ (ppm) = 2.01-2.07 (m, 246H, CH_{3,PMOx}), 2.84-2.89 (m, 46H, NH-CH_{2,DET}), 3.30 (bs, 66H, CH₂-NH_{2,DET}), 3.48-3.49 (m, 320H, CH₂-CH_{2,PMOx}), 3.58 (bs, 156, CH₂-NH-CH_{2,DET}), 4.39-5.17 (m, 18H, CH_{PAsp}). (OCW-IP-41)

5 Reduktiv-spaltbares PEO_xn-SS-P[Asp(DET)]_m Blockkatiomer für den Gentransport

5.1 Einleitung

Bei der Entwicklung von nicht-viralen Genvektoren ist eine hohe Gentransfereffizienz eine der wichtigsten Ziele. Die Arbeiten von *Wagner* et al. und *Kataoka* et al. haben hervorragend verdeutlicht, dass Polyplexmizellen mit einer biokompatiblen Schale Voraussetzung für *in vivo* Anwendungen ist. Dabei eignen sich insbesondere hydrophile, neutrale Polymere mit Stealth-Eigenschaften, wie beispielsweise PEG und PEO_x.^[22,58–60] Durch diese Hülle können unspezifische Wechselwirkungen mit Serumproteinen vermieden werden, die pDNA wird vor extra- und intrazellulärem Abbau geschützt und unspezifische Immunreaktionen durch Stimulierung der *toll like* Rezeptoren können umgangen werden.^[61–63] Allerdings leiden abgeschirmte Polyplexmizellen unter verringerter zellulärer Wechselwirkung, reduzierter Zellaufnahme und ineffizienter intrazellulärer Freisetzung der DNA. Die aufgeführten Nachteile führen letztendlich zu einer geringen Transfektionsaktivität und damit zu erheblichen Einschränkungen in ihrer Anwendung als nicht-virale Genvektoren.^[143,144] Die Gruppen von *Wagner* und *Kataoka* berichteten, wenn eine Abspaltung der Schale bzw. des abschirmenden Polymers durch Änderung des pH-Wertes^[143,145–147] oder des Redoxpotentials^[109] hervorgerufen wird, dass dadurch die Gentransfektionseffizienz erheblich gesteigert werden kann. Sie führten diese Beobachtung auf eine effizientere intrazelluläre Freisetzung der DNA zurück. *Kataoka* stellte fest, dass die Polyplexmizellen aus dem Blockkatiomer PEG-*b*-P[Asp(DET)], welches die *N*-(2-Aminoethyl)-2-Aminoethyl-Gruppe in der Seitenkette trägt, eine hohe Gentransfereffizienz neben niedriger Zytotoxizität aufwies.^[121] Im Vergleich zu den Polyplexmizellen aus dem P[Asp(DET)]-Homopolymer^[110] wurde jedoch eine niedrigere Transfektionsaktivität beobachtet, was auf die Behinderung durch die PEG-Palisade (PEG-Dilemma)^[71,148,149] schließen ließ. Um dieses Dilemma zu bewältigen, synthetisierten *Kataoka* et al. PEG-abspaltbare Polyplexmizellen mit einem spaltbaren Disulfid-Linker zwischen der PEG- und P[Asp(DET)]-Einheit.^[109] Der Disulfid-Linker kann auf mehreren

Etappen des endozytotischen Weges gespalten werden.^[150] Es ist bekannt, dass im intrazellulärem Raum eine 50- bis 1000-fach größere Gluthathion (GSH)-Konzentration herrscht als im extrazellulärem Raum.^[151–153] So liegt im Zytoplasma und Nukleus ein hohes reduktives Milieu vor, welches nicht nur durch die hohe Gluthathion (GSH)-Konzentration, sondern auch durch die Redox-Enzyme aus der Familie der Thioredoxine bedingt wird.^[109] Neben der reduktiven Spaltung im intrazellulärem Raum, kann ein Anteil der Disulfid-Spaltung bereits an der Zellmembran durch Proteine, wie die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI)^[150,151,154] und NADH-Oxidase (NOX), gespalten werden. Die vollständige Umsetzung der Spaltung wird dann während der Endozytose erreicht. Es soll angemerkt werden, dass die genannten Enzyme vorwiegend in Krebszellen, wie HeLa und Hepatomazellen, aktiv sind.^[153] Falls die Spaltung der abschirmenden Hülle schon an der Zellmembran stattfindet, würden Wechselwirkungen zwischen dem kationischen Polymer und der Zellmembran zunehmen und folglich die Zellaufnahme begünstigen. Im Falle der intrazellulären Spaltung im Endosom, würde die Effizienz des endosomalen Austritts gesteigert werden. Durch die Abspaltung des hydrophilen Polymers würde der osmotische Druck steigen und die freie kationische Ladung könnte die endosomale Membran stärker destabilisieren, was letztendlich zur Zerstörung der Membran führen würde. Selbst wenn die Disulfid-Spaltung erst im Zytoplasma bzw. in der Nähe des Nukleus stattfinden würde, könnte dadurch eine stärkere Wechselwirkung mit Polyanionen stattfinden und damit eine effizientere Freisetzung der DNA aus der Polyplexmizelle begünstigt werden. Dies würde folglich ebenfalls zu einer höheren Genexpression führen. Ganz gleich welcher Mechanismus für die Spaltung der abschirmenden Hülle verantwortlich ist, im Vergleich zu Blockkationomeren ohne biospaltbaren Linker, sollte immer eine höhere Gentransfektionseffizienz erreicht werden. In diesem Zusammenhang soll das von *Kataoka* et al. publizierte PEG₂₃₀-SS-P[Asp(DET)]₁₀₀ Blockkationomer vorgestellt werden. Durch die Einführung der Disulfid-Brücke wurde die Gentransfektionsaktivität um das Dreifache gesteigert.^[109,110] Um den Mechanismus der PEG-Abspaltung der Polyplexmizellen aus dem Blockkationomer PEG₂₃₀-SS-P[Asp(DET)]₁₀₀ aufzuklären, benutzten *Kataoka* et al. ³²P-radiomarkierte DNA und

beobachteten die Zellaufnahme in HeLa-Zellen.^[109] Die Komplexe aus PEG-SS-P[Asp(DET)] und PEG-*b*-P[Asp(DET)] wurden zu 0.5% in die Zellen aufgenommen, während das P[Asp(DET)]-Homopolymer 2-4% Zellaufnahme zeigte. Vermutlich ist die höhere Zellaufnahme auf die elektrostatische Wechselwirkung zwischen den positiven Ladungen des Komplexes aus P[Asp(DET)] und den negativen Ladungen der Plasmamembran zurückzuführen. Da es keinen Unterschied bei der Zellaufnahme der PEG-*b*-P[Asp(DET)]- und PEG-SS-P[Asp(DET)]-Mizellen gab, wurde davon ausgegangen, dass die PEG-Hülle im extrazellulärem Raum nicht gespalten wurde. Mithilfe von Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) Aufnahmen konnte festgestellt werden, dass der endosomale Austritt der PEG-SS-P[Asp(DET)]-Mizellen schneller und effizienter war, als der der PEG-*b*-P[Asp(DET)]-Mizellen. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass die reduktive Spaltung der Disulfid-Brücke während des endozytotischen Weges, vermutlich im Endosom, ablaufen muss.^[109] Kataoka zeigte die Steigerung der Gentransfektionseffizienz mithilfe eines peritonealen Krebsmodells nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo*. Er stellte fest, dass PEG-SS-P[Asp(DET)]-Mizellen eine höhere Genexpression in Tumoren hatten, als die PEG-*b*-P[Asp(DET)]-Mizellen, während die Bioverteilung der Komplexe identisch blieb. Bei der Komplexierung der Plasmid-DNA mit der Codierung für den menschlichen Tumornekrosefaktor α (hTNF- α) wurde mit PEG-SS-P[Asp(DET)]-Mizellen eine fünffach höhere Anti-Tumor-Aktivität in Tumoren erreicht als mit den nicht-spaltbaren Polyplexmizellen. Dabei wurde weder hepatische noch renale Toxizität beobachtet.^[110] Durch die Einführung eines reduktiv-spaltbaren Linkers in die Schale-Kern-Architektur der Polyplexmizelle wurde erfolgreich die Gentransfektionseffizienz *in vivo* und *in vitro* gesteigert, ohne dabei die Zytotoxizität zu erhöhen. Es bleibt zu erwähnen, dass bio-reduktiv-spaltbare Disulfid-Linker insbesondere für die Anwendung in der Krebstherapie eine Rolle spielen, da Krebszellen eine höhere intrazelluläre Gluthathion-Konzentration haben als gesunde Zellen.^[111]

5.2 Zielsetzung

Aufbauend auf den Literaturbeispielen zur erfolgreichen Steigerung der Gentransfektionsaktivität durch die Einführung eines biospaltbaren Linkers, sollen in einer einfachen Synthese Blockkationere bestehend aus einem reaktiv-spaltbaren Disulfid-Linker zwischen dem hydrophilen und biokompatiblen Poly(2-ethyl-2-oxazolin) (PEtOx) und dem bioabbaubaren Poly(aspartamid) (PAsp), welches eine kationische *N*-(2-Aminoethyl)-2-aminoethyl-Seitenkette trägt, dargestellt werden (Abbildung 28).

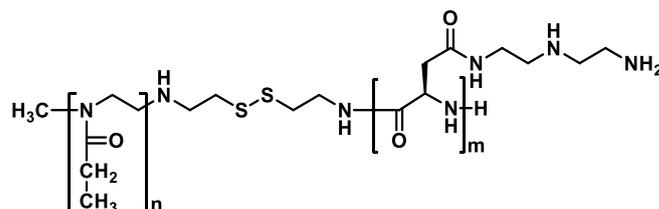


Abbildung 28 Zielstruktur der reaktiv-spaltbaren Blockkationere.

Die synthetisierten Blockkationere mit der Polymerstruktur PEtOx_n-SS-P[Asp(DET)]_m sollen biokompatibel sein und sich in den molaren Massen und Blocklängenverhältnissen (*n/m*) unterscheiden. Dafür soll PEtOx als hydrophile Polymer-Einheit verwendet werden, um sich von den bisher veröffentlichten Blockkationeren mit einem Disulfid-Linker zu unterscheiden.^[107–110,155–159] Mit dem Ziel die Gentransfektionseffizienz erfolgreich zu steigern und eine niedrige Zytotoxizität beizubehalten, schien es zudem sinnvoll eine PEG-Alternative zu nutzen. Die Arbeitsgruppe von *Textor* stellte nämlich bei einem direkten Vergleich von PMOx und PEG fest, dass PMOx deutlich stabiler unter physiologischen Bedingungen war als PEG.^[94] PEG bildete toxische und oxidative Abbauprodukte und induzierte sogar Immunreaktionen.^[160] Weiterhin wurde eine deutlich geringere unspezifische Abscheidung in Organen bei der Verwendung von Poly(2-methyl-2-oxazolin)en anstelle von PEG festgestellt.^[161] PEG-Polymere können zudem eine Vakuolisierung in den Nieren verursachen.^[162–164] Als Vakuole wird ein mit Flüssigkeit gefüllter Hohlraum bezeichnet, der Proteine oder organische Verbindungen speichert, die giftig wirken oder den Stoffwechsel stören. In der Literatur wurde die Synthese und

Untersuchung von PEtOx-SS-P[Asp(DET)]-Blockkatiomeren als nicht-virale Genvektoren noch nicht beschrieben. Neben guten Gesamtausbeuten und vollständiger Charakterisierung der Blockkatiomere soll besonders das Ziel erreicht werden, eine effiziente Komplexierung der Plasmid-DNA in reduktiv-spaltbaren Polyplexmizellen zu erreichen (Abbildung 29).

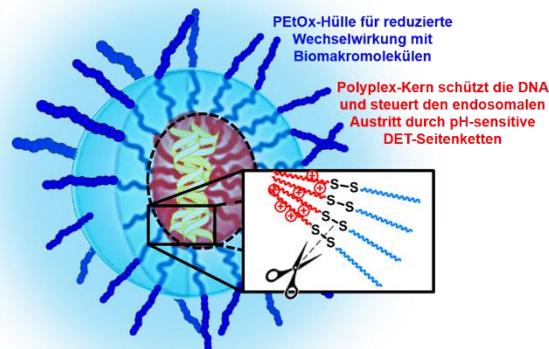


Abbildung 29 Schematische Darstellung der Polyplexmizelle mit einer reduktiv-spaltbaren PEtOx-Hülle.

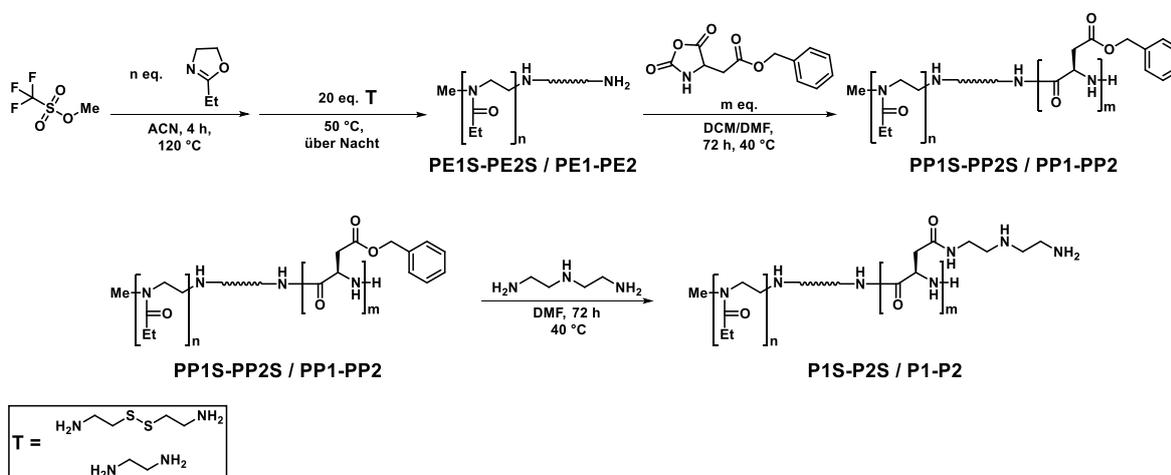
Die Ladungsdichte des Mizellenkerns und die DNA sollen durch die hydrophile PEtOx-Hülle abgeschirmt werden, so dass die Wechselwirkung mit Serumproteinen und anderen Biomakromolekülen reduziert wird. Der Polyplexmizellenkern soll die DNA effizient verpacken, so dass diese während des Transports vor Nuklease-Angriffen und den Abbau durch andere Enzyme geschützt bleibt. Durch die Abspaltung der abschirmenden PEtOx-Hülle soll die DET-Seitenkette, welche nachweislich aufgrund der unterschiedlichen pK_S-Werte puffernde Eigenschaften in saurer Umgebung (pH 5) hat, den endosomalen Austritt effizienter auslösen. Die reduktiv-spaltbaren Polyplexmizellen sollen aufgrund der PEtOx-Palisade eine vergleichbare kolloidale Stabilität und identische Eigenschaften, wie Größe, Morphologie und Oberflächenladung haben, wie die PEtOx_n-b-P[Asp(DET)]_m/pDNA-Mizellen ohne Disulfid-Linker. Im intrazellulärem Raum bzw. unter reduktiven Bedingungen sollen die PEtOx-SS-P[Asp(DET)]-Mizellen aufgrund des effizienteren endosomalen

Austritts eine höhere Gentransfektionsaktivität zeigen, bei gleich bleibender niedriger Zytotoxizität. Weiterhin soll anhand der unterschiedlichen Polymerarchitekturen analysiert werden, welche Polymereigenschaften einen Effekt auf die Bildung und Eigenschaften der Polyplexmizellen haben.

5.3 Ergebnisse und Diskussion

5.3.1 Synthese und Charakterisierung reduktiv-spaltbarer PEtOx-SS-P[Asp(DET)] Blockkationere mit einem Disulfid-Linker

Dieser Abschnitt der Arbeit demonstriert einen einfachen Syntheseweg für eine innovative, reduktiv-spaltbare Polymerpeptid-Struktur basierend auf dem hydrophilen Poly(2-ethyl-2-oxazolin) (PEtOx) und des bioabbaubaren PolyAspartats (PAsp), welches mit der kationischen Diethylentriamin (DET)-Seitenkette modifiziert vorlag (Schema 4).



Schema 4 Synthese der reduktiv-spaltbaren PEtOx_n-SS-P[Asp(DET)]_m Blockkationere (**P1S**, **P2S**) und der Referenzpolymere PEtOx_n-b-P[Asp(DET)]_m (**P1**, **P2**).

Es wurden zwei Blockkationere **P1S** und **P2S** der Struktur PEtOx_n-SS-P[Asp(DET)]_m mit einem spaltbaren Disulfid-Linker zwischen dem hydrophilen PEtOx_n- und dem kationischen P[Asp(DET)]_m-Polymerblock synthetisiert. Die beiden Blockkationere unterschieden sich hierbei in der Länge des kationischen P[Asp(DET)]_m-Segmentes, der

Blocklängenverhältnisse n/m und der molaren Masse, um mögliche Einflüsse der Polymerarchitektur zu untersuchen. Neben der Polymerarchitektur lag der Fokus dieses Abschnittes auf den Vergleich zwischen reaktiv-spaltbaren und nicht-spaltbaren Blockkatiomeren. Dementsprechend wurden zwei Referenzpolymere **P1** und **P2** der Struktur $\text{PEtOx}_n\text{-}b\text{-P[Asp(DET)]}_m$ mit vergleichbaren molaren Massen und Polymerzusammensetzungen synthetisiert.

Synthese und Charakterisierung der Makroinitiatoren mit einem Disulfid-Linker Poly(2-ethyl-2-oxazolin)_n-SS-NH₂ (PE1S, PE2S) und der entsprechenden Referenzpolymere Poly(2-ethyl-2-oxazolin)_n-NH₂ (PE1, PE2). Die vier PEtOx Homopolymere **PE1S**, **PE2S**, **PE1** und **PE2** wurden in einer lebenden kationisch, ringöffnenden Polymerisation hergestellt. Alle vier Polymerisationen wurden in Acetonitril bei 120 °C durchgeführt und mit Methyltriflat als Initiator initiiert. Die Homopolymere $\text{PEtOx}_n\text{-SS-NH}_2$ (**PE1S**, **PE2S**) mit einem Disulfid-Linker wurden mit Cystamin als Terminierungsreagenz dargestellt. Die Referenzpolymere $\text{PEtOx}_n\text{-NH}_2$ (**PE1**, **PE2**), die zum Vergleich dienen sollten, wurden mit Ethylendiamin terminiert. Die Einführung einer endständigen, nukleophilen Amin-Gruppe ist hierbei eine notwendige Voraussetzung für die Initiierung der anschließenden Blockcopolymerisation mit BLA-NCA (Schema 4). Der Polymerisationsgrad der Polymere wurde mithilfe der ¹H-NMR und der Endgruppenanalyse bestimmt (Abbildung 30A).

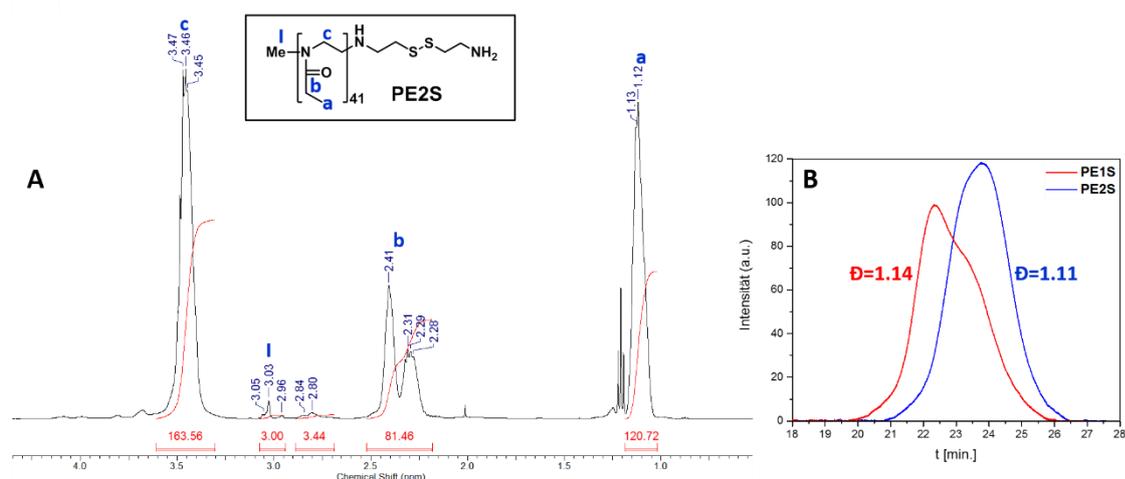


Abbildung 30 (A) ^1H -NMR Spektrum des Homopolymers PEtOx₄₁-SS-NH₂ (**PE2S**); (B) GPC-Chromatogramme der Homopolymere PEtOx-SS-NH₂ (**PE1S** (in rot), **PE2S** (in blau)).

Das Signal bei 3.05-2.96 ppm im ^1H -NMR Spektrum von **PE2S** wurde eindeutig der Methyl-Endgruppe zugeordnet, die vom Initiator Methyltriflat generiert wurde (Abbildung 30A). Durch das Referenzieren auf dieses Signal wurden die Polymerisationsgrade (n) und die molaren Massen (M_n) der vier Homopolymere ermittelt (Tabelle 5).

Tabelle 5 Analytischen Daten der Homopolymere PEtOx _{n} -SS-NH₂ (**PE1S**, **PE2S**) und der Referenzpolymere PEtOx _{n} -NH₂ (**PE1**, **PE2**).

No.	n^a	M_n^a [g/mol]	M_n^b [g/mol]	Đ^b	Ausbeute [%]
PE1S	56 (60)	5 718	6 840	1.14	38
PE2S	41 (30)	4 231	5 010	1.11	29
PE1	60 (56)	6 023	8 020	1.07	26
PE2	44 (56)	4 437	5 780	1.08	98

a) Polymerzusammensetzung und Molmasse wurden über ^1H -NMR-Spektroskopie in CDCl_3 und Endgruppenanalyse bestimmt, die theoretisch eingesetzten Äquivalente sind in Klammern angegeben; b) Molmasse M_n und Polydispersitätsindex Đ wurden über die GPC-Analyse bestimmt (PMMA Standards in DMF/5 mg/mL LiBr).

Es wurden Poly(2-ethyl-2-oxazolin)e mit einem Disulfid-Linker und einer Wiederholungseinheit von 56 (**PE1S**) und 41 (**PE2S**) erhalten. Als Referenzpolymere dazu wurden Poly(2-ethyl-2-oxazolin)e ohne Disulfid-Funktion und mit 60 (**PE1**) und 44 (**PE2**) Wiederholungseinheiten dargestellt. Die Polymere **PE1S** und **PE1** hatten ähnliche molare Massen (M_n) von ca. 6 kDa, während **PE2S** und **PE2** mit ca. 4 kDa kleinere molare Massen

aufwiesen. Darüber hinaus wurden die molaren Massen und die Polydispersitätsindices mittels GPC-Analysen bestimmt, wobei die molaren Massen aus der ¹H-NMR-Analyse im Folgenden verwendet wurden, da es im Vergleich zur GPC eine absolute Methode darstellt. Alle vier Polymerisationen zeigten eine enge Molmassenverteilung mit Polydispersitätsindices (Đ) von 1.07-1.14, die wiederum charakteristisch für eine erfolgreiche lebende Polymerisation sind (Abbildung 30B). Alle vier Homopolymere wurden als Makroinitiatoren in der folgenden Blockcopolymerisation von BLA-NCA eingesetzt.

Synthese und Charakterisierung der Disulfidhaltigen Blockcopolymere PEtOx_n-SS-PBLA_m (PP1S, PP2S) und deren Referenzpolymere PEtOx_n-*b*-PBLA_m (PP1, PP2). Für die Darstellung der reaktiv-spaltbaren Blockcopolymere mit einem Disulfid-Linker zwischen dem hydrophilen PEtOx_n-Polymers und dem hydrophoben PBLA_m-Polymer wurden die Homopolymere **PE1S** und **PE2S** als Makroinitiatoren in einer lebenden, nukleophil ringöffnenden Polymerisation von β-Benzyl-L-asparaginsäure-*N*-carboxyanhydrid (BLA-NCA) verwendet. Für die Synthese der Referenzpolymere ohne spaltbaren Linker, wurden die Homopolymere **PE1** und **PE2** als Makroinitiatoren eingesetzt. Abbildung 31 demonstriert die erfolgreiche Blockcopolymerisation mit **PE2S** als Makroinitiator anhand des ¹H-NMR-Spektrums von **PP2S**.

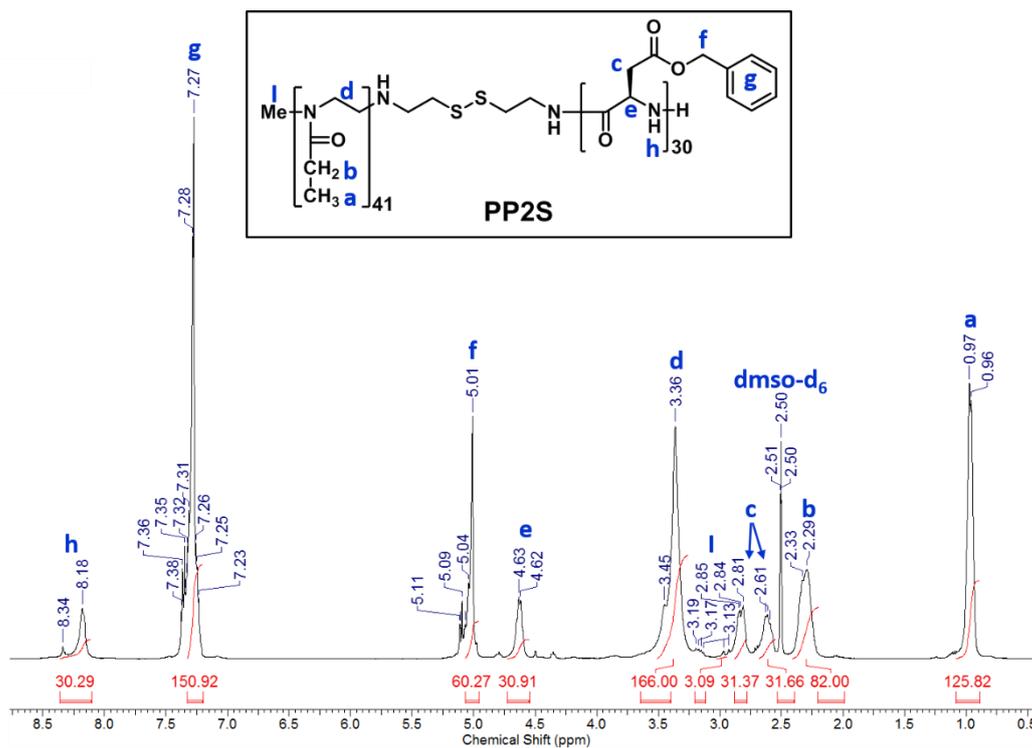


Abbildung 31 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Blockcopolymeres PEtO $_{41}$ -SS-PBLA $_{30}$ (**PP2S**) in dmsO-d_6 .

Die neuen Signale mit der chemischen Verschiebung von 2.61, 2.81, 4.63, 5.01, 7.27 und 8.16 ppm im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von PEtO $_{41}$ -SS-PBLA $_{30}$ (**PP2S**) bestätigten den Erfolg der Blockcopolymerisation. Durch die erfolgreiche Polymerisation von BLA-NCA wurde eine erfolgreiche Terminierung mit Cystamin und damit die erfolgreiche Modifizierung mit einem Disulfid-Linker bestätigt. Der Polymerisationsgrad und die molaren Massen der Blockcopolymeren wurden anhand des Signals e kalkuliert. Der Erfolg der Blockcopolymerisation wurde weiterhin mittels GPC- und IR-Analysen belegt (Abbildung 32).

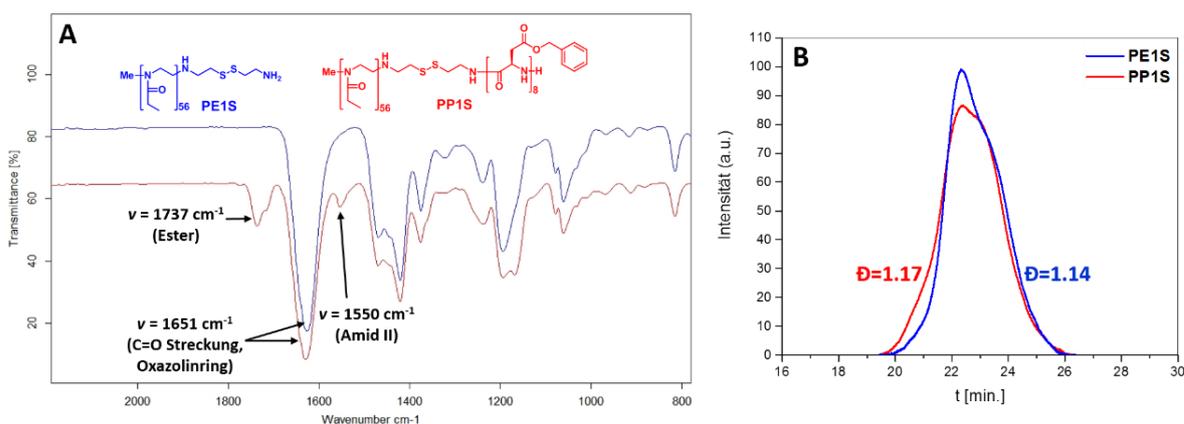


Abbildung 32 (A) IR-Spektren des Makroinitiators **PE1S** (blau) und des Blockcopolymeren **PP1S** (rot); (B) GPC-Chromatogramme des Makroinitiators **PE1S** (blau) und des Blockcopolymeren **PP1S** (rot).

Es wurden Banden der Ester (1737 cm^{-1})- und der Amidgruppe (1550 cm^{-1}) im IR-Spektrum der Blockcopolymeren gefunden, was auf eine erfolgreiche Blockcopolymerisation schließen ließ (Abbildung 32A). Der Polydispersitätsindex (\bar{D}) von 1.17 bestätigte eine erfolgreiche lebende Polymerisation mit einer engen Molmassenverteilung (Abbildung 32B). Die analytischen Daten der reaktiv-spaltbaren Blockcopolymeren (**PP1S**, **PP2S**) und der Referenzpolymere (**PP1**, **PP2**) wurden in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6 Analytische Daten der Blockcopolymeren PEtO_xn-SS-PBLA_m (**PP1S**, **PP2S**) und der Referenzpolymere PEtO_xn-b-PBLA_m (**PP1**, **PP2**).

No.	n ^{a)}	m ^{a)}	n/m	M _n ^{a)} [g/mol]	M _n ^{b)} [g/mol]	\bar{D} ^{b)}	d _h ^{c)} [nm]	Ausbeute [%]
PP1S	56 (60)	8 (12)	7.0	7 375	8 190	1.17	81 ± 3	98
PP2S	41 (30)	30 (32)	1.4	10 448	8 910	1.26	219 ± 17	91
PP1	60 (56)	7 (9)	8.6	7 474	7 150	1.08	39 ± 6	83
PP2	44 (56)	31 (33)	1.4	10 861	7 170	1.18	179 ± 16	76

a) Polymerzusammensetzung und Molmasse wurden über ¹H-NMR-Spektroskopie in dms_o-d₆ und Endgruppenanalyse bestimmt, die theoretisch eingesetzten Äquivalente sind in Klammern angegeben; b) Molmasse M_n und Polydispersitätsindex \bar{D} wurden über die GPC-Analyse bestimmt (PMMA Standards in DMF/5 mg/mL LiBr); c) der hydrodynamische Durchmesser d_h wurde über DLS Messungen einer 1 mM Polymerlösung in Wasser bestimmt.

Da für alle vier Blockcopolymeren die kalkulierten Polymerisationsgrade für PBLA nur sehr wenig von den theoretisch eingesetzten Äquivalenten abwichen, wurde davon ausgegangen, dass alle Homopolymere die Polymerisation von BLA-NCA gut initiiert hatten.

Folglich war die Terminierung mit Cystamin bzw. Ethylendiamin im vorhergegangenen Abschnitt bei allen vier Polymerisationen erfolgreich. Demnach wurden zwei reduktiv-spaltbare Blockcopolymere der Zusammensetzung PEtOxn-SS-PBLA_m mit molaren Massen von 7 kDa (**PP1S**) und 10 kDa (**PP2S**) erhalten. Die Blockcopolymere unterschieden sich weiterhin in dem Blocklängenverhältnis n/m. Das Blockcopolymer **PP1S** hatte nur 8 hydrophobe PBLA-Blöcke mit einem Blocklängenverhältnis hydrophil zu hydrophob (n/m) von 7. Das Blockcopolymer **PP2S** hingegen enthielt 30 hydrophobe PBLA-Einheiten und somit ein kleineres Blocklängenverhältnis (n/m) von 1.4. Das Referenzpolymer **PP1** war aufgrund der molaren Masse von 7 kDa und mit 7 PBLA-Einheiten sehr gut vergleichbar mit dem reduktiv-spaltbaren Polymer **PP1S**. Das Referenzpolymer **PP2** hatte eine gut vergleichbare molare Masse von 11 kDa und ein identisches Blocklängenverhältnis von 1.4 mit 31 PBLA-Einheiten. Außerdem wurden alle vier Blockcopolymere in einer exzellenten Ausbeute von 76-98% erhalten. Aufgrund des eingeführten hydrophoben PBLA-Polymerblocks verfügten die synthetisierten Blockcopolymere über amphiphile Eigenschaften und bildeten in Wasser oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) mizellare Strukturen aus. Die Größen der gebildeten Aggregate wurden mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) ermittelt. Der gemessene hydrodynamische Durchmesser von 39-219 nm deutete auf die Bildung von größeren Aggregaten anstelle von Mizellen hin. Vergleicht man die Größen des Polymers **PP1S** mit **PP2S**, so ist deutlich erkennbar, dass die Länge des hydrophoben Blocks PBLA einen Einfluss auf die Aggregatgröße hatte. Polymer **PP1S** mit nur 8 PBLA-Einheiten bildete Aggregate in Wasser mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 81±3 nm. Polymer **PP2S** mit 30 Wiederholungseinheiten bildete dagegen Aggregate mit einem Durchmesser von 219±17 nm. Vergleicht man diese reduktiv-spaltbaren Polymere mit deren Referenzpolymere, so fällt auf, dass die Referenzpolymere ohne Disulfid-Linker kleinere Aggregate in Wasser bildeten. Die Aggregate des Referenzpolymers **PP1** mit 7 PBLA-Einheiten waren 39±6 nm groß. Das Referenzpolymer **PP2** mit 31 Wiederholungseinheiten bildete, aufgrund des höheren hydrophoben Anteils, größere Aggregate als **PP1**, aber kleinere Aggregate als das spaltbare **PP2S**, mit einem

Durchmesser von 179±16 nm. Die Referenzpolymere formten kleinere Aggregate, da die Cystamin-Einheit der reduktiv-spaltbaren Blockcopolymeren einen zusätzlichen hydrophoben Effekt hatte. Zusammenfassend wurden zwei reduktiv-spaltbare amphiphile Blockcopolymeren der Architektur PEtOx_n-SS-PBLA_m mit Molmassen (M_n) von 7 bzw. 10 kDa und mit Blocklängenverhältnissen (n/m) von 7 und 1.4 hergestellt. Außerdem wurden zwei Referenzpolymere der Architektur PEtOx_n-*b*-PBLA_m mit vergleichbaren molaren Massen und Blocklängenverhältnissen synthetisiert.

Synthese und Charakterisierung der reduktiv-spaltbaren Blockkationomere PEtOx_n-SS-P[Asp(DET)]_m (P1S, P2S) und deren Referenzpolymere PEtOx_n-*b*-P[Asp(DET)]_m (P1, P2).

Für die Darstellung von reduktiv-spaltbaren Blockkationomeren mit einem Disulfid-Linker zwischen dem hydrophilen und kationischen Polymerblock, wurden die amphiphilen Blockcopolymeren (**PP1S**, **PP2S**) in einer polymeranalogen Aminolyse-Reaktion mit Diethylentriamin (DET) zu kationischen Blockcopolymeren funktionalisiert. Dabei wurden sie mit einem 50-fachen Überschuss an DET in Bezug auf die Benzylgruppe im PBLA-Segment umgesetzt. Der große Überschuss ist notwendig, um mögliche inter- oder intramolekulare Vernetzung durch DET während der Aminolyse zu vermeiden.^[109] Die Referenzpolymere ohne einen spaltbaren Linker (**P1**, **P2**) wurden ebenfalls durch eine Aminolyse-Reaktion der amphiphilen Blockcopolymeren **PP1** und **PP2** erhalten. Der Erfolg der polymeranalogen Reaktion wurde unter anderem mittels ¹H-NMR in D₂O demonstriert (Abbildung 33A).

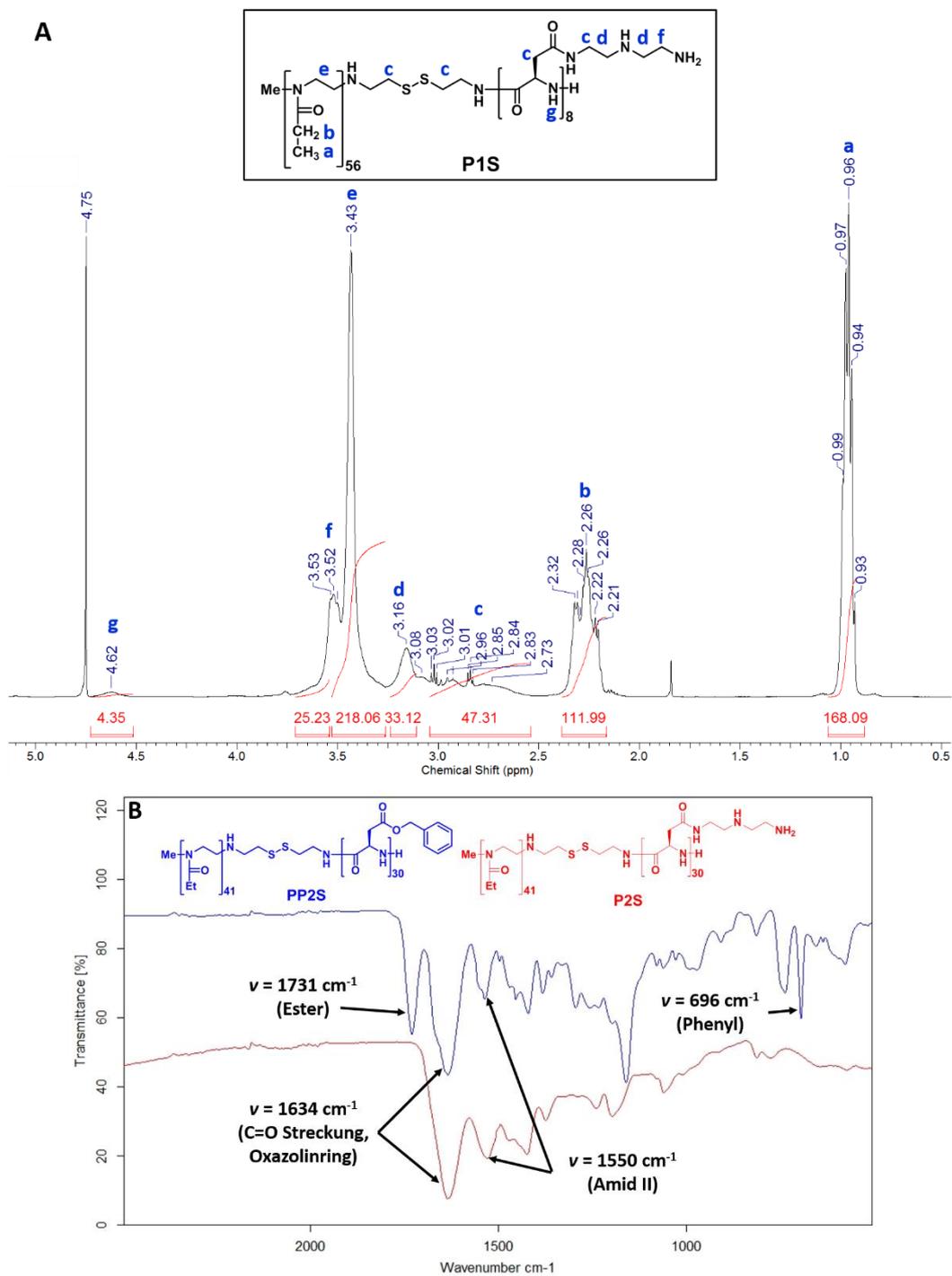


Abbildung 33 (A) ^1H -NMR-Spektrum des Blockkationomers **P1S** in D_2O ; (B) IR-Spektren des Blockcopolymeres **PP2S** (blau) und Blockkationomers **P2S** (rot).

Der Erfolg der Reaktion wurde unter anderem anhand der fehlenden Signale der Benzylgruppen (PBLA) im Tieffeld festgestellt. Des Weiteren wurden die neuen Signale mit der chemischen Verschiebung von 2.85, 3.16 und 3.52 ppm dem mit DET modifizierten PAsp-Segment zugewiesen. Einen weiteren Beleg für die erfolgreiche Aminolyse-Reaktion demonstriert der Vergleich der IR-Spektren des Blockcopolymeres mit dem anschließend modifizierten Blockkatiomer (Abbildung 33B). Die charakteristische Bande für die Esterfunktion bei 1731 cm⁻¹ wurde im IR-Spektrum des Blockkatiomers nicht mehr beobachtet, was auf eine erfolgreiche Aminolyse-Reaktion mit DET hinweist. Die Bande für die C=O-Streckung des PEtOx ($\nu = 1634 \text{ cm}^{-1}$), sowie die Amid II-Bande ($\nu = 1550 \text{ cm}^{-1}$), waren auch nach der Aminolyse vorhanden. Tabelle 7 fasst die analytischen Daten der reduktiv-spaltbaren Blockkatiomere **P1S**, **P2S** und deren Referenzpolymere **P1**, **P2** zusammen.

Tabelle 7 Analytische Daten der Blockkatiomere PEtOxn-SS-P[Asp(DET)]_m (**P1S**, **P2S**) und Referenzpolymere PEtOxn-b-P[Asp(DET)]_m (**P1**, **P2**).

No.	n ^{a)}	m ^{a)}	n/m	M _n ^{a)} [g/mol]	M _n ^{b)} [g/mol]	Đ ^{b)}	Ausbeute [%]
P1S	56 (60)	8 (12)	7.0	7 336	9 060	1.04	34
P2S	41 (30)	30 (32)	1.4	10 298	9 090	1.04	35
P1	60 (56)	7 (9)	8.6	7 439	9 320	1.04	28
P2	44 (56)	31 (33)	1.4	10 707	12 490	1.09	46

a) Polymerzusammensetzung und Molmasse wurden über ¹H-NMR-Spektroskopie in D₂O und Endgruppenanalyse bestimmt, die theoretisch eingesetzten Äquivalente sind in Klammern angegeben; b) Molmasse M_n und Polydispersitätsindex Đ wurden über die GPC-Analyse bestimmt (PMMA Standards in DMF/5 mg/mL LiBr);

Die GPC Analyse lieferte monomodale Molmassenverteilungen nach der polymeranalogen Reaktion mit Polydispersitätsindices (Đ) im Bereich von 1.04-1.09. Somit konnten inter- oder intramolekulare Vernetzungen mit DET während der Aminolyse ausgeschlossen werden. Die vier Blockkatiomere wurden in moderaten Ausbeuten von 28-46% erhalten. ¹H-NMR Spektroskopie wurde genutzt, um Polymerzusammensetzung, sowie die molare Masse (M_n) zu ermitteln. Es wurden zwei reduktiv-spaltbare Blockkatiomere der Zusammensetzung PEtOxn-SS-P[Asp(DET)]_m mit molaren Massen von 7 kDa (**P1S**) und 10 kDa (**P2S**) erhalten. Die Blockkatiomere hatten unterschiedliche Blocklängenverhältnisse (n/m) von 7.0 für **P1S** und 1.4 für **P2S**. Blockkatiomer **P1S** bestand

aus nur 8 kationischen P[Asp(DET)]-Einheiten, wohingegen Blockkatiomer **P2S** über 30 kationische Wiederholungseinheiten verfügte. Die Referenzpolymere ohne einen Disulfid-Linker hatten vergleichbare molare Massen von 7 kDa für **P1** und 11 kDa für **P2**. Sie verfügten ebenfalls über vergleichbare P[Asp(DET)]-Wiederholungseinheiten und Blocklängenverhältnisse (n/m) von 8.6 (**P1**) und 1.4 (**P2**). Mithilfe der lebenden Polymerisation und einer anschließenden polymeranalogen Reaktion mit DET wurden Blockkatiomere mit definierten Blocklängen, Blocklängenverhältnissen und molaren Massen basierend auf einem einfachen Syntheseweg und in guten Ausbeuten hergestellt. Anhand der unterschiedlichen molaren Massen und Polymerzusammensetzungen wurde der Einfluss der Polymerarchitektur auf die Komplexbildung mit DNA, die kolloidale Stabilität und insbesondere die Transfektionseffizienz untersucht. Im Fokus dabei stand die Bestätigung der Arbeitshypothese, dass die Gentransfektionsaktivität einer reduktiv-spaltbaren Polymerstruktur höher ist, als bei vergleichbaren Blockkatiomeren ohne Disulfid-Linker.

5.3.2 Bildung und Charakterisierung der Polyplexmizellen mit einer reduktiv-spaltbaren PEtOx-Schale

Die synthetisierten Blockkatiomere PEtOx_n-SS-P[Asp(DET)]_m (**P1S**, **P2S**) mit einem reduktiv-spaltbaren Disulfid-Linker wurden als nicht-virale Genvektoren für den Transport von pDNA untersucht. Durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen **P1S**, **P2S** und der negativ geladenen DNA wurden Polyplexmizellen gebildet und hinsichtlich ihrer Eigenschaften charakterisiert. Die Bildung der Polyplexmizellen wurde bereits im Abschnitt 4.3.2 dieser Arbeit detailliert erklärt. Alle Untersuchungen richteten sich nach den bekannten biologischen Barrieren und Hindernissen für nicht-virale Genvektoren.^[29] Die Polyplexmizellen mit der reduktiv-spaltbaren PEtOx-Schale wurden auf ihre kolloidale Stabilität in HEPES-Puffer, isotonischen Kochsalz-Lösungen und im saurem Milieu (pH 5) über eine gewisse Zeitspanne untersucht. Es wurde weiterhin die DNA-Bindungseffizienz

der Blockkatiomere **P1S**, **P2S** ermittelt und mit den Referenzpolymeren **P1**, **P2** verglichen. Die Polyplexmizellen wurden dabei in den N/P-Verhältnissen von 0.2-300 gebildet, um den Einfluss des zunehmenden N/P-Verhältnisses zu ermitteln. Des Weiteren wurden die Größe, Morphologie und die Oberflächenladung der Komplexe studiert, um einen Hinweis auf die Zellaufnahme bzw. die zelluläre Wechselwirkung treffen zu können. In Hinblick auf die Zellaufnahme ist neben maximaler Gentransfektionseffizienz eine minimale Zytotoxizität wünschenswert. Aus diesem Grund wurden zytotoxische Effekte aller vier Blockkatiomere und Polyplexmizellen ermittelt. Dabei wurde angenommen, dass die reduktiv-spaltbaren Blockkatiomere (**P1S**, **P2S**) eine geringere Zytotoxizität aufweisen als die Referenzpolymere (**P1**, **P2**), da sie unter reduktiven intrazellulären Bedingungen in zwei kleinere Polymersegmente mit niedrigerer Molmasse zerfallen. In Hinblick auf die Anforderungen im extrazellulären Raum ist eine stabile mizellare Schale-Kern-Struktur sehr wichtig. Durch eine hydrophile Schale werden unspezifische Wechselwirkungen mit Biomakromolekülen reduziert und die im Kern komplexierte DNA vor Nuklease-Angriffen geschützt. Im intrazellulären Raum hingegen muss der Komplex dissoziieren, damit die DNA freigelassen wird, um die gewünschte Genexpression starten zu können. Dieser Vorgang passiert bevorzugt durch Wechselwirkungen mit polyanionischen Biomolekülen. Aus diesem Grund wurde das Dissoziationsverhalten der Nanokomplexe in einer Modell-Austauschreaktion mit Heparin, als Polyanion studiert. Bei den Untersuchungen wurden die Einflüsse der unterschiedlichen molaren Massen (M_n), Blocklängenverhältnisse (n/m) und Längen des kationischen Segments (m) der Polymere **P1S** und **P2S** untersucht. Zudem wurde die Spaltung der Polyplexmizellen aus **P1S** und **P2S** unter reduktiven Bedingungen studiert. Ein weiterer Aspekt der Charakterisierung war die Effizienz des Gentransfers. Dabei stand vor allem der Vergleich zwischen den spaltbaren Polyplexmizellen mit den Polyplexmizellen aus den Referenzpolymeren **P1**, **P2** im Fokus. Es wurde angenommen, dass die Gentransfektionseffizienz mit den Blockkatiomeren **P1S**, **P2S** höher ist, da durch die abspaltbare neutrale PEtOx-Hülle eine bessere Wechselwirkung sowohl mit der Zellmembran, als auch mit der endosomalen Membran stattfinden kann. Die Fähigkeit eine

hohe Anzahl an Zellen zu transfizieren, ist einer der wichtigsten Ziele bei der Entwicklung von nicht-viralen Genvektoren.

Untersuchung der DNA-Bindungseffizienz der reduktiv-spaltbaren Blockkationomere P1S, P2S und der Referenzpolymere P1, P2. Die Bindungseffizienz beschreibt, die Kraft der Blockkationomere die DNA durch elektrostatische Wechselwirkungen im Kern vollständig zu verpacken. Eine vollständige Komplexierung der DNA ist der erste Schritt für eine effiziente Gentransfektion. Die Bindungseffizienz der synthetisierten Blockkationomere wurde in zwei unabhängigen Experimenten untersucht. Auf der einen Seite wurde die Gelelektrophorese verwendet, um die Migration der freien DNA im Agarosegel zu visualisieren. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes an das mit Proben beladene Agarose-Gel, wandern die DNA-Polymer-Komplexe in Abhängigkeit ihrer Größe und Ladungsdichte. Durch einen Fluoreszenzfarbstoff, welcher in der DNA interkaliert ist, kann die Migration sichtbar gemacht werden. Zusätzlich wurde das SYBR Green Ausschluss-Assay durchgeführt, um den Anteil der freien DNA durch die Messung der Fluoreszenzintensität zu evaluieren.

Zunächst soll auf die Untersuchung der Bindungseffizienz anhand der Gelelektrophorese eingegangen werden. Es wurden Polyplexmizellen mit den N/P-Verhältnissen von 0.2 bis 300 gebildet, um festzustellen, ab welchem N/P-Verhältnis die DNA komplett komplexiert vorlag. Aufgrund der Ladungsneutralisierung der DNA durch die Blockkationomere, würde nur freie oder nicht vollständig komplexierte DNA im elektrischen Feld wandern. Bei der Untersuchung wurde der Einfluss der unterschiedlichen molaren Massen (M_n) und der Konstitutionen der Blockkationomere studiert. Die reduktiv-spaltbaren Blockkationomere **P1S** und **P2S** wurden mit der Bindungseffizienz der Referenzpolymere **P1** und **P2** verglichen. **Abbildung 34** zeigt das 1%-ige Agarosegel, welches mit den Polyplexmizellen beladen wurde und bei einer Spannung von 120 V für 20 Minuten aufgetrennt wurde.

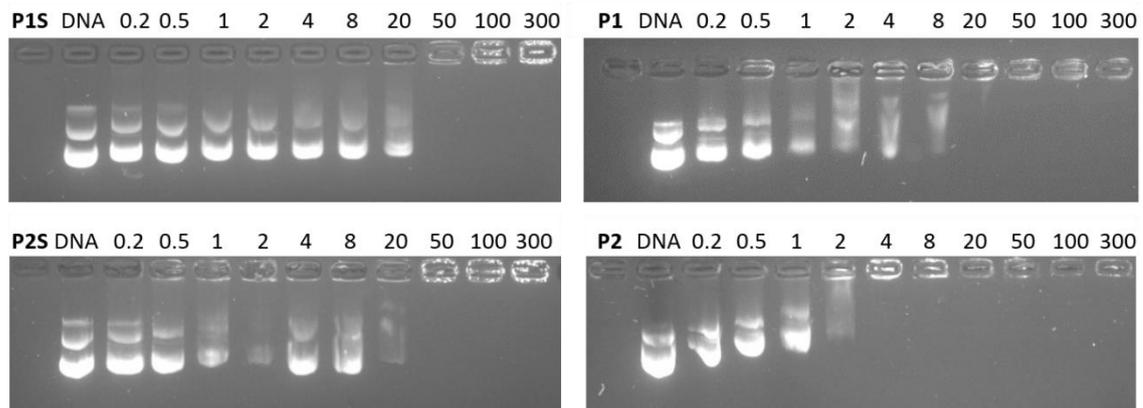


Abbildung 34 (A) Gelelektrophorese der Polyplexmizellen aus **P1S** (links oben), **P2S** (links unten), **P1** (rechts oben) und **P2/pDNA** (rechts unten).

Als Positivkontrolle wurde jeweils native Plasmid-DNA ($c = 200 \text{ ng}/\mu\text{L}$) und als Negativkontrolle das jeweilige Blockkationer verwendet. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Migration der DNA mit zunehmenden N/P-Verhältnis abnahm. Beide reduktiv-spaltbaren Blockkationere **P1S** und **P2S** verfügten über eine ähnlich gute Bindungseffizienz. Bei einem N/P-Verhältnis von 20 wurde bei den **P1S/pDNA**-Mizellen nur noch eine leicht verschmierte DNA-Bande beobachtet, die bei $N/P = 50$ komplett verschwindet. Auch die **P2S/pDNA**-Komplexe zeigten ab $N/P = 50$ keine DNA-Migration mehr. Dieses Ergebnis wurde dadurch erklärt, dass das Polymer **P2S** aufgrund der höheren molaren Masse von 10 kDa und 30 P[Asp(DET)-Repetiereinheiten anstelle von 8, eine bessere Bindungseffizienz hatte. Vergleicht man dieses Ergebnis mit der DNA-Bindungsaffinität der Referenzpolymere **P1** und **P2**, so wurde deutlich, dass die Referenzpolymere schon ab einem geringeren N/P-Verhältnis von 4-8 für **P1** und von 2 für **P2** die DNA vollständig komplexierten. Anscheinend wirkt sich die Cystamin-Gruppe zwischen des hydrophilen (PEtOX) und des kationischen (P[Asp(DET)]) Polymerblocks auf die Bindungseffizienz aus. In dem von *Kataoka* et al. publizierten Beispiel wurden keine Unterschiede in der Bindungseffizienz der Blockkationere PEG₂₃₀-SS-P[Asp(DET)]₁₀₀ und PEG-*b*-P[Asp(DET)] beobachtet. Bei beiden Polymeren verschwand die DNA-Bande ab einem N/P-Verhältnis von 2.^[109] Anhand des Vergleichs der Bindungseffizienz von **P1** ($M_n = 7 \text{ kDa}$) mit nur 7 kationischen Wiederholungseinheiten und **P2** ($M_n = 11 \text{ kDa}$) mit 31 P[Asp(DET)]-

Einheiten wurde deutlich, dass auch hier die Länge des kationischen Segmentes (m) und die molare Masse (M_n) einen Einfluss auf die Komplexierungskraft hatten.

Als nächstes wurde die Bindungseffizienz der vier Blockkationomere in einem SYBR Green Ausschluss-Assay untersucht. SYBR Green ist ein bekannter Fluoreszenzfarbstoff, der eine hohe Fluoreszenzintensität zeigt, solange er in der Doppelstrang-Helix der DNA interkaliert vorliegt. Durch die Kondensation der DNA mit einem Transfektionsreagenz wird die Interkalation des Farbstoffs in der Doppelstrang-Helix verhindert, sodass die Fluoreszenzintensität abnimmt. Aufgrund dieses Effektes wurde SYBR Green verwendet, um die Komplexierung der DNA in Abhängigkeit des N/P-Verhältnisses zu evaluieren. Als Negativkontrolle wurde lediglich die Polymerlösung mit SYBR Green genommen. Als Positivkontrolle diente die DNA-Lösung mit dem Fluoreszenzfarbstoff. Die gemessenen Werte wurden auf die Positivkontrolle referenziert. Wie in **Abbildung 35** zu sehen ist, nimmt die Fluoreszenzintensität mit steigendem N/P-Verhältnis und damit mit der sukzessiven Komplexierung der DNA ab.

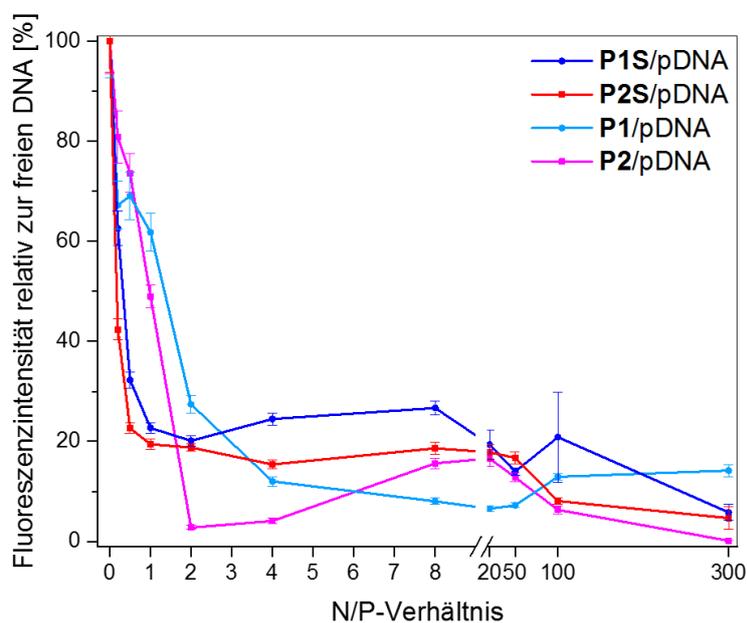


Abbildung 35 SYBR Green Ausschluss-Assay mit den Polyplexmizellen aus den reduktiv-spaltbaren Blockkationomeren **P1S** (blau) und **P2S** (rot) und den Referenzpolymeren **P1** (hellblau) und **P2** (magenta).

Für beide reaktiv-spaltbaren Blockkationomere **P1S** und **P2S** wurde das erste Minimum mit ca. 20% relativer Fluoreszenzintensität bei einem N/P-Verhältnis von 1 erreicht. Erwähnenswert ist, dass der Abfall der Fluoreszenzintensitäten bei der Komplexierung mit **P2S** stärker war als mit **P1S**, welches ein kürzeres kationisches P[Asp(DET)]-Segment und eine kleinere molare Masse hatte. Im Bereich von N/P = 1-50 änderten sich die Fluoreszenzintensitäten kaum. Bei hohen N/P-Verhältnissen von 50-300 wurde ein zweiter Abfall beobachtet. Dieser Bereich war bei der Untersuchung mit Gelelektrophorese ebenfalls charakteristisch, da ab N/P = 50 keine DNA-Migration sichtbar war. Die Detektion der Fluoreszenz durch die Aufnahme der Gel-Bilder war nicht ausreichend sensitiv, als im Vergleich zu der Auswertung mittels Fluoreszenzspektrometer. Da die beiden unabhängigen Methoden unterschiedliche Ergebnisse lieferten, wurde sich im Folgenden auf die Ergebnisse der sensitiveren Fluoreszenzspektrometer-Analyse verlassen. Dementsprechend wurde angenommen, dass die Blockkationomere **P1S** und **P2S** die DNA ab einem N/P-Verhältnis von 1 vollständig komplexierten. Die Polymerarchitektur spielte hierbei nur eine untergeordnete Rolle. *Zhong et al.* verglich die Bindungseffizienzen der Triblockkationomere PDMAEMA-SS-PEG-SS-PDMAEMA mit 6.6 kDa und 13 kDa. Er konnte ebenfalls keinen deutlichen Unterschied in der Komplexierungskraft der Blockkationomere feststellen.^[108] Bei dem Vergleich der reaktiv-spaltbaren Blockkationomere mit den Triblockpolymeren PDMAEMA-*b*-PEG-*b*-PDAEMA (6.4 und 13 kDa), beobachtete er jedoch eine etwas bessere DNA-Bindungsfähigkeit der reduzierbaren Polyplexmizellen. Ein Grund dafür, könnte die hydrophobe Eigenschaft der Cystamin-Einheit in PDMAEMA-SS-PEG-SS-PDAEMA sein.^[108] *Jiao et al.* berichtete nämlich, dass hydrophobe Modifikationen in Polykationen zu einer effektiven Steigerung der DNA-Komplexierungskraft führen können.^[165] Wie in **Abbildung 35** zu sehen ist, konnten auch wir mit der Einführung eines Disulfid-Linkers die Komplexierungsfähigkeit der Blockkationomere erhöhen. Das Referenzpolymer **P1** erreichte das Minimum, mit ca. 12% relativer Fluoreszenzintensität, erst bei einem N/P-Verhältnis von 4, anstelle von 1 wie mit **P1S** und **P2S**. Polymer **P2** mit 31 P[Asp(DET)]-Repetiereinheiten hingegen erreichte das erste Minimum mit ca. 4%

relativer Fluoreszenzintensität bei $N/P = 2$. Diese Ergebnisse stimmten gut mit den Ergebnissen der Gelelektrophorese überein. Hierbei wurde für **P2** nur eine schwache DNA-Bande bei $N/P = 2$ und keine DNA-Migration für $N/P = 4$ beobachtet. Ein weiterer Abfall der Fluoreszenzintensitäten im Bereich $N/P = 100-300$ wurde auf Quenching-Effekte durch die überschüssige kationische Ladung der Blockkationomere zurückgeführt.

Die Auswertung der Ergebnisse verdeutlicht, dass sowohl eine hohe Molmasse und ein längerer kationischer P[Asp(DET)]-Polymerblock, als auch die Einführung einer reduktiv-spaltbaren Disulfid-Bindung sich positiv auf die Komplexierungskraft der Blockkationomere auswirkt. Da die Effizienz der Gentransfektion auch von der Stabilität der Polyplexmizellen abhängt und die DNA nur effektiv vor Serumproteinen und Nukleasen im komplett komplexierten Zustand geschützt werden kann, wurde für alle weiteren Untersuchungen mindestens ein N/P Verhältnis von vier verwendet.

Untersuchung der Polyplexmizellen hinsichtlich ihrer Langzeitstabilität und Stabilität in isotonischen Medien. Die Erhaltung der Bioaktivität während der Langzeitlagerung ist eine weitere wichtige Herausforderung bei der Verwendung von PEtOxn-SS-P[Asp(DET)]_m als nicht-virale Genvektoren. Aus diesem Grund wurde die Lagerstabilität der Polyplexmizellen in HEPES-Puffer (10 mM) bei einem physiologischen pH-Wert von 7.4 in einem Zeitraum von 4 Wochen untersucht. Um die Stabilität der Polyplexmizellen zu ermitteln, wurde zum einen SYBR Green Ausschluss-Assay durchgeführt und zum anderen die Partikelgröße mithilfe von DLS-Messungen bei 25 °C ermittelt.

Zunächst wurden alle Polyplexmizellen mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Ein Zerfall der Polyplexmizellen würde sich durch eine erhöhte Fluoreszenzintensität äußern, da der verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green wieder in die freie DNA interkalieren könnte. Abbildung 36 zeigt die Messung der Fluoreszenzintensität der Polyplexmizellen aus allen vier Blockkationomeren mit N/P -Verhältnissen von 0.2-300 über eine Zeitspanne von 4 Wochen.

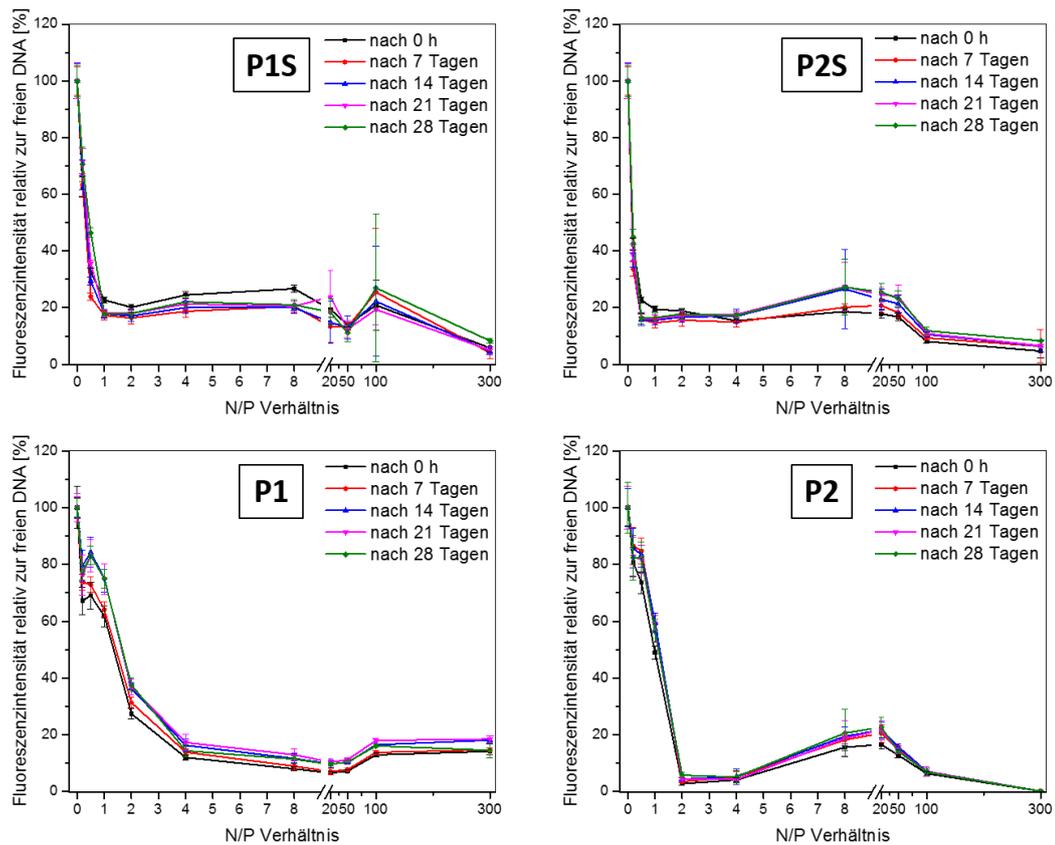


Abbildung 36 Ermittlung der Langzeitstabilität mithilfe des SYBR Green Ausschluss-Assays der Polyplexmizellen aus den reduktiv-spaltbaren Blockkatiomeren **P1S** (oben links) und **P2S** (oben rechts) und deren Referenzpolymeren **P1** (unten links) und **P2** (unten rechts) in einem Zeitraum von 28 Tagen.

Der Verlauf der Kurven für alle vier Polymere ändert sich im untersuchten Zeitraum von 28 Tagen nur sehr gering und verdeutlicht die Langzeitstabilität unabhängig von der Zeit. Einzig bei einem N/P Verhältnis von 100 wurde für die Polyplexmizellen aus dem Blockkatiomer **P1S** eine große Standardabweichung von 26% und eine leichte Erhöhung der Fluoreszenzintensität von 7% nach 28 Tagen gemessen. Für die Polyplexmizellen aus dem größeren Blockkatiomer **P2S** wurde eine Zunahme der Fluoreszenzintensität von 8% für N/P = 8 nach 14 Tagen beobachtet. Für die anderen N/P-Verhältnisse fällt die Zunahme der Fluoreszenzintensität mit der Zeit geringer aus. Die Kurvenverläufe der Referenzpolymere **P1** und **P2** zeigten stabilere Fluoreszenzintensitäten über den gemessenen Zeitraum für alle N/P-Verhältnisse. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die untersuchten N/P-

Verhältnisse 0.2-300 nur einen geringen Einfluss auf die Langzeitstabilität der Polyplexmizellen besitzen. Da beim Vergleich der Kurvenverläufe der Polyplexmizellen aus **P1S** und **P2S** bzw. **P1** und **P2** kaum Unterschiede auffallen, wurde davon ausgegangen, dass auch die molare Masse und das n/m Verhältnis keine wesentlichen Auswirkungen auf die Langzeitstabilität haben. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden die Größen der Polyplexmizellen aus allen vier Blockkationomeren mittels DLS in einem Zeitraum von 28 Tagen untersucht. Wenn es zu einem Zerfall der Polyplexmizellen kommen sollte, würde sich dies in einer Änderung des hydrodynamischen Durchmessers (d_h) äußern. Abbildung 37 demonstriert, dass die gebildeten Nanokomplexe sowohl mit einem kleinen N/P-Verhältnis von 8, als auch mit einem großen N/P-Verhältnis von 100, in einem Zeitraum von 28 Tagen keine Aggregatbildung oder Dissoziation zeigten.

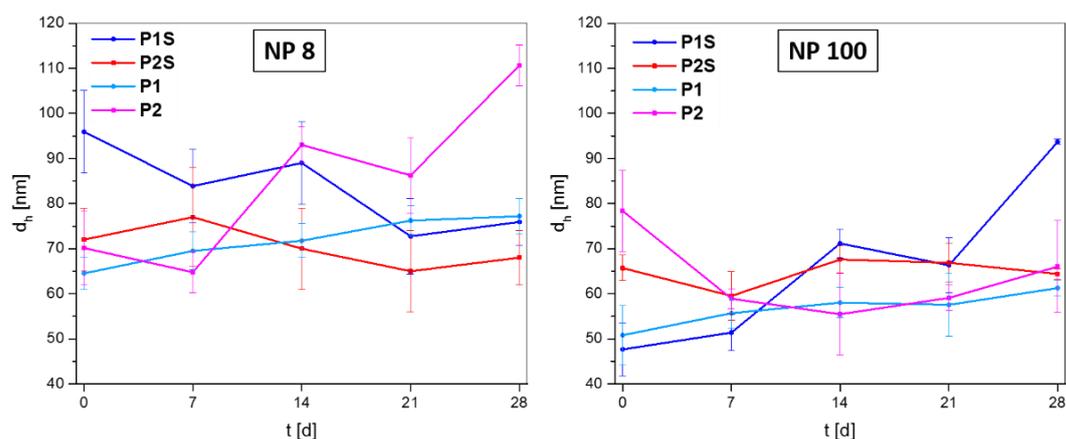


Abbildung 37 DLS-Messungen zur Untersuchungen der Langzeitstabilität der Polyplexmizellen aus den reduktiv-spaltbaren Blockkationomeren **P1S** (blau) und **P2S** (rot) und den Referenzpolymeren **P1** (hellblau) und **P2** (magenta) in den N/P-Verhältnissen von 8 (links) und 100 (rechts).

Die DLS-Messungen des hydrodynamischen Durchmessers (d_h) geben keine eindeutigen Hinweise auf den Einfluss der Disulfid-Brücke und der unterschiedlichen Konstitutionen der eingesetzten Blockkationomere. Es ist lediglich zu sagen, dass die Größen der Polyplexmizellen mit einem kleineren N/P-Verhältnis von 8 größere Partikel bildeten, als die Nanokomplexe mit einem N/P-Verhältnis von 100. Für $N/P = 8$ schwankten die Größen

im Bereich von 65-110 nm, während die Größen für N/P = 100 in dem Bereich von 45-95 nm fluktuieren.

Als weitere Untersuchung wurde die Stabilität der Polyplexmizellen gegenüber zwei verschieden hoch konzentrierten Kochsalzlösungen untersucht. Diese Umgebung kommt den *in vivo* Bedingungen deutlich näher als die Untersuchungen in reinen Puffermedien, da sowohl im Blut als auch im Zytosol eine gewisse Salzkonzentration vorliegt. Darüber hinaus werden Therapeutika in der Gentherapie häufig intravenös in einer Kochsalzlösung verabreicht, so dass auch hier eine Stabilität der Komplexe nötig ist. Die Polyplexmizellen wurden in 50 mM und 150 mM wässrigen Natriumchlorid-Lösung gelagert, wobei Letztere der isotonischen Salzkonzentration im Körper am nächsten kommt. Um die kolloidale Stabilität der Polyplexmizellen zu ermitteln, wurde die Partikelgröße analysiert, welche aus DLS-Messungen bei 25 °C erhalten wurde. Abbildung 38 zeigt die kolloidale Stabilität der Polyplexmizellen in 50 mM und 150 mM wässriger Natriumchlorid-Lösungen in dem gemessenen Zeitraum von 28 Tagen.

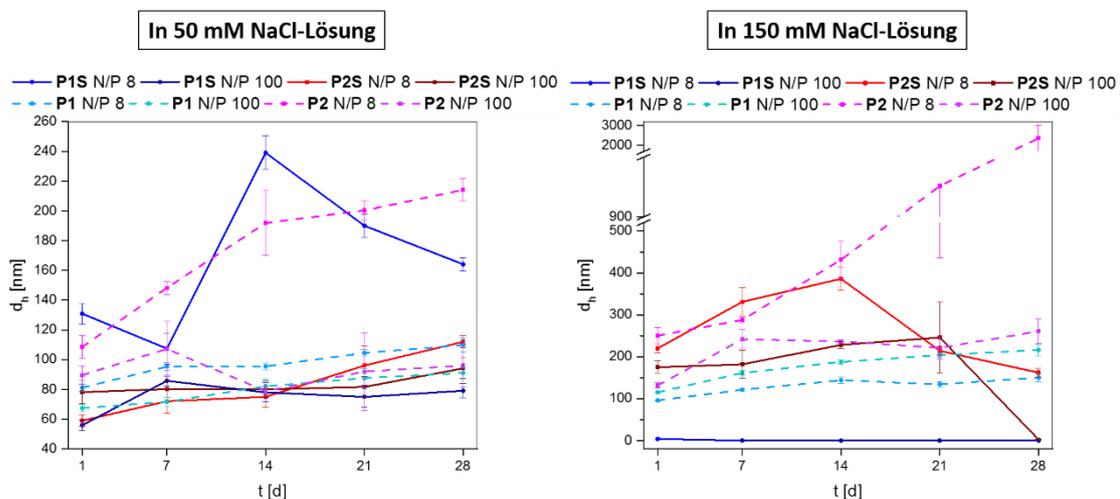


Abbildung 38 Langzeitstabilität der Polyplexmizellen mit einem N/P-Verhältnis von 8 und 100 in 50 mM (links) und 150 mM NaCl-Lösung (rechts).

Die Polyplexmizellen wurden jeweils aus den synthetisierten Blockkationomeren in den N/P-Verhältnissen 8 und 100 gebildet. Innerhalb der 28 Messtage wurden bei der Lagerung in der niedrig konzentrierten Kochsalzlösung (50 mM) für das N/P-Verhältnis von 100 keine

bzw. nur geringe Abweichungen des hydrodynamischen Durchmessers (d_h) beobachtet. Dieses Ergebnis traf auf alle vier Blockkatiomere zu. Polyplexmizellen, die mit den reduktiv-spaltbaren Blockkatiomer **P1S** und dem größerem Referenzpolymer **P2** zeigten hingegen größere Schwankungen bei einem N/P-Verhältnis von 8. Der hydrodynamische Durchmesser (d_h) der **P2**/pDNA-Komplexe nahm von 108.6 ± 7.7 nm innerhalb von 14 Tagen auf 191.9 ± 22.0 nm zu. Die **P1S**/pDNA-Mizellen zeigten eine Größenzunahme von 130.9 ± 6.9 nm auf 239.1 ± 11.4 nm innerhalb von 14 Tagen. Die Polyplexmizellen aus den Blockkatiomeren **P2S** und **P1** zeigten jedoch auch bei $N/P = 8$ eine gute Stabilität bei der Lagerung in der niedrig konzentrierten Kochsalzlösung (50 mM). Der hydrodynamische Durchmesser (d_h) fluktuierte um den Wert von 70 nm innerhalb des gesamten Messzeitraums.

In isotonischer Kochsalzlösung (150 mM) zeigten die Polyplexmizellen aus den Blockkatiomeren **P2S**, **P1** und **P2** Aggregationsverhalten schon nach 7 Tagen Lagerung. Dabei bildeten die Polyplexmizellen aus dem Blockkatiomer **P1** die kleinsten Aggregate mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 95.9 ± 1.7 nm für $N/P = 8$ und 115.1 ± 3.0 nm für $N/P = 100$. Die reduktiv-spaltbaren Polyplexmizellen aus **P1S** hingegen dissoziierten bei einem N/P-Verhältnis von 8 direkt am ersten Tag und bei einem N/P-Verhältnis von 100 nach 7 Tagen. Die Polyplexmizellen aus dem größeren Blockkatiomer **P2S** zeigten nach einem Tag ein Aggregationsverhalten mit einer Größe von 220.0 ± 11.0 nm für $N/P = 8$ und mit einem kleineren Durchmesser von 174.9 ± 15.1 nm bei $N/P = 100$. Die Polyplexmizellen aus dem Referenzpolymer **P2** aggregierten direkt bei $N/P = 8$ zu einer Größe von 211.6 ± 3.7 nm und mit $N/P = 100$ erst nach 7 Tagen zu einer Größe von 131.4 ± 6.5 nm. Im Gegensatz dazu aggregieren Polyplexmizellen aus linearem PEI (22 kDa) schon nach einer Stunde zu über 1000 nm großen Partikeln.^[166] Die Ergebnisse zeigen, dass die Blockkatiomere eine gute bis moderate kolloidale Stabilität lieferten und die Polyplexmizellen aus den Referenzpolymeren stabiler in 150 mM wässriger Kochsalzlösung waren. Außerdem scheinen Polyplexmizellen mit einem kleineren N/P-Verhältnis von 8 schneller zu Aggregatbildung zu neigen. Die beobachtete Salz-induzierte Aggregation

lässt sich damit erklären, dass die intramolekulare Abstoßung in Salzlösung gering ist und die repulsiven Wechselwirkungen zwischen den Polyplexmizellen stark reduziert werden. Aufgrund der Salz-Ionen liegt eine nahezu neutrale Oberflächenladung vor, sodass die Komplexe zu großen Partikeln aggregieren.^[141] Dieser Effekt ist besonders stark bei einem kleinen N/P-Verhältnis und damit bei einer niedrigeren Anzahl an freien positiven Amin-Gruppen ausgeprägt. Aus diesem Grund waren bei dem Vergleich der beiden reduktiv-spaltbaren Blockkationomere, die Polyplexmizellen aus **P2S** und mit einem N/P-Verhältnis von 300 stabiler in isotonischer Umgebung. Das Polymer **P2S** besteht aus einem längeren kationischen Polymerblock von 30 P[Asp(DET)]-Repetiereinheiten und hat ein kleineres Blocklängenverhältnis (n/m) von 1.4.

Studien zur Morphologie, Größe und Oberflächenladung der Polyplexmizellen aus den reduktiv-spaltbaren Blockkationomeren P1S und P2S und den Referenzpolymeren P1 und P2. Die Form und Größe der gebildeten Polyplexmizellen wurde mittels TEM-Analyse bestimmt. Dafür wurden Polyplexmizellen mit einem N/P Verhältnis von 8 und 100 gebildet. Abbildung 39 zeigt uniforme und sphärische Strukturen mit Durchmesser von ca. 50 nm für Polyplexmizellen aus allen vier Blockkationomeren.

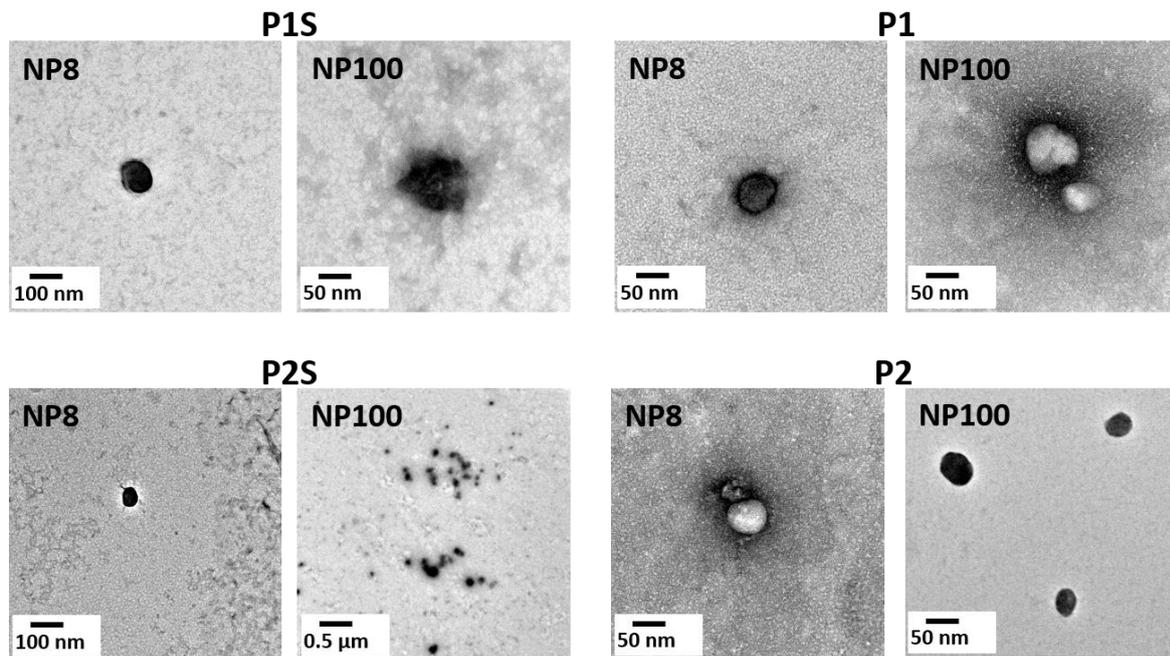


Abbildung 39 TEM-Aufnahmen der Polyplexmizellen mit $N/P = 8$ und $N/P = 100$. Die Aufnahmen wurden angefertigt von Herrn Volker Brandt im Arbeitskreis von Prof. J. Tiller.

Die TEM-Aufnahmen zeigen, dass die Strukturen und Größen der Polyplexmizellen unabhängig vom strukturellen Aufbau der Polymere und vom N/P -Verhältnis nahezu identisch waren. Anhand dieser Aufnahmen ist deutlich zu erkennen, dass die Polyplexmizellen als stabile homogene Nanopartikel ohne Aggregationsverhalten vorlagen. In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, dass die TEM-Analyse eine qualitative Methode ist, da sie nur eine limitierte Anzahl von Polyplexmizellen charakterisieren kann. Um Informationen über die ganze Größenverteilung der Komplexe zu bekommen, wurden DLS-Messungen durchgeführt. Abbildung 40 zeigt den Vergleich der hydrodynamischen Durchmesser (d_h) mit steigendem N/P -Verhältnis.

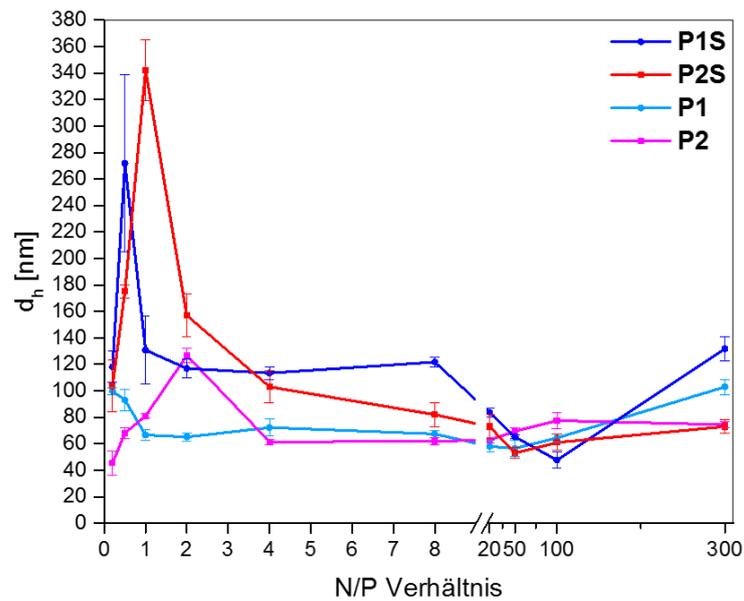


Abbildung 40 Hydrodynamischer Durchmesser der Polymer/pDNA-Komplexe in Abhängigkeit des N/P-Verhältnisses.

Die Kurven der DLS-Messungen für die Blockkationomere **P1S** und **P1** verlaufen ähnlich. Die Größen der Polyplexmizellen aus dem reaktiv-spaltbaren Polymer **P1S** erreichten ein Maximum bei $N/P = 0.5$ mit einem hydrodynamischen Durchmesser (d_h) von 217.8 ± 67.1 nm und sanken bei $N/P = 2$ wieder auf 116.9 ± 7.2 nm ab. Der hydrodynamische Durchmesser der Polyplexmizellen mit dem Referenzpolymer **P1** erreichte das Maximum schon bei $N/P = 0.2$ mit 99.8 ± 2.6 nm und sank auf 65.1 ± 3.2 nm bei $N/P = 2$ ab. Anhand der ermittelten Maxima wurde davon ausgegangen, dass der Ladungsausgleich zwischen Polymer und DNA, der so genannte isoelektrische Punkt, für **P1S** bei einem N/P-Verhältnis von 0.5 und für **P1** bei einem N/P-Verhältnis von 0.2 stattfand. An diesem Punkt schienen die Partikel zu aggregieren, da keine repulsiven Wechselwirkungen herrschten. Die größeren Polymere **P2S** und **P2** erreichten den isoelektrischen Punkt erst bei einem größeren N/P-Verhältnis. Polyplexmizellen aus **P2S** zeigten ein Maximum bei einem N/P-Verhältnis von 1 mit einer Größe von 342.1 ± 23.2 nm, die bei $N/P = 2$ auf 157.0 ± 16.0 nm herabfiel. Bei den Polyplexmizellen aus dem Referenzpolymer **P2** wurden die größten Partikel bei einem N/P-Verhältnis von 2 mit 126.7 ± 5.1 nm gemessen. Der hydrodynamische Durchmesser fiel dann auf 61.4 ± 2.1 nm bei $N/P = 4$. In diesem Zusammenhang wurde

deutlich, dass die Partikelgrößen mit der reaktiv-spaltbaren P[Asp(DET)]-Hülle generell größer waren für $N/P < 4$ als die gemessenen Referenzkomplexe. Außerdem spielte die Konstitution der Polymere eine Rolle auf den isoelektrischen Punkt der Polyplexmizellen. Die maximale Partikelgröße wurde bei den Polymeren mit nur 7 bzw. 8 P[Asp(DET)]-Wiederholungseinheiten schon bei einem kleineren N/P-Verhältnis von 0.2 bzw. 0.5 erreicht. Für ein N/P-Verhältnis größer als 20 wurde für alle untersuchten Polyplexmizellen, unabhängig des strukturellen Aufbaus der Blockkationomere, nur noch ein leichtes Schwanken im Bereich von 60-80 nm beobachtet. Auch *Kataoka* et al. erhielten mit den Blockkationomeren PEG-SS-P[Asp(DET)] und PEG-*b*-P[Asp(DET)] 80-90 nm große Polyplexmizellen. Im Vergleich dazu sind Polyplexmizellen aus dem Homopolymer P[Asp(DET)] bis zu 600 nm groß.^[109] Durch die neutrale P[Asp(DET)]-Hülle konnte die Bildung größerer Aggregate erfolgreich umgangen werden. Interessant ist auch, dass *Zhong* et al. ebenfalls keine Unterschiede im hydrodynamischen Durchmesser der Polyplexmizellen aus PDAEMA-SS-PEG-SS-PDAEMA und PDAEMA-*b*-PEG-*b*-PDAEMA nach vollständiger Komplexierung der DNA feststellen konnte. Weiterhin beobachtete er ebenfalls keine Unterschiede im Hinblick auf die unterschiedlichen Molmassen der Blockkationomere.^[108] Die über die DLS ermittelten Größen stimmten gut mit der Größenbestimmung aus den TEM-Analysen überein. Hierbei soll angemerkt sein, dass die ermittelten Größen mittels DLS die hydrodynamischen Größen in Lösung darstellten, während die Proben in der TEM-Analyse trocken vorlagen. Die gesamte Größenverteilung von 60 bis 80 nm befindet sich in einem idealen Größenbereich, um passiv über den EPR-Effekt in das Tumorgewebe aufgenommen zu werden.

Neben der Größe wurde auch die Oberflächenladung der Polyplexmizellen ermittelt. Die Interaktion zwischen der negativ geladenen Zellmembran und der Polyplexmizellen ist entscheidend für eine gute Zellaufnahme und für eine effiziente Gentransfektion. Es ist bekannt, dass ein leicht positives Zetapotential die Zellaufnahme fördert, während eine zu hohe positive Ladungsdichte die Zytotoxizität erhöht.^[29] Die Oberflächenladung wurde

anhand von DLS-Messungen des Zetapotentials in Abhängigkeit des N/P-Verhältnisses ermittelt (Abbildung 41).

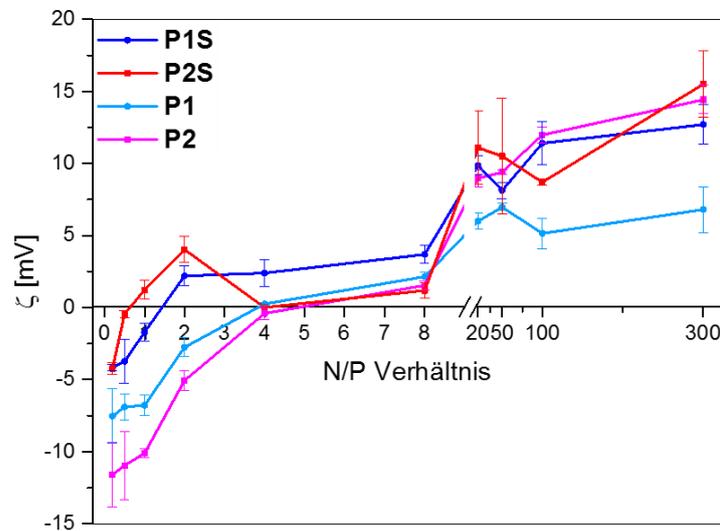


Abbildung 41 Zetapotential der Polyplexmizellen in Abhängigkeit des N/P-Verhältnisses.

Beobachtet man den Verlauf der Graphen, zeigen alle vier Kurven ein ähnliches Verhalten. Das Zetapotential nimmt mit steigendem N/P Verhältnis von -12 mV bis zu +17 mV zu. Auffällig dabei ist, dass die reduktiv-spaltbaren Polyplexmizellen weniger stark negativ geladen sind für $N/P < 1$ als die Referenzpolyplexmizellen. Das spricht für eine bessere Abschirmung der negativen Ladung bzw. für einen effizienteren Ladungsausgleich. Während das Zetapotential der Komplexe aus **P1** und **P2** für $N/P = 0.2$ bei -7.5 ± 1.9 mV bzw. bei -11.6 ± 2.3 mV lag, war das Zetapotential für die Nanopartikel aus **P1S** und **P2S** wesentlich höher bei -4.2 ± 0.2 mV und -4.2 ± 0.4 mV. Generell ist das negative Zetapotential auf die überschüssigen negativen Ladungen der Phosphat-Gruppen der Plasmid-DNA zurück zu führen. Mit zunehmender Komplexierung der DNA findet ein Ladungsausgleich statt, sodass das Zetapotential den Wert Null erreicht. Danach führt überschüssige kationische Ladung des Blockkationomers zu positiven Zetapotentialen. Bei einer optimalen Schale-Kern-Struktur kann die überschüssige kationische Ladungsdichte mithilfe des neutralen hydrophilen Polymers abgeschirmt werden. Die Polyplexmizellen aus dem reduktiv-spaltbaren Blockkationomer **P1S**, welches 8 kationische P[Asp(DET)]-Einheiten

enthielt, erreichte eine neutrale Oberflächenladung bei $N/P = 1-2$. Der Ladungsausgleich der negativen DNA-Phosphatgruppen wurde mit dem Blockkatiomer **P2S**, welches 30 P[Asp(DET)]-Repetiereinheiten enthielt, schon ab einem N/P -Verhältnis von 0.5-1 erreicht. Für $N/P > 1$ fluktuierte die Oberflächenladung der Polyplexmizellen aus den beiden Blockkatiomeren **P1S** und **P2S** um 2 mV bis zu einem N/P -Verhältnis von 8. Dieses Ergebnis verdeutlicht eine optimale Abschirmung durch die neutral geladene PEtOx-Schale und bestätigt eine geeignete Kern-Schale-Architektur der gebildeten Polyplexmizellen. Für N/P -Verhältnisse größer als 8 stieg das Zetapotential der Komplexe mit allen vier Blockkatiomeren kontinuierlich an und erreichte eine Oberflächenladung bei $N/P = 300$ von $+12.7 \pm 1.4$ mV für **P1S** und $+15.5 \pm 2.3$ mV für **P2S**. Lediglich die Polyplexmizellen des Polymeren **P1** blieben auch bei einem hohen N/P -Verhältnis von 300 leicht positiv geladen mit einem Wert von $+6.8 \pm 1.6$ mV. Bei dem Vergleich mit den Referenzpolymeren fällt auf, dass die Polyplexmizellen aus **P1** und **P2** den Ladungsausgleich erst bei einem viel größerem N/P -Verhältnis von 4 erreichten. Dieses Ergebnis hängt womöglich mit der besseren DNA-Bindungseffizienz der reduktiv-spaltbaren Blockkatiomere aufgrund der hydrophoben Cystamin-Einheit zusammen (Abbildung 35). Der Einfluss der unterschiedlichen Konstitutionen und molaren Massen spielt bei den reduktiv-spaltbaren Blockkatiomeren **P1S** und **P2S** kaum eine Rolle. Hier hängt die Oberflächenladung stark von dem N/P -Verhältnis der Komplexe ab. Bei den Referenzpolymeren **P1** und **P2** macht sich die unterschiedliche Polymerarchitektur stärker bemerkbar. Polymer **P1** mit der kleineren molaren Masse von 7 kDa und dem größeren hydrophilen PEtOx-Polymerblock schirmt die kationische Ladungsdichte stärker ab, sodass selbst bei hohen N/P -Verhältnissen ein Zetapotential von ca 2 mV gemessen wurde.

Untersuchungen zur reduktiven Spaltung der Polyplexmizellen mit den Blockkatiomeren P1S und P2S. Eine Besonderheit der synthetisierten Blockkatiomere **P1S** und **P2S** ist die Einführung einer reduktiv-spaltbaren Disulfid-Brücke zwischen des hydrophilen PEtOx_n- und des kationischen P[Asp(DET)]_m-Blocks. Mithilfe eines spaltbaren Linkers soll das so genannte PEG-Dilemma umgangen werden. Es ist bekannt, dass durch die PEGylierung von

Nanopartikel zwar die Zytotoxizität und die Wechselwirkung mit Biomakromolekülen reduziert werden können, aber die Zellaufnahme und damit die Gentransfektionseffizienz darunter leiden.^[22] Aus diesem Grund wurden reduktiv-spaltbare Blockkatiomere synthetisiert, welche Polyplexmizellen mit einer abspaltbaren PEtOx-Schale ausbilden. Dadurch sollte eine effizientere Gentransfektion gewährleistet werden, ohne den Schutz der DNA und eine niedrige Zytotoxizität zu vernachlässigen. Als Modellreaktion für die reduktive Umgebung des Zytoplasmas wurde eine 10 mM Dithiothreitol (DTT) Lösung in HEPES Puffer (10 mM, pH 7.4) verwendet. Nach der Zugabe der DTT-Lösung zu den Polyplexmizellen aus den Blockkatiomeren **P1S** und **P2S**, wurde der hydrodynamische Durchmesser (d_h) in einem Zeitraum von drei Stunden gemessen. Eine Spaltung der Disulfid-Brücke würde zu einem Größenanstieg der Polyplexmizellen führen, da dadurch die hydrophile Abschirmung der PEtOx-Hülle verloren gehen würde und Aggregationsprozesse eintreten würden. Außerdem wurde die Umgebung außerhalb des Zytoplasmas nachgestellt, indem eine 10 μ M DTT-Lösung zu den Polyplexmizellen aus **P1S** und **P2S** zugegeben wurde und ebenfalls der hydrodynamische Durchmesser (d_h) über den Zeitraum von drei Stunden verfolgt wurde. Als Negativkontrolle wurde eine 10 mM DTT-Lösung zu den Polyplexmizellen aus **P1** und **P2** gegeben. Abbildung 42 zeigt die Ergebnisse der Größenentwicklung nach Zugabe der DTT Lösungen.

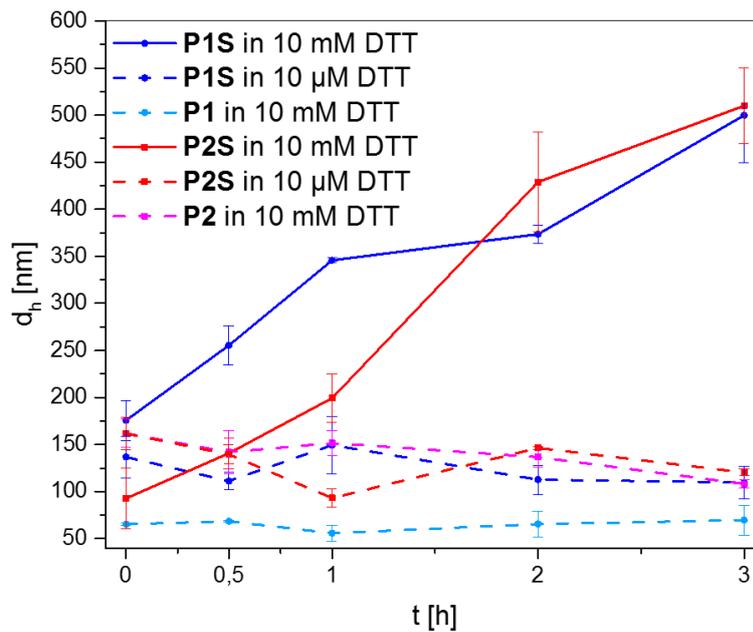


Abbildung 42 Hydrodynamischer Durchmesser der Polyplexmizellen nach Zugabe der DTT-Lösungen in Abhängigkeit der Inkubationszeit.

Für die Untersuchungen wurden Polyplexmizellen mit einem N/P Verhältnis von vier verwendet. Wie erwartet, wurde für die reduktiv-spaltbaren Polyplexmizellen aus **P1S** und **P2S** in 10 mM DTT-Lösung ein Größenanstieg innerhalb der gemessenen drei Stunden beobachtet. Die Größe der Polyplexmizellen aus **P1S** nahm von 175.7 ± 21.4 nm innerhalb des gemessenen Zeitraums auf 499.7 ± 50.2 nm zu. Die Kontrolle der **P1S**/pDNA-Mizellen in 10 µM DTT-Lösung zeigte keinen Größenanstieg während der drei Stunden Messzeit. Der hydrodynamische Durchmesser (d_h) schwankte lediglich um den Wert von 120 nm, sodass von keiner Spaltung der Disulfid-Brücke unter extrazellulären Bedingungen ausgegangen wurde. Die Größen der **P2S**/pDNA-Komplexe nahmen in 10 mM DTT-Lösung innerhalb von drei Stunden von 92.8 ± 32.6 nm auf 509.8 ± 40.0 nm zu. Aufgrund der kleineren Steigung der Kurve wurde von einer langsameren Spaltung als bei den **P1S**/pDNA-Komplexen ausgegangen. Aus diesem Ergebnis lässt sich schlussfolgern, dass die Polymerarchitektur und molare Masse einen Einfluss auf die Spaltung der Disulfid-Brücke hat. Für Polyplexmizellen aus dem Polymer **P2S** mit 30 anstelle von 8 kationischen Einheiten und einer molaren Masse von 10 kDa war eine längere Inkubationszeit in 10 mM DTT-Lösung

für die Spaltung des Disulfid-Linkers erforderlich. Das könnte damit zusammenhängen, dass das nach der Spaltung vorliegende P[Asp(DET)]-Polymer aufgrund der größeren Molmasse und der vielen kationischen Amin-Gruppen die DNA effizienter komplexieren kann. Dieser Unterschied konnte bereits bei der DNA-Bindungseffizienz beobachtet werden. Unser Ergebnis stimmt gut mit der publizierten Arbeit von *Zhong* et al. überein. Hierbei wurde ebenfalls eine langsamere Größenzunahme in 10 mM DTT-Lösung der Polyplexmizellen aus PDMAEMA-SS-PEG-SS-PDMAEMA mit 13 kDa als mit 6.6 kDa beobachtet. Das resultierende PDMAEMA-Homopolymer war aufgrund der geringen Molmasse von 6.6 kDa nicht in der Lage die DNA effizient zu verpacken.^[108] Aus den Messdaten der Polyplexmizellen in 10 μ M DTT-Lösung ließ sich aufgrund der nahezu konstanten Größen innerhalb des Messzeitraums eine Spaltung der Disulfid-Brücken ausschließen. *Kataoka* et al. erzielte ähnliche Ergebnisse bei der Verwendung des reduktiv spaltbaren Polymers PEG-SS-P[Asp(DET)]. Er beobachtete ebenfalls, dass die PEG-Abspaltung von der Konzentration der umgebenden Thiol-Gruppen abhängt. So nahm die Größe der Polyplexmizellen aus PEG-SS-P[Asp(DET)] in 10 mM DTT-Lösung nach 30 Minuten einen Durchmesser von ca. 1000 nm an. In 10 μ M DTT-Lösung blieb die Größe der Polyplexmizellen jedoch konstant bei ca. 90 nm.^[109] Die Negativkontrolle mit den Polyplexmizellen aus den Referenzpolymeren **P1** und **P2** zeigte unter reduktiven Bedingungen in einer 10 mM DTT-Lösung nahezu konstante Größen. Der hydrodynamische Durchmesser (d_h) der **P1**/pDNA-Komplexe fluktuierte lediglich um den Wert von 65 nm, während die Größen der **P2**/pDNA-Komplexe um den Wert von 140 nm schwankten.

Untersuchungen der pH-Sensitivität der Polyplexmizellen im sauren Medium. Der endosomale Austritt stellt einen der wichtigsten und limitierenden Schritte für eine effiziente Gentransfektion dar. Durch einen erfolgreichen endosomalen Austritt kann der Abbau im Lysosom vermieden werden und die Freisetzung ins Zytoplasma gewährleistet werden. Hierbei soll die Senkung des pH-Wertes von 7.4 im extrazellulären Milieu zu 5.5 im späten Endosom ausgenutzt werden.^[22] Der Prozess des endosomalen Austritts ist noch nicht vollständig aufgeklärt, aber es ist bekannt, dass eine hohe positive Ladungsdichte der

nicht-viralen Genvektoren die Destabilisierung der endosomalen Membran fördert. Diese Destabilisierung von Zellmembranen ist außerhalb der Zelle zu vermeiden, aber innerhalb des Endosoms förderlich für die Freisetzung der Polyplexmizellen. Dieses Verhalten kann durch ein geeignetes Polymerdesign mit einer pH-sensitiven Seitenkette, wie DET, und durch eine Abschirmung der kationischen Ladung durch eine spaltbare Schale-Kern-Architektur gesteuert werden. Die hydrophile PEtOx-Schale ist dafür bestens geeignet, da sie Stealth-Eigenschaften ohne pH-sensitive Gruppen hat. Diethylentriamin hingegen durchläuft eine klare zwei-Stufen Protonierung unter einer *Gauche-Anti*-Konformationsänderung.^[121,122] Aufgrund dessen verfügt die DET-Seitenkette über eine effektive Puffer-Funktion in saurer, endosomaler Umgebung auf. *Kataoka* et al. ermittelte zwei unterschiedliche pK_S -Werte für die Ethylendiamin-Einheit von 6.0 und 9.5. Bei einem pH-Wert von 7.4 liegt die Seitenkette in einem einfach protoniertem Zustand, der *Gauche*-Form vor. Bei einem saurem pH-Wert von 5.0 verschiebt sich das Gleichgewicht zu dem zweifach protonierten Zustand, bei dem die Ethylendiamin-Einheit in der *Anti*-Form vorliegt.^[121] Um das Verhalten der Polyplexmizellen aus den hier synthetisierten Blockkationomeren unter endosomal-sauren Bedingungen zu überprüfen, wurden die Polyplexmizellen in einer wässrigen Puffer-Lösung mit einem pH-Wert von 5 gelöst und die Größenänderung wurde mittels DLS ermittelt (Abbildung 43).

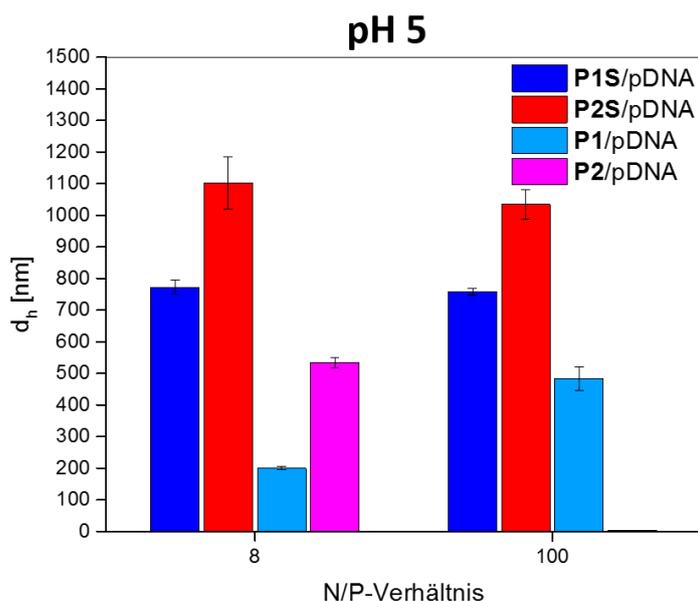


Abbildung 43 Hydrodynamischer Durchmesser der Polyplexmizellen in wässrig saurer Puffer-Lösung mit pH = 5.

Es wurde beobachtet, dass die Größen der Polyplexmizellen mit **P2S** sowohl bei kleinem N/P-Verhältnis von 8, als auch bei hohem N/P-Verhältnis von 100 große Aggregate von 1103 ± 82.0 nm bzw. 1035 ± 47.2 nm bildeten. In HEPES-Puffer mit einem pH-Wert von 7.4 wurden Größen von 82.0 ± 9.0 nm für N/P = 8 und 61.0 ± 6.0 nm für N/P = 100 gemessen. Die **P1S/pDNA**-Komplexe zeigten ein ähnliches Verhalten. Es wurden Aggregate von 772.1 ± 22.3 nm für N/P = 8 und 758.3 ± 10.3 nm für N/P = 100 im saurem Medium ermittelt. In pH 5 saurer Lösung liegt aufgrund der zweifachen Protonierung der Ethylendiamin-Einheit eine erhöhte Ladungsdichte vor. Abbildung 44 stellt schematisch die Größenänderung in Lösung mit pH = 5 dar.

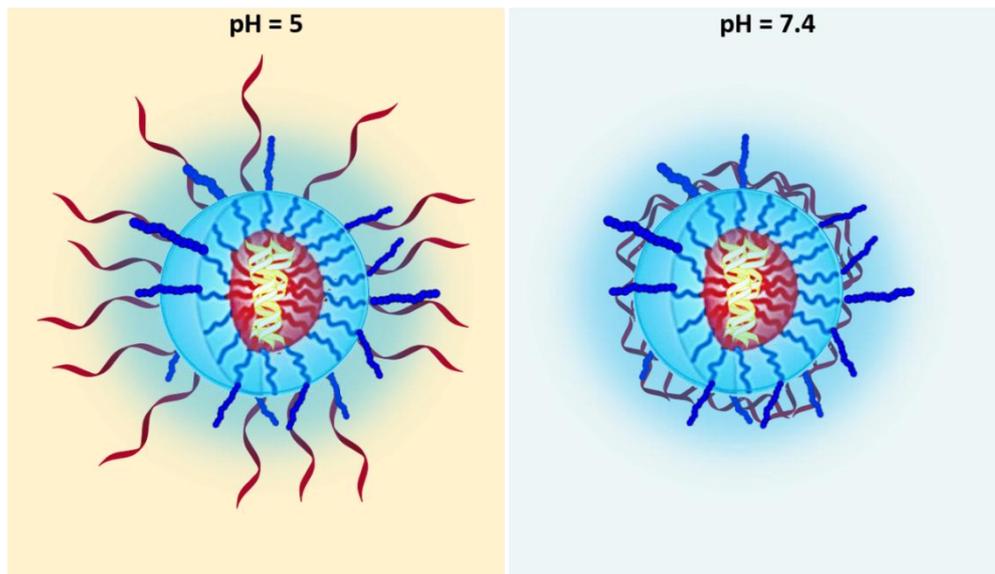


Abbildung 44 Schematische Darstellung der Größenänderung von Polyplexmizellen in pH = 5.^[100] PEtOx-Polymer ist in blau und der kationische P[Asp(DET)]-Block ist in rot dargestellt.

Bei einem physiologischen pH-Wert von 7.4 herrscht eine niedrige intramolekulare Abstoßung in der einfach protonierten Ethylendiamin-Einheit, sodass die freien Seitenketten in einer kompakten Form vorliegen. Die Senkung des pH-Wertes auf pH = 5 hat aufgrund der zweifachen Protonierung der Ethylendiamin-Einheit große repulsive Wechselwirkungen innerhalb der Seitenkette zur Folge, sodass es zur Aufweitung der Polymerketten und Quellung der Polyplexmizelle kommt.^[100] Infolgedessen nimmt die gemessene Partikelgröße zu. *Harkay et al.* beobachteten bei der Untersuchung von PEI-pDNA-Komplexen ebenfalls eine Änderung der Partikelgröße mit dem Absinken des pH-Wertes.^[141] Sie schlussfolgerten, dass die Größenänderung mit der Polymerladung einhergeht und diese wiederum einen Effekt auf die DNA-Komplexierung hat. Des Weiteren berichteten *Schubert et al.* bei der Untersuchung von Polyplexen basierend auf amphiphilen Poly(2-oxazolin) eine Größenzunahme in pH 5 saurer Lösung. Hierbei wurde die Größenänderung ebenfalls mit der zunehmenden Ladungsdichte und der damit einhergehenden Ausdehnung der Polymerketten erklärt.^[100] Die Schwellung und Aufweitung der Komplexe in saurer Lösung deutete auf eine gute Puffer-Kapazität der reaktiv-spaltbaren Blockkationere (**P1S**, **P2S**) hin und kann damit die Freisetzung aus dem

Endosom begünstigen. Die Referenzpolymere **P1** und **P2** hingegen, zeigten ein anderes Verhalten. **P1**/pDNA-Komplexe bildeten unter sauren Bedingungen mit einem N/P-Verhältnis von 8 kleinere Aggregate von 200.5 ± 5.5 nm und mit N/P = 100 Aggregate von 484.0 ± 37.1 nm. In HEPES-Puffer mit einem pH-Wert von 7.4 wurden Größen von 67.5 ± 2.8 nm für das kleinere N/P-Verhältnis und 64.4 ± 3.0 nm für N/P = 100 ermittelt. Das Referenzpolymer **P2** zeigte bei einem N/P-Verhältnis von 8 eine Aggregatbildung mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 534.5 ± 15.4 nm. Die Polyplexmizellen mit einem N/P-Verhältnis von 100 zerfielen unter sauren Bedingungen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die Stabilität und die Ausdehnung der Polyplexmizellen im sauren Milieu bei pH = 5 die Einführung einer Disulfid-Brücke in die Schale-Kern-Architektur sinnvoll ist.

Untersuchungen der Polyplexdissoziation in einer Austauschreaktion mit Heparin als Modellanion. Die geformten Polyplexmizellen aus den hier synthetisierten Blockkationomeren sollen als Transfektionsvektoren charakterisiert werden. Dazu gehört die Untersuchung des Dissoziationsverhaltens der Polyplexmizellen in einer Austauschreaktion mit polyanionischen Biomakromolekülen. Es soll sichergestellt werden, dass die Komplexe in der Lage sind im Zytoplasma zu zerfallen, damit die freigesetzte DNA in den Nukleus eintreten kann. Die Dissoziation der Polyplexmizellen ist folglich Voraussetzung für die Transkription der DNA und damit für die Genexpression. Als Modellanion wurde Heparin in unterschiedlichen Konzentration zu den Polyplexmizellen gegeben. Die Dissoziation wurde mithilfe eines Heparin-Assays durchgeführt und mittels zwei unabhängigen Methoden verfolgt. Zum einen wurde die Freisetzung der DNA durch die Migration der freien DNA-Bande im Agarosegel visualisiert. Zum anderen wurde die verwendete DNA, wie im SYBR Green Ausschluss-Assay zuvor, angefärbt und die Freisetzung der DNA mittels Messung der Fluoreszenzintensität verfolgt. Dafür wurden Polyplexmizellen jeweils in den N/P-Verhältnissen von 8 und 100 gebildet. Abbildung 45 zeigt die Ergebnisse des Heparin-Assays für die Polyplexmizellen mit dem N/P-Verhältnis von 8.

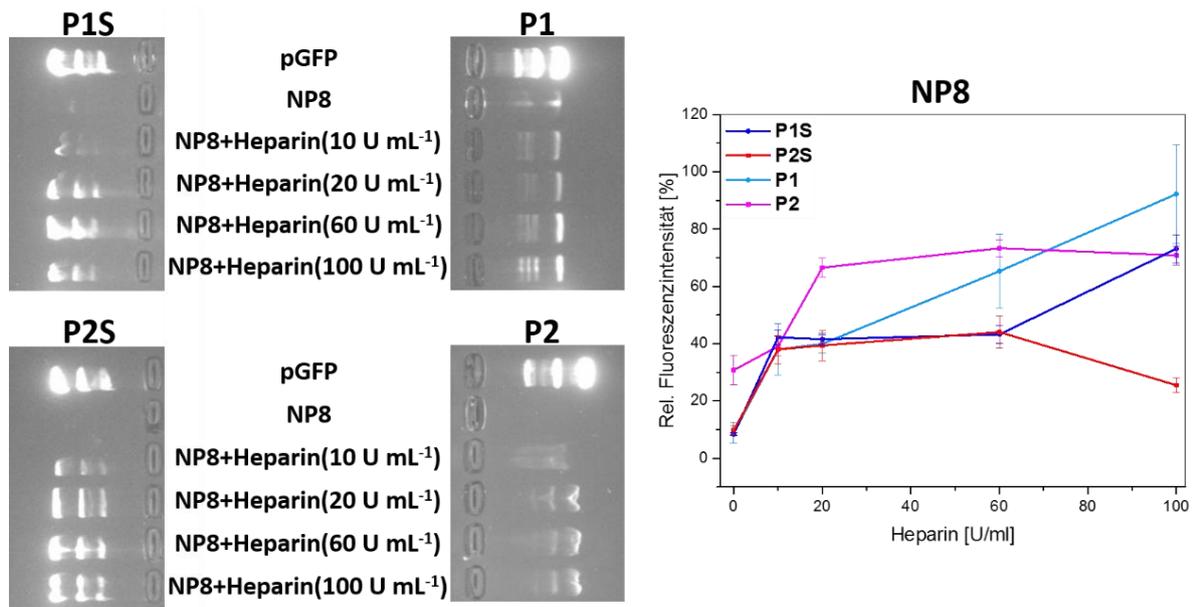


Abbildung 45 Heparin-Assay der Polyplexmizellen mit N/P = 8 detektiert mit Gelelektrophorese (links) und Fluoreszenzintensität (rechts).

Die Untersuchung mittels Gelelektrophorese zeigte, dass die Polyplexmizellen aus allen vier Blockkationomeren schon bei einer geringen Konzentration von 10 U mL⁻¹ dissoziierten. Die DNA wurde durch die Austauschreaktion mit dem Polyanion freigesetzt, sodass die Migration der freien DNA im Gel sichtbar war. Die Messung der Fluoreszenzintensitäten bestätigte die Ergebnisse der Gelelektrophorese. Ab einer Heparin-Konzentration von 10 U mL⁻¹ nahm die Fluoreszenzintensität zu. Die DNA wurde aus dem Komplex freigesetzt und der DNA-Farbstoff SYBR Green interkalierte in die Doppel-Helix, was in einem Anstieg der Fluoreszenzintensitäten resultierte. Abbildung 46 zeigt die Ergebnisse des Heparin-Dissoziations-Assays für die Polyplexmizellen mit N/P = 100.

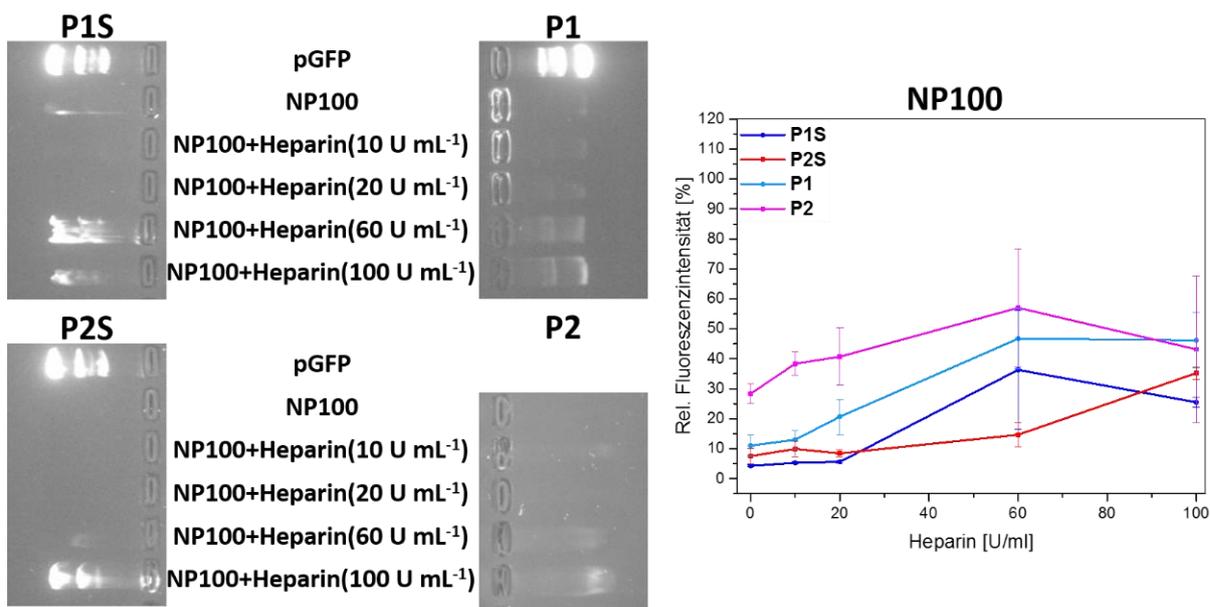


Abbildung 46 Heparin-Assay der Polyplexmizellen mit N/P = 100 detektiert mit Gelelektrophorese (links) und Fluoreszenzintensität (rechts).

Die Polyplexmizellen mit dem höheren N/P-Verhältnis schienen stabiler in der Austauschreaktion mit Polyanionen zu sein. Für die Polyplexmizellen aus dem reduktiv-spaltbaren Blockkationer **P1S** wurde eine Freisetzung der DNA erst ab einer Heparin-Konzentration von 60 U mL⁻¹ beobachtet. Das gleiche Ergebnis galt auch für das Referenzpolymer **P1**. Die Migration der DNA im Gel für die Polyplexmizellen aus **P1S** und **P1**, wurde durch die Messung einer erhöhten Fluoreszenzintensität bei 60 U mL⁻¹ Heparin bestätigt (Abbildung 46 rechts). Die Polyplexmizellen aus dem Blockkationer **P2S** und **P2** zeigten ähnliche Stabilitäten. Hierbei wurde eine verschmierte DNA-Bande bei einer Konzentration von 60 U mL⁻¹ beobachtet und eine klare DNA-Bande für 100 U mL⁻¹ Heparin. Die Ergebnisse konnten durch die Messung der Fluoreszenzintensitäten bestätigt werden. Hierbei wurde eine maximale Intensität bei einer Heparin-Konzentration von 100 U mL⁻¹ beobachtet. Zusammenfassend wurden Polyplexmizellen aus reduktiv-spaltbaren Blockkationeren gebildet, die kolloidale Stabilität besaßen und in der Lage waren in einer Austauschreaktion mit Polyanionen zu dissoziieren. Dabei spielte sowohl das N/P-Verhältnis, als auch die Konzentration des Polyanions eine Rolle.

Zytotoxizitäten der Blockkationomere in Abwesenheit und als Komplex mit der DNA. Bei der Entwicklung nicht-viraler Genvektoren ist es wichtig die Balance zwischen hoher Gentransfektionsrate neben minimaler Zytotoxizität zu wahren. Die Zytokompatibilität der synthetisierten Blockkationomere und der Polyplexmizellen wurden in einem gängigen Zytotoxizitäts-Assay mit HEK293 Zellen untersucht (Abbildung 47).

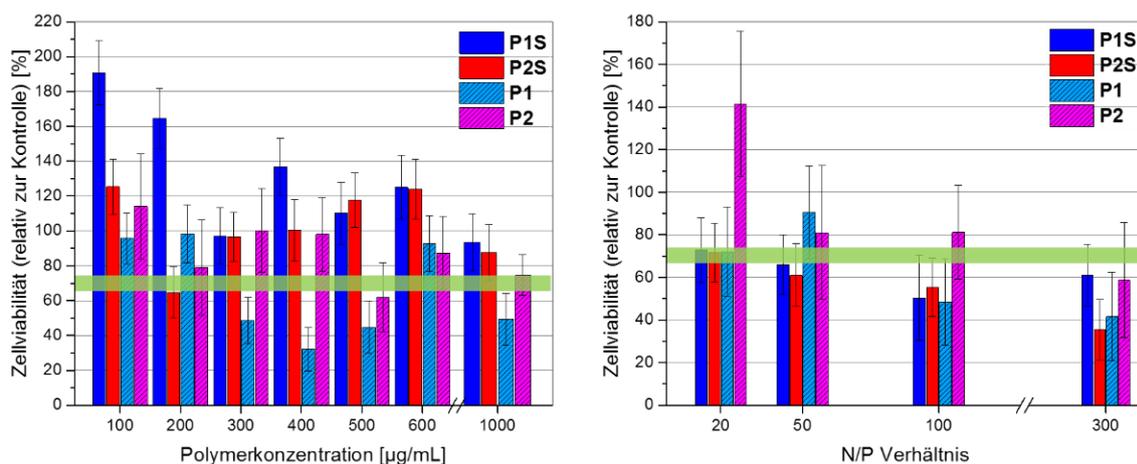


Abbildung 47 Zellviabilität der HEK293 Zellen nach Inkubation mit den Blockkationomeren (links) und Polymer/pDNA-Komplexen (rechts) bestimmt mithilfe eines CCK-Zellviabilität-Assays.

Die reduktiv-spaltbaren Blockkationomere **P1S** und **P2S** zeigten selbst in hohen Konzentrationen von 1 mg/mL exzellente Zellkompatibilität mit über 70% Zellviabilität. Lediglich das Referenzpolymer **P1** verursachte ab einer Konzentration von 300 µg/mL eine geringere Zellviabilität als 70%. Anhand dieses Ergebnisses wurde die Arbeitshypothese bestätigt, dass die Einführung eines spaltbaren Disulfid-Linkers in die Polymerstruktur eine Reduzierung der Zytotoxizität zur Folge hat. Bei der Betrachtung der Zellviabilität der HEK293 Zellen mit den Polyplexmizellen mit unterschiedlichen N/P-Verhältnissen fällt auf, dass die Viabilität der Zellen mit steigendem N/P-Verhältnis sank. Die reduktiv-spaltbaren Polyplexmizellen mit einem N/P-Verhältnis größer als 50 verursachten eine Zellviabilität unter 70%. Diese Grenze wurde von den Polyplexmizellen aus den Referenzpolymeren ab einem N/P-Verhältnis größer als 100 unterschritten. Die höchste Zellviabilität zeigten die Polyplexmizellen mit dem Referenzpolymer **P2**. *Zhong et al.* machten andere Beobachtungen bei dem Vergleich der Zytotoxizität von reduktiv-spaltbaren

Triblockcopolymeren und ihren unterschiedlichen Molmassen in COS-7-Zellen. Polyplexmizellen aus PDMAEMA-SS-PEG-SS-PDMAEMA in den N/P-Verhältnissen 6, 12 und 18 zeigten vergleichbar gute Zellviabilitäten von über 80% wie die Referenz-Komplexe ohne Disulfid-Linker. Interessant war auch, dass die Molmasse der Triblockcopolymeren keinen Einfluss auf die Zytotoxizität der Polyplexmizellen ausübte.^[108] Im Vergleich dazu, verursachen Polyplexmizellen aus bPEI und einem N/P-Verhältnis von 64 eine niedrige Zellviabilität von 40% in HeLa-Zellen.^[109]

Untersuchung der *in vitro* Gentransfektionseffizienz in HEK293 Zellen. Für die qualitative Untersuchung der Gentransfektionseffizienz, wurden *in vitro* Transfektionsexperimente in HEK293 Zellen durchgeführt. Als Modellplasmid wurde peGFP verwendet, welches für die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) kodiert ist. Bei einer erfolgreichen Transfektion wird in der Zelle das GFP exprimiert, wodurch die entsprechenden Zellen grün fluoreszieren. Dadurch lassen sich GFP-positive bzw. transfizierte Zellen leicht von den anderen Zellen unterscheiden. Anhand der qualitativen Fluoreszenzmikroskopieanalyse können Rückschlüsse auf die Effizienz der Blockkationomere als nicht-virale Genvektoren gezogen werden. Die Polyplexmizellen wurden in den N/P-Verhältnissen von 20-300 gebildet und die transfizierten Zellen wurden nach 48 h Inkubationszeit untersucht. Abbildung 48 zeigt die repräsentativen Mikroskopiebilder der HEK293 Zellen.

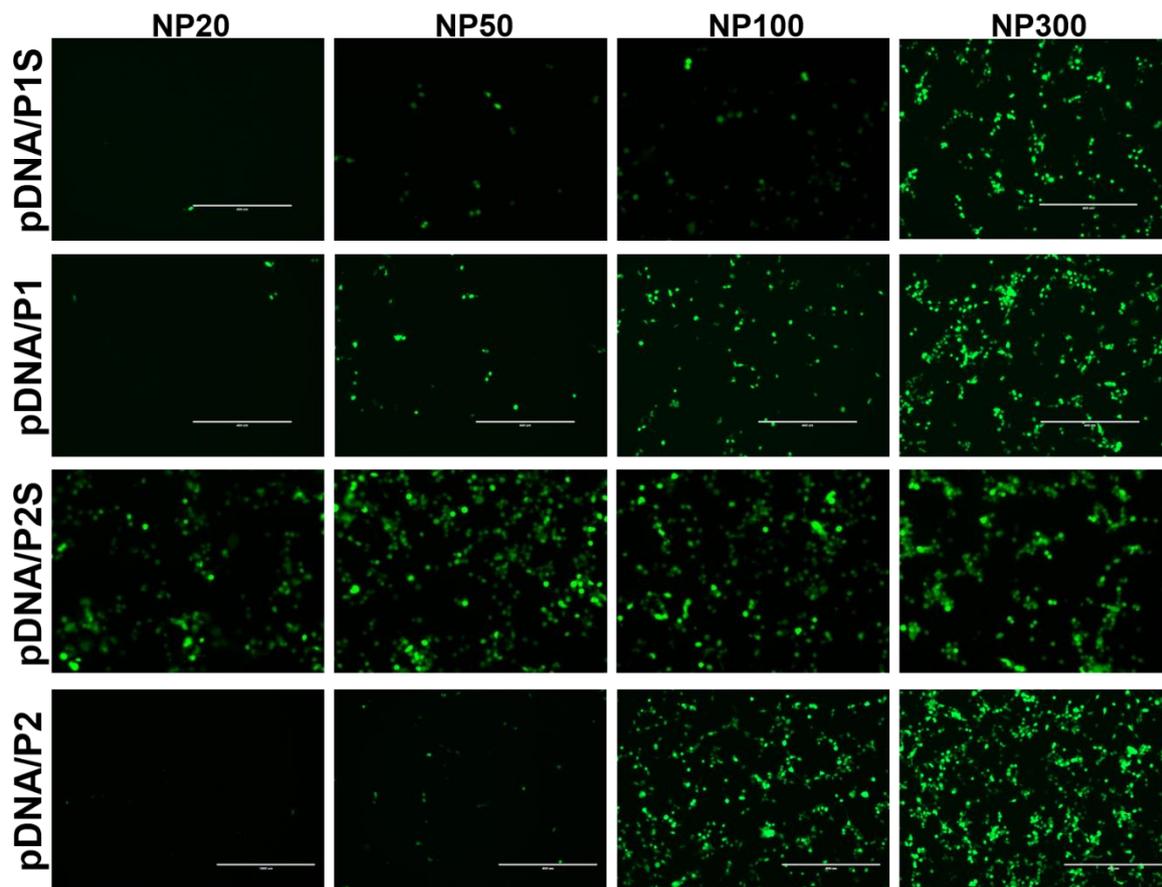


Abbildung 48 Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen der transfizierten HEK293 Zellen mit Polyplexmizellen in den N/P-Verhältnissen 20-300 nach 48 h Inkubationszeit.

Die Transfektionsrate in HEK293 Zellen nimmt für alle Polyplexmizellen mit steigendem N/P-Verhältnis zu. Vergleicht man die Mikroskopiebilder der Polyplexmizellen aus den reduktiv-spaltbaren Blockkationomeren **P1S** und **P2S**, so fällt auf, dass für das Blockkationomer **P2S**, welches eine höhere molare Masse von 10 kDa und 30 P[Asp(DET)]-Einheiten verfügte, bereits ab einem N/P-Verhältnis von 20 GFP-positive Zellen zu beobachten waren. Bei dem Blockkationomer **P1S**, welches eine molare Masse von 7 kDa und nur 7 P[Asp(DET)]-Wiederholungseinheiten hatte, wurden erst ab einem N/P-Verhältnis von 300 transfizierte Zellen beobachtet. In Vergleich dazu waren die Referenzpolymere **P1** und **P2** ab einem N/P-Verhältnis von 100 in der Lage in Zellen zu transfizieren.

Quantitative Aussagen lassen sich mithilfe der Durchflusszytometrie treffen (Abbildung 49).

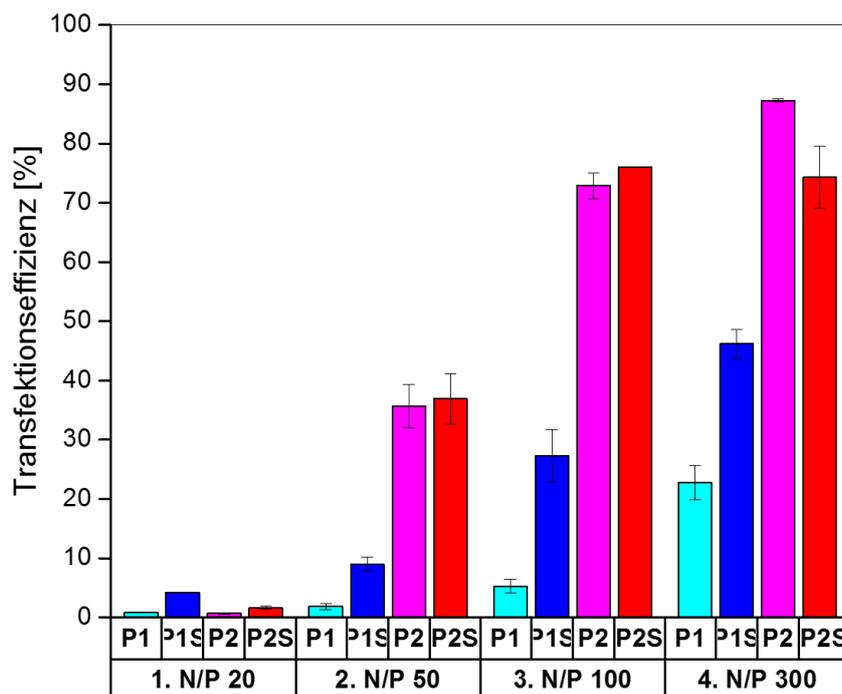


Abbildung 49 Transfektionseffizienz der Polyplexmizellen analysiert *via* Durchflusszytometrie.

Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass eine maximale Transfektionsrate mit Polyplexmizellen aus **P2S** und **P2** erreicht wurde und diese mit steigendem N/P-Verhältnis zunahm. Die Anzahl der GFP-positiven Zellen war nahezu identisch für **P2S**/peGFP- und **P2**/peGFP-Komplexe und erreichte einen Wert von 36% für N/P = 50 und 76% für N/P = 100. Die Polyplexmizellen mit N/P = 300 transfizierten die Zellen zu 87% mit dem Referenzpolymer **P2** und zu 76% für **P2S**. Die Polyplexmizellen aus dem Blockkationomer **P1S** mit einer kleineren Molmasse, erreichte eine maximale Transfektionsrate von 46% bei einem N/P-Verhältnis von 300. Das Referenzpolymer **P1** zeigte die geringste Transfektionseffizienz von 23% bei N/P = 300. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde angenommen, dass vor allem die molare Masse der Blockkationomere eine wichtige Rolle in Hinblick auf die Transfektionseffizienz einnimmt. Einen weiteren Einfluss könnte die Länge der kationischen Repetiereinheit spielen. So zeigten Polymere mit 30 P[Asp(DET)]-Einheiten höhere Transfektionseffizienzen als Polymere mit 7 kationischen Wiederholungseinheiten. Im Fall der Blockkationomere mit einer niedrigen molaren Masse

von 7 kDa und 7 kationischen Repetiereinheiten, wurde eine Steigerung der Transfektionseffizienz um über 20 % durch die Einführung einer spaltbaren Disulfid-Brücke erreicht. Diese Beobachtung publizierte *Zhong et al.* ebenfalls, bei dem Vergleich der Transfektionseffizienzen der Polyplexmizellen aus PDMEMA-SS-PEG-SS-PDMAEMA mit 6.6 kDa und 13 kDa Molekulargewicht und deren Referenzpolymere ohne Disulfid-Linker. Er bemerkte eine 28-fache Steigerung der Gentransfektionsaktivität der Polyplexmizellen aus PDMEMA-SS-PEG-SS-PDMAEMA (6.6 kDa) im Vergleich zu Polyplexmizellen aus PDMEMA-*b*-PEG-*b*-PDMAEMA (6.4 kDa). Im Falle der Polyplexmizellen aus den Triblockpolymeren mit 13 kDa Molmasse beobachtete er eine nur etwas höhere Gentransfektionseffizienz im Vergleich zum nicht-spaltbaren Referenzpolymer.^[108]

5.4 Zusammenfassung

In einer einfachen dreistufigen Synthese wurden zwei Blockkationere mit einem, unter reduktiven Bedingungen abspaltbaren, PEtOx-Polymerblocks als nicht-virale Genvektoren dargestellt. Das Blockkationer mit der Struktur PEtOx_n-SS-P[Asp(DET)]_m wurde mit einem Disulfid-Linker zwischen der hydrophilen PEtOx-Einheit und der kationischen P[Asp(DET)] mit definierten Blocklängen (n, m) und Molmassen synthetisiert und mittels ¹H-NMR-Spektroskopie, IR- und GPC-Analysen vollständig charakterisiert. Abbildung 50 zeigt die Polymerstruktur und die Eigenschaften der erfolgreich synthetisierten Blockkationere mit einem reduktiv-spaltbaren Disulfid-Linker.

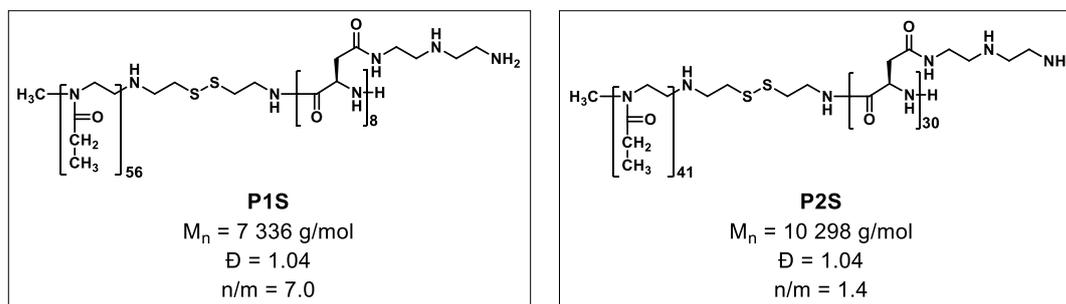


Abbildung 50 Synthetisierte, reduktiv-spaltbare Blockkationere **P1S** und **P2S** und ihre analytischen Daten.

Die synthetisierten Blockkationiere bildeten mit Plasmid-DNA Polyplexmizellen in einer Schale-Kern-Architektur aus, wobei die abschirmende PEtOx-Schale unter reduktiven Bedingungen abspaltbar war und der Poly(aspartamid)-Kern eine *N*-(2-Aminoethyl)-2-aminoethyl-Gruppe als puffernde Einheit enthält, die den endosomal Austritt mit minimaler Zytotoxizität induziert. Abbildung 51 stellt die Ergebnisse, die mit den reduktiv spaltbaren Polyplexmizellen erzielt wurden, zusammenfassend dar.

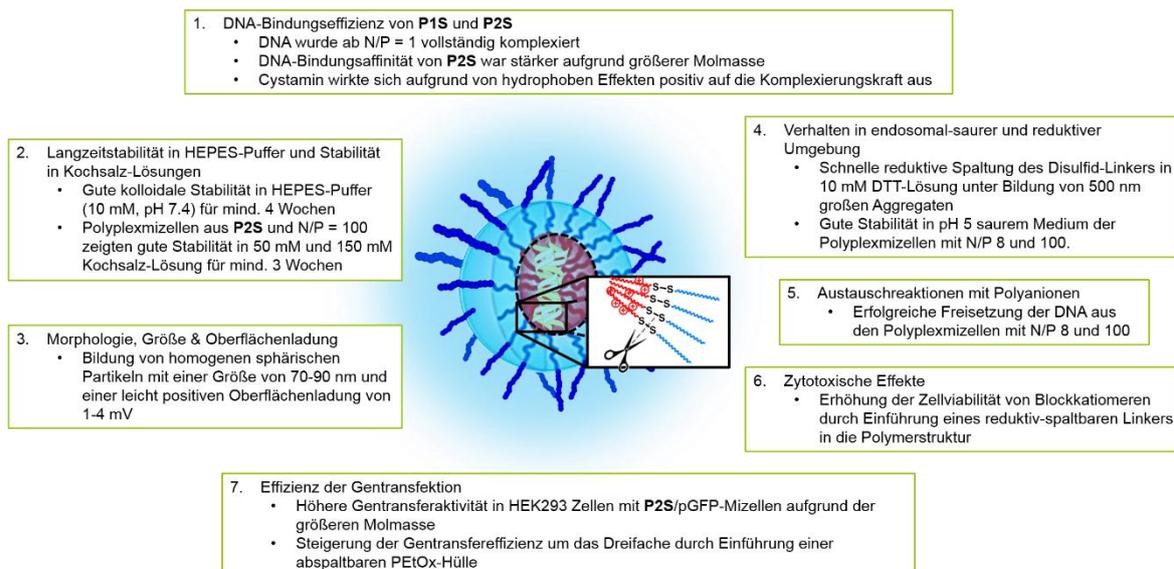


Abbildung 51 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse mit **P1S**/pDNA- und **P2S**/pDNA-Komplexen.

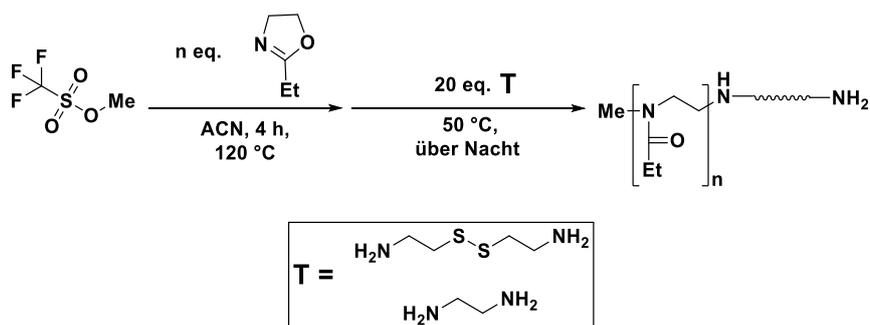
Die Blockkationiere **P1S** und **P2S** komplexierten die DNA in stabile, homogene sphärische Partikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 70-90 nm und einem Zetapotential von 2-12 mV. Die hydrophile PEtOx-Palisade wurde erfolgreich unter Aggregatbildung zu 500 nm großen Partikeln in 10 mM DTT-Lösung abgespalten. Es wurde festgestellt, dass die molare Masse der reduktiv-spaltbaren Blockkationiere sowohl bei der Komplexierungskraft, als auch bei der Disulfid-Spaltung und Dissoziation des Komplexes in einer Austauschreaktion mit Polyanionen eine große Rolle spielt. Das Blockkationier **P2S** mit einer größeren molaren Masse von 10 kDa zeigte eine stärkere DNA-Bindungseffizienz, sodass die Spaltung des Disulfid-Linkers langsamer durchgeführt wurde und für die Freisetzung der DNA eine höhere Heparin-Konzentration notwendig war. Im Vergleich zu

den Polyplexmizellen aus den Referenzpolymeren **P1** und **P2**, konnte durch die Disulfid-Funktion sowohl die DNA-Bindungseffizienz, als auch die Quellung der Partikel in endosomal-saurer Umgebung erhöht werden. Die Größe der reaktiv-spaltbaren Polyplexmizellen nahm aufgrund der zweifachen Protonierung der Ethylendiamin-Seitenkette und der damit verbunden höheren repulsiven Wechselwirkungen einen hydrodynamischen Durchmesser (d_h) von über 1000 nm an. Durch die Einführung eines Disulfid-Linkers konnte weiterhin die Zellviabilität und Gentransfektionseffizienz maßgeblich gesteigert werden. Die Gentransfektionsaktivität konnte bei den Blockkationeren mit einer niedrigeren molaren Masse von 7 kDa um das Doppelte erhöht werden. Die Verwendung des reaktiv-spaltbaren Blockkationers **P2S** mit einer größeren molaren Masse von 10 kDa steigerte die Effizienz der Genexpression um das Dreifache. Als Fazit wurde festgehalten, dass das reaktiv-spaltbare Blockkationer **P2S** die bevorzugten Eigenschaften als nicht-viraler Genvektor hatte.

5.5 Experimentelles

5.5.1 Synthesevorschriften der Blockkationere

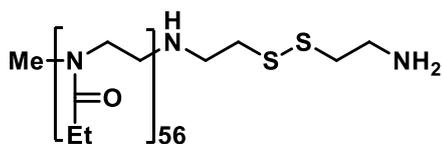
Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Darstellung der Poly(2-ethyl-2-Oxazoline) mit einer Disulfid-Funktion (PE1S, PE2S) und der Referenzpolymere (PE1, PE2)



Zu 2-Ethyl-2-oxazolin (n eq.) in trockenem Acetonitril (1 ml pro 3 mmol) wurde bei 0 °C Methyltriflat (1 eq.) hinzugegeben und die Lösung in einem zuvor temperierten Ölbad bei 120 °C für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde zur Termination der Polymerisation das Terminierungsreagenz T (20 eq.) zugegeben und bei 50 °C über Nacht

gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Chloroform aufgenommen und mit K_2CO_3 versetzt. Die Suspension wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend der Feststoff abfiltriert. Das Polymer wurde anschließend aus eiskaltem Diethylether gefällt und zentrifugiert. Das Lösungsmittel wurde anschließend abdekantiert und das Polymer am Hochvakuum getrocknet. Das Rohpolymer wurde mittels Dialyse (MWCO = 1000) gegen VE-Wasser gereinigt. Nach 48 h dialysieren, wurde das Wasser mittels Gefriertrocknung entfernt. Das Polymer wurde in wenig Chloroform gelöst, aus eiskaltem Diethylether gefällt und vom Fällungsreagenz abzentrifugiert. Nach anschließender Trocknung unter Hochvakuum, wurde das Polymer als farbloser Feststoff erhalten.

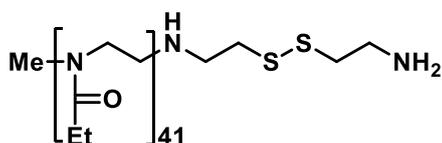
Synthese von Poly(2-ethyl-2-oxazolin)₅₆-SS-NH₂ (PE1S)



$M_{n,NMR}$	= 5718
$M_{n,GPC}$	= 6842
\bar{D}	= 1.14
Ausbeute	= 38%

Methyltriflat	93.42 μ L (0.8 mmol, 1 eq.)
2-Ethyl-2-oxazolin	2.50 mL (24.8 mmol, 30 eq.)
Cystamin	2.72 g (17.9 mmol, 20 eq.)
Acetonitril	8.00 mL

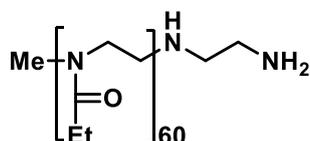
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1.11 (s, 173H, CH₃), 2.28-2.40 (m, 114H, CH₂), 2.95-3.05 (m, 3H, CH₃), 3.45-3.49 (m, 237H, CH₂-CH₂). (OCW-YO-24Q1)

Synthese von Poly(2-ethyl-2-oxazolin)₄₁-SS-NH₂ (PE2S)


$M_{n,NMR}$	= 4231
$M_{n,GPC}$	= 5011
\bar{D}	= 1.11
Ausbeute	= 29%

Methyltriflat	93.42 μ L (0.83 mmol, 1 eq.)
2-Ethyl-2-oxazolin	2.50 mL (24.76 mmol, 30 eq.)
Cystamin	2.72 g (17.90 mmol, 20 eq.)
Acetonitril	8.00 mL

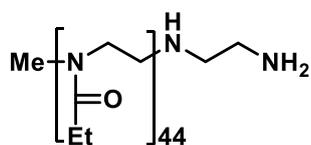
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1.12 (s, 121H, CH₃), 2.28-2.41 (m, 81H, CH₂), 2.96-3.06 (m, 3H, CH₃), 3.45-3.50 (m, 164H, CH₂-CH₂). (OCW-YO-34A)

Synthese von Poly(2-ethyl-2-oxazolin)₆₀-NH₂ (PE1)


$M_{n,NMR}$	= 6023
$M_{n,GPC}$	= 8016
\bar{D}	= 1.07
Ausbeute	= 26%

Methyltriflat	40.69 μ L (0.36 mmol, 1 eq.)
2-Ethyl-2-oxazolin	2.00 mL (19.81 mmol, 56 eq.)
Ethylendiamin	481.0 μ L (7.19 mmol, 20 eq.)
Acetonitril	7.00 mL

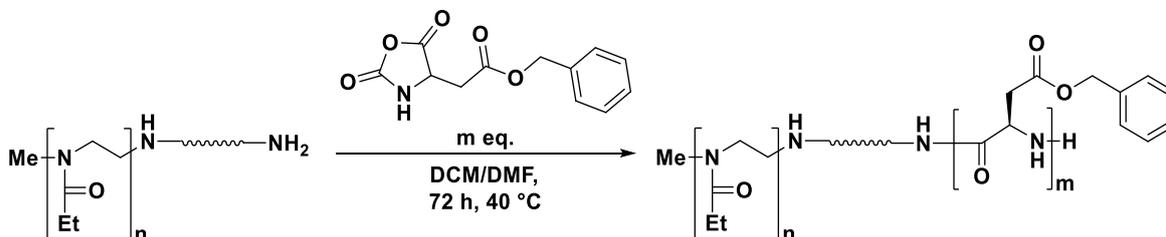
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1.10 (s, 181H, CH₃), 2.29-2.39 (m, 120H, CH₂), 2.96-3.01 (m, 3H, CH₃), 3.45 (s, 234H, CH₂-CH₂). (OCW-IP-DB-PPE4_60_nach Dialyse)

Synthese von Poly(2-ethyl-2-oxazolin)₄₄-NH₂ (PE2)


$M_{n,NMR}$	= 4437
$M_{n,GPC}$	= 5782
\bar{D}	= 1.08
Ausbeute	= 98%

Methyltriflat	40.69 μ L (0.36 mmol, 1 eq.)
2-Ethyl-2-oxazolin	2.00 mL (19.81 mmol, 56 eq.)
Ethylendiamin	481.0 μ L (7.19 mmol, 20 eq.)
Acetonitril	7.00 mL

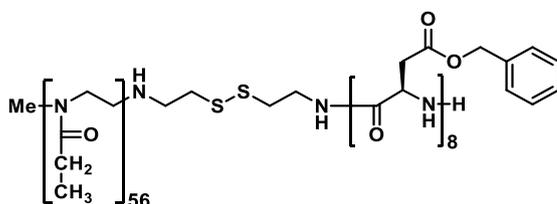
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1.12 (s, 135H, CH₃), 2.30-2.40 (m, 88H, CH₂), 2.96-3.02 (m, 3H, CH₃), 3.46-3.50 (m, 177H, CH₂-CH₂). (OCW-IP-DB-PPE1_44Blöcke)

Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Herstellung der reaktiv-spaltbaren Blockcopolymeren PEtOx-SS-PBLA (PP1S, PP2S) und der Referenz-Blockcopolymeren (PP1, PP2)


Zunächst wurde der Makroinitiator PEtOx-SS-NH₂ (1 eq.) bzw. PEtOx-NH₂ (1 eq.) in 5 mL trockenem DCM gelöst und für 2 h bei Raumtemperatur mit K₂CO₃ gerührt. Parallel wurde das Monomer BLA-NCA (m eq.) in einer Mischung aus trockenem DCM (5.0 mL) und trockenem DMF (0.5 mL) gelöst. Nachdem die Lösung des Makroinitiators zur Lösung des Monomers hinzugegeben wurde, wurde die Lösung für 72 h bei 40 °C gerührt. Das Polymer wurde durch direktes Fällern der Polymerisationslösung aus eiskaltem Diethylether gereinigt, indem es vom Fällungsreagenz abzentrifugiert wurde und der Fällungsprozess

mehrere Male wiederholt wurde. Nach anschließender Trocknung des Polymers unter Hochvakuum, wurde das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Synthese von PEtOx₅₆-SS-PBLA₈ (PP1S)

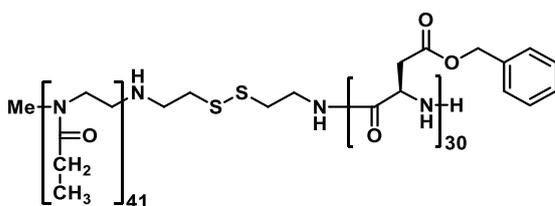


$M_{n,NMR}$	= 7375
$M_{n,GPC}$	= 7152
\bar{D}	= 1.17
Ausbeute	= 98%

PE1S	243.75 mg (0.04 mmol, 1 eq.)
BLA-NCA	124.20 mg (0.50 mmol, 12 eq.)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 0.95 (s, 171H, CH_{3,PEtOx}), 2.27-2.32 (m, 113H, CH_{2,PEtOx}), 2.60-2.61 (m, 10H, CH₂-C=O_{PBLA}), 2.77-2.81 (m, 12H, CH₂-C=O_{PBLA}), 2.92-2.97 (m, 3H, CH₃), 3.36-3.38 (m, 399H, CH₂-CH_{2,PEtOx}), 4.61-4.62 (m, 8H, CH_{PBLA}), 5.00-5.06 (m, 17H, CH₂-C₆H_{5,PBLA}), 7.27-7.31 (m, 42H, C₆H_{5,PBLA}), 8.19-8.23 (m, 5H, NH_{PBLA}). (OCW-YO-31)

Synthese von PEtOx₄₁-SS-PBLA₃₀ (PP2S)



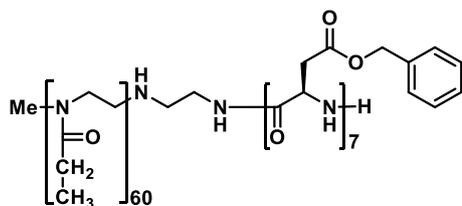
$M_{n,NMR}$	= 10448
$M_{n,GPC}$	= 7165
\bar{D}	= 1.26
Ausbeute	= 91%

PE2S	211.88 mg (0.05 mmol, 1 eq.)
BLA-NCA	397.45 mg (1.60 mmol, 32 eq.)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 0.97 (s, 126H, CH_{3,PEtOx}), 2.29-2.33 (m, 82H, CH_{2,PEtOx}), 2.61-2.67 (m, 35H, CH₂-C=O_{PBLA}), 2.81-2.85 (m, 36H, CH₂-C=O_{PBLA}), 2.93-2.97 (m,

3H, CH₃), 3.36-3.45 (m, 164H, CH₂-CH_{2,PETox}), 4.62-4.63 (m, 30H, CH_{PBLA}), 5.01 (bs, 58H, CH₂-C₆H_{5,PBLA}), 7.23-7.28 (m, 151H, C₆H_{5,PBLA}), 8.18 (bs, 26H, NH_{PBLA}). (OCW-YO-34B2)

Synthese von PEtOx₆₀-*b*-PBLA₇ (PP1)

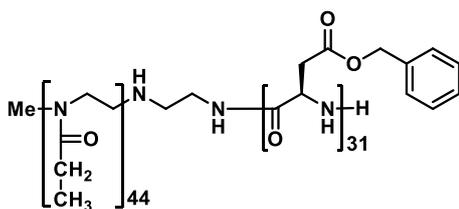


$M_{n,NMR}$ = 7474
 $M_{n,GPC}$ = 8192
 \bar{D} = 1.08
 Ausbeute = 83%

PE1	400.00 mg (0.07 mmol, 1 eq.)
BLA-NCA	148.96 mg (0.6 mmol, 9 eq.)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 0.95-0.97 (m, 182H, CH_{3,PETox}), 2.28-2.33 (m, 120H, CH_{2,PETox}), 2.58-2.63 (m, 9H, CH₂-C=O_{PBLA}), 2.78-2.83 (m, 11H, CH₂-C=O_{PBLA}), 3.36-3.44 (m, 254H, CH₂-CH_{2,PETox}), 4.61-4.62 (m, 7H, CH_{PBLA}), 5.00-5.06 (m, 16H, CH₂-C₆H_{5,PBLA}), 7.27-7.34 (m, 36H, C₆H_{5,PBLA}), 8.17 (bs, 5H, NH_{PBLA}). (OCW-IP-99)

Synthese von PEtOx₄₄-*b*-PBLA₃₁ (PP2)

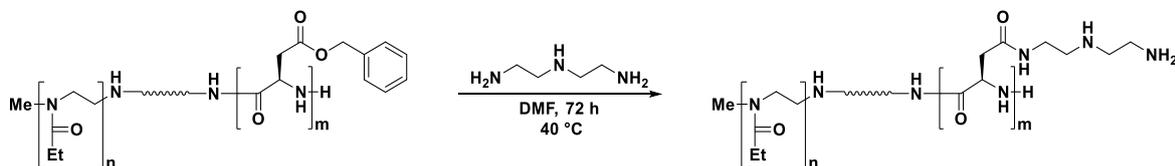


$M_{n,NMR}$ = 10861
 $M_{n,GPC}$ = 8914
 \bar{D} = 1.18
 Ausbeute = 76%

PE2	400.00 mg (0.09 mmol, 1 eq.)
BLA-NCA	741.43 mg (2.98 mmol, 33 eq.)

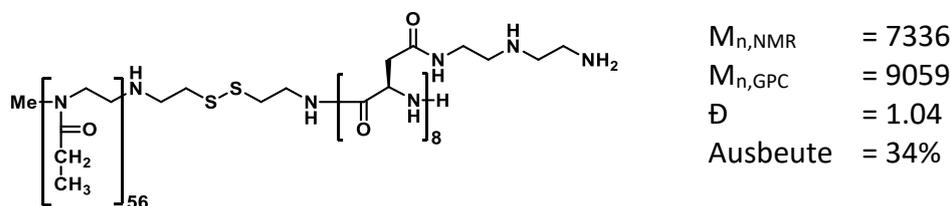
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 0.96-0.97 (m, 134H, $\text{CH}_3, \text{PEtOx}$), 2.28-2.33 (m, 88H, $\text{CH}_2, \text{PEtOx}$), 2.58-2.62 (m, 32H, $\text{CH}_2\text{-C=O}_{\text{PBLA}}$), 2.80-2.84 (m, 37H, $\text{CH}_2\text{-C=O}_{\text{PBLA}}$), 3.36-3.45 (m, 187H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2, \text{PEtOx}$), 4.61-4.63 (m, 31H, CH_{PBLA}), 5.00-5.04 (m, 67H, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5, \text{PBLA}$), 7.27-7.30 (m, 140H, $\text{C}_6\text{H}_5, \text{PBLA}$), 8.17 (bs, 25H, NH_{PBLA}). (OCW-IP-DB-PE1)

Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Herstellung der reaktiv-spaltbaren Blockkationere PEtOx-SS-P[Asp(DET)] (P1S, P2S) und der Referenz-Blockkationere (P1, P2)



Das Blockcopolymer wurde in trockenem DMF (10 mL pro 0.01 mmol Polymer) gelöst und anschließend mit Diethylentriamin (DET) (50.00 eq. bezogen auf die Benzylesterfunktionen des Polymers) versetzt. Dann wurde die Reaktion für 72 h bei 40 °C gerührt. Anschließend wurde die Lösung tropfenweise in 15-30 mL 10%ige Essigsäure bei 0 °C zugegeben. Das Polymer wurde durch 72 h Dialyse gegen 0.01 M HCl-Lösung und VE-Wasser gereinigt und durch Lyophilisieren getrocknet. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

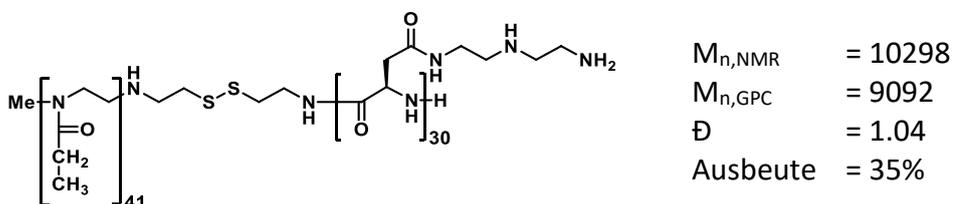
Synthese von PEtOx₅₆-SS-P[Asp(DET)]₈ (P1S)



PP1S	250.00 mg (0.03 mmol, 1 eq.)
DET	1.44 mL (13.33 mmol, 400 eq.)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ (ppm) = 0.94-0.99 (m, 168H, $\text{CH}_3_{\text{PEtOx}}$), 2.21-2.32 (m, 112H, $\text{CH}_2_{\text{PEtOx}}$), 2.74-3.02 (m, 48H, $\text{NH-CH}_2_{\text{DET}}$), 3.16 (bs, 33H, $\text{CH}_2\text{-NH}_2_{\text{DET}}$), 3.43-3.52 (m, 215H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2_{\text{PEtOx}}$), 3.53-3.63 (m, 24H, $\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2_{\text{DET}}$), 4.62 (bs, 4H, CH_{PAsp}). (OCW-YO-31A)

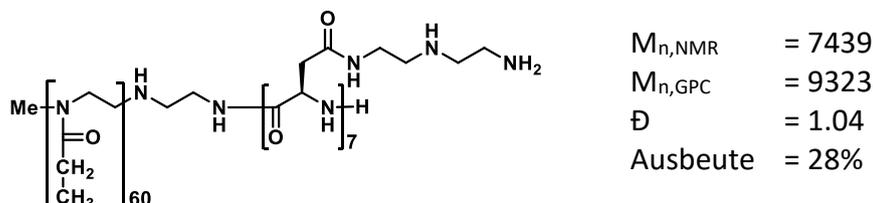
Synthese von PEtOx₄₁-SS-P[Asp(DET)]₃₀ (P2S)



PP2S	300.00 mg (0.03 mmol, 1 eq.)
DET	4.68 mL (43.27 mmol, 1500 eq.)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): δ (ppm) = 0.94-0.97 (m, 126H, $\text{CH}_3_{\text{PEtOx}}$), 2.20-2.31 (m, 82H, $\text{CH}_2_{\text{PEtOx}}$), 2.74-2.84 (m, 42H, $\text{NH-CH}_2_{\text{DET}}$), 3.08 (bs, 50H, $\text{NH-CH}_2_{\text{DET}}$), 3.25 (bs, 120H, $\text{CH}_2\text{-NH}_2_{\text{DET}}$), 3.42-3.49 (m, 173H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2_{\text{PEtOx}}$), 3.51-3.53 (m, 69H, $\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2_{\text{DET}}$). (OCW-YO-34C2)

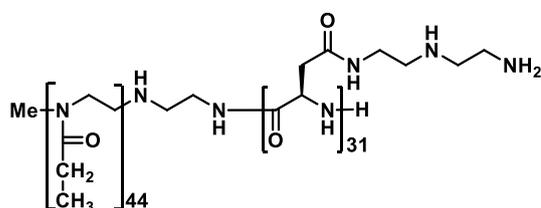
Synthese von PEtOx₆₀-b-P[Asp(DET)]₇ (P1)



PP1	300.00 mg (0.04 mmol, 1 eq.)
DET	1.51 mL (14.00 mmol, 350 eq.)

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ (ppm) = 0.99-1.04 (m, 177H, CH_{3,PEtOx}), 2.26-2.38 (m, 120H, CH_{2,PEtOx}), 2.88-3.00 (m, 14H, NH-CH_{2,DET}), 3.10-3.26 (m, 26H, NH-CH_{2,DET}) 3.47 (bs, 181H, CH_{2-CH_{2,PEtOx}}), 3.58 (m, 69H, CH_{2-NH-CH_{2,DET}}), 4.75 (bs, 5H, CH_{PAsp}). (OCW-IP-107)

Synthese von PEtOx₄₄-b-P[Asp(DET)]₃₁ (P2)



M _{n,NMR}	= 10707
M _{n,GPC}	= 12492
Đ	= 1.09
Ausbeute	= 46%

PP2	300.00 mg (0.03 mmol, 1 eq.)
DET	4.62 mL (42.81 mmol, 1550 eq.)

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ (ppm) = 0.98-1.04 (m, 133H, CH_{3,PEtOx}), 2.26-2.38 (m, 88H, CH_{2,PEtOx}), 2.78-2.90 (m, 60H, NH-CH_{2,DET}), 2.98-3.04 (m, 44H, NH-CH_{2,DET}) 3.46 (bs, 188H, CH_{2-CH_{2,PEtOx}}), 3.56-3.58 (m, 56H, CH_{2-NH-CH_{2,DET}}), 4.67 (bs, 20H, CH_{PAsp}). (OCW-IP-DB-P1-1)

6 Biotin-modifiziertes PEtOx_n-b-P[Asp(DET)]_m Blockkatiomer für den aktiven Gentransport

6.1 Einleitung

Kationisch geladene Polyplexmizellen binden über Ladungsinteraktionen an die negativ geladene Zelloberfläche und gelangen so über adsorptive Endozytose in die Zelle. Bei dieser Art der Zellaufnahme fehlt es an Selektivität und Spezifität, da die meisten Zellen negativ geladene Oberflächen haben. Durch Funktionalisierung der Schale von Polyplexmizellen mit Liganden kann sowohl die Spezifität als auch die Effizienz des Gentransfers verbessert werden. Der Ligand bindet an die spezifischen Rezeptoren der adressierten Zielzellen und ermöglicht somit das so genannte aktive Targeting. Je nach Zielgewebe gibt es zahlreiche niedermolekulare und makromolekulare Substanzen, die als Liganden Verwendung finden. Beispielsweise können Leberzellen mit Laktose, Galaktose und anderen Zuckerderivaten gezielt adressiert werden. Funktionalisierte Polyplexmizellen mit Transferrin (Tf) und Folsäure (wasserlösliche Form von Vitamin B₉) können selektiv in Krebszellen aufgenommen werden. Das Konzept des aktiven Targeting mit Liganden-funktionalisierten Polyplexmizellen hat sich bereits sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bewährt, da dadurch insbesondere die Gentransfereffizienz aufgrund Rezeptor-vermittelter zellulärer Aufnahme erhöht wird.^[22] Vor allem in Zusammenhang mit abgeschirmten Polyplexmizellen durch nichtionische Polymere wie PEG, konnte durch Kopplung von aktiven Liganden an das abschirmende Polymer die zelluläre Aufnahme signifikant verbessert werden. *Kataoka et al.* berichteten, dass die Funktionalisierung von PEGylierten Polyplexmizellen mit einem cyclischen Peptid-Liganden, welches aus insgesamt fünf Aminosäuren einschließlich Arginin, Glycin und Asparaginsäure (cRGD) besteht, zu einer höheren Transfektionseffizienz führte. Diese ist zum einem auf der Rezeptor-vermittelten Zellaufnahme und zum anderen auf der erleichterten Akkumulation in der Zellkernumgebung (perinukleare Region) begründet. Weiterhin wird angenommen, dass RGD-Liganden die Endozytose und den endosomalen Austritt von PEGylierten Polyplexmizellen beschleunigen und begünstigen können.^[167,168] RGD-funktionalisierte Partikel binden insbesondere an aktivierte

Endothelzellen, Tumorendothelien und einigen Tumorzelltypen, da die entsprechenden Rezeptoren, die so genannten $\alpha_v\beta_3$ Integrine hochreguliert auf den jeweiligen Zelloberflächen vorliegen.^[169]

Neben der Verwendung von Zuckern und Peptiden, hat sich ein neues Konzept, das so genannte Vitamin-vermittelte Targeting, für das Adressieren von Tumoren bewährt.^[170–173] Menschliche Zellen benötigen nämlich für ihren Lebenszyklus eine ausreichende Versorgung mit Vitaminen. Das trifft insbesondere auf Zellen zu, welche sich sehr schnell teilen und dementsprechend ein schnelles Wachstum haben, wie Haare, Nägel, Plazenta, aber auch Tumoren.^[174] Um eine gute Aufnahme von Vitaminen zu gewährleisten, werden Vitamin-spezifische Rezeptoren an der Oberfläche solcher Zellen überexprimiert. Das heißt, dass Konjugationen von zytotoxischen Verbindungen mit ausgewählten Vitaminen die Aufnahme in Zellen verbessern würden, weil der Transport spezifischer und effizienter wäre. Damit könnte eine höhere Wirkstoff-Dosis in den Krebszellen erreicht werden.^[174] Weiterhin könnte durch Oberflächen-Funktionalisierung mit ausgewählten Vitaminen der Transport von mit Wirkstoff beladenen, polymeren Mizellen und Nanopartikeln spezifischer und mit höherer Akkumulation des Wirkstoffes in den Krebszellen ermöglicht werden.^[175–181] Um das vielversprechendste Vitamin, mit einer äußerst effizienten und spezifischen Transportaktivität ausfindig zu machen, wurden Vergleichsstudien mit Folsäure-, Vitamin B12-, Riboflavin- und Biotin-funktionalisierten, polymeren Wirkstoff-Transport-Systemen gemacht. Die erste Arbeit zu diesem Thema wurde von *Russel-Jones* et al. im Jahr 2004 veröffentlicht. Biotin erwies sich in dieser Arbeit als das vielversprechendste Targeting-Molekül, welches den Anti-Tumor-Wirkstoff in hohen Dosen spezifisch in Krebszellen transportierte.^[173] Die Verwendung von Biotin als Ligand für aktives Targeting hat also ein großes Potential vor allem Krebszellen im menschlichen Körper zu adressieren. Die Aufnahme von Biotin-funktionalisierten Wirkstoff-Konjugaten oder Nanopartikeln in Krebszellen läuft *via* Rezeptor-vermittelter Endozytose ab, die hauptsächlich von einem Natrium-abhängigen Multivitamin-Transporter (SMVT) gesteuert wird, die insbesondere in aggressiven Krebszelllinien wie Leukämie (L1210FR),

Eierstoffkrebs (OV 2008, ID8), Dickdarmkrebs (Colo-26), Mastozytom (P815), Lungenkrebs (M109), Nierenkrebs (RENCA, RD0995) und Brustkrebs (4T1, JC, MMT06056) überexprimiert vorliegen.^[182,183] Interessant dabei ist, dass die Überexpression der Biotin-spezifischen Rezeptoren sogar höher ist, als die der Folsäure.^[172] Das ist nicht verwunderlich, denn Biotin ist eine der wichtigsten exogenen Mikronährstoffe, welche für zelluläre Funktionen und Wachstum notwendig sind.^[184,185] In der Literatur findet man unterschiedliche Ansätze Biotin als Targeting-Molekül in der Krebstherapie einzusetzen. In diesem Zusammenhang sollen Biotin-Wirkstoff-Konjugate mit Taxoiden, Doxorubicin (DOX) und Gemcitabin erwähnt werden. Es wurde berichtet, dass durch die Biotin-Konjugation Wirkstoffe spezifisch in Krebszellen transportiert wurden, sodass die Zytotoxizität in gesunden Zellen reduziert und die Dosis in Krebszellen erhöht wurde.^[174] In der Literatur sind mehrere Beispiele zu finden, wo Biotin-funktionalisierte Nanopartikel bzw. Mizellen für den Transport von wasserunlöslichen Krebs-Therapeutika, wie Kurkumin und DOX, eingesetzt wurden.^[186–188] Dabei wurden die Anti-Tumor-Wirkstoffe im hydrophoben Kern der Mizellen verkapselt, während Biotin als Targeting-Ligand kovalent am hydrophilen PEG-Polymer gebunden vorlag. Durch die Rezeptor-vermittelte Endozytose wurde die Zellaufnahme der Biotin-funktionalisierten Wirkstoff-Transport-Systeme erhöht, sodass die Anti-Tumor-Wirkung in den Krebszellen deutlich gesteigert werden konnte. Die Zytotoxizität der Polymere war dabei vergleichsweise niedrig wie die der nicht funktionalisierten Polymersysteme. Die Zytotoxizität der Wirkstoff-beladenen, Biotin-funktionalisierten Transportsysteme war dagegen signifikant höher als die der nicht funktionalisierten Partikel, aufgrund der erhöhten Akkumulation des Wirkstoffes.^[186–188] Aus der Literatur ist also bereits bekannt, dass Biotin sich als ein vielversprechendes Targeting-Molekül bewährt hat und aufgrund der Überexprimierung von Biotin-Rezeptoren in Krebszellen, insbesondere Anwendung für Anti-Tumor-Wirkstoffe findet.^[189–194] In Hinblick auf die Gentherapie, ist nach unserer heutigen Recherche (09.05.2019) kein Literaturbeispiel bekannt, indem Biotin als Targeting-Ligand für Polymer/pDNA-Komplexe Verwendung findet. Es sind lediglich Beispiele zu DNA-Transport mittels polymerer

Vektoren basierend auf Biotin-Avidin-Komplexen zwischen dem abschirmenden PEG- und den kationischen PEI-Polymer publiziert. Durch die Einführung des Biotin-Avidin-Komplexes in die Polymerstruktur, sollte das bekannte PEG-Dilemma durch nicht-kovalente Bindungen zwischen PEG und PEI umgangen werden.^[195,196] An diese Lücke in der Literatur soll in diesem Abschnitt der Arbeit angeknüpft werden.

6.2 Zielsetzung

Das Vitamin-vermittelte Targeting-Konzept hat sich in vielen Studien als sehr vielversprechend etabliert. Dabei zeigte sich vor allem, dass Biotin ein Erfolg versprechendes Molekül für das Adressieren von Tumorgewebe darstellt.^[174] Daher ist das Ziel dieses Abschnittes die Entwicklung eines Biotin-funktionalisierten nicht-viralen Genvektors für die Steigerung der Gentransfektionseffizienz. Durch die Einführung des Biotins als aktiver Ligand in das bereits bewährte Blockkatiomer PEtOxn-b-P[Asp(DET)]m, soll die Zellaufnahme der Polyplexmizellen durch rezeptorvermittelte Endozytose gesteigert und die Transfektionsaktivität verbessert werden. Abbildung 52 zeigt die Zielstruktur des Biotin-funktionalisierten Blockkatiomers als nicht-viraler Genvektor für den pDNA-Transport.

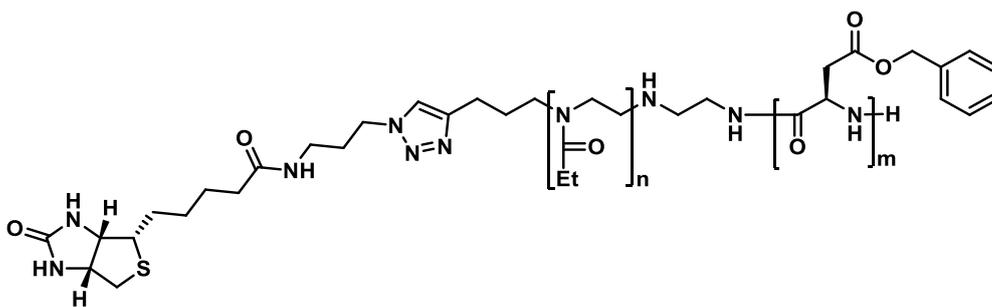


Abbildung 52 Zielstruktur des mit Biotin-funktionalisierten Blockkatiomers.

In diesem Abschnitt soll ein innovatives Blockkatiomer bestehend aus dem hydrophilen und biokompatiblen Poly(2-ethyl-2-oxazolin)-Polymers (PEtOx) und des bioabbaubaren Poly(aspartamid)s (PAsp) synthetisiert werden. Der hydrophile Polymerblock soll mit der

Biotin-Einheit funktionalisiert werden, während das Poly(aspartamid) (PAsp) mit einer kationischen *N*-(2-Aminoethyl)-2-aminoethyl-(DET)-Seitenkette modifiziert werden soll. Die Synthese des Zielpolymers soll in wenigen Schritten erfolgen, wobei jedes Zwischen- bzw. Kopplungsprodukt vollständig bezüglich der Zusammensetzung und Molmasse charakterisiert werden soll. Außerdem sollen die Polymere mit definierten molaren Massen und Blocklängen (*n*, *m*) in lebenden Polymerisationsmechanismen erhalten werden. Das finale Blockkationer soll in der Lage sein, Plasmid-DNA effizient zu Polyplexmizellen mit einer biokompatiblen Schale-Kern-Mizellenstruktur zu komplexieren (Abbildung 53).

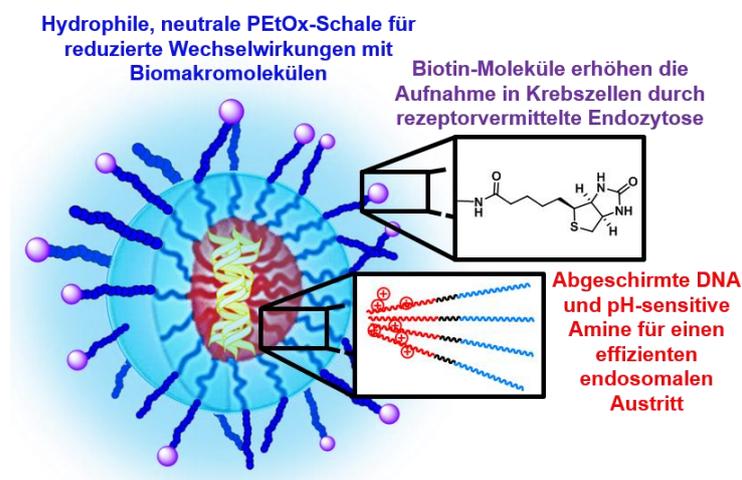


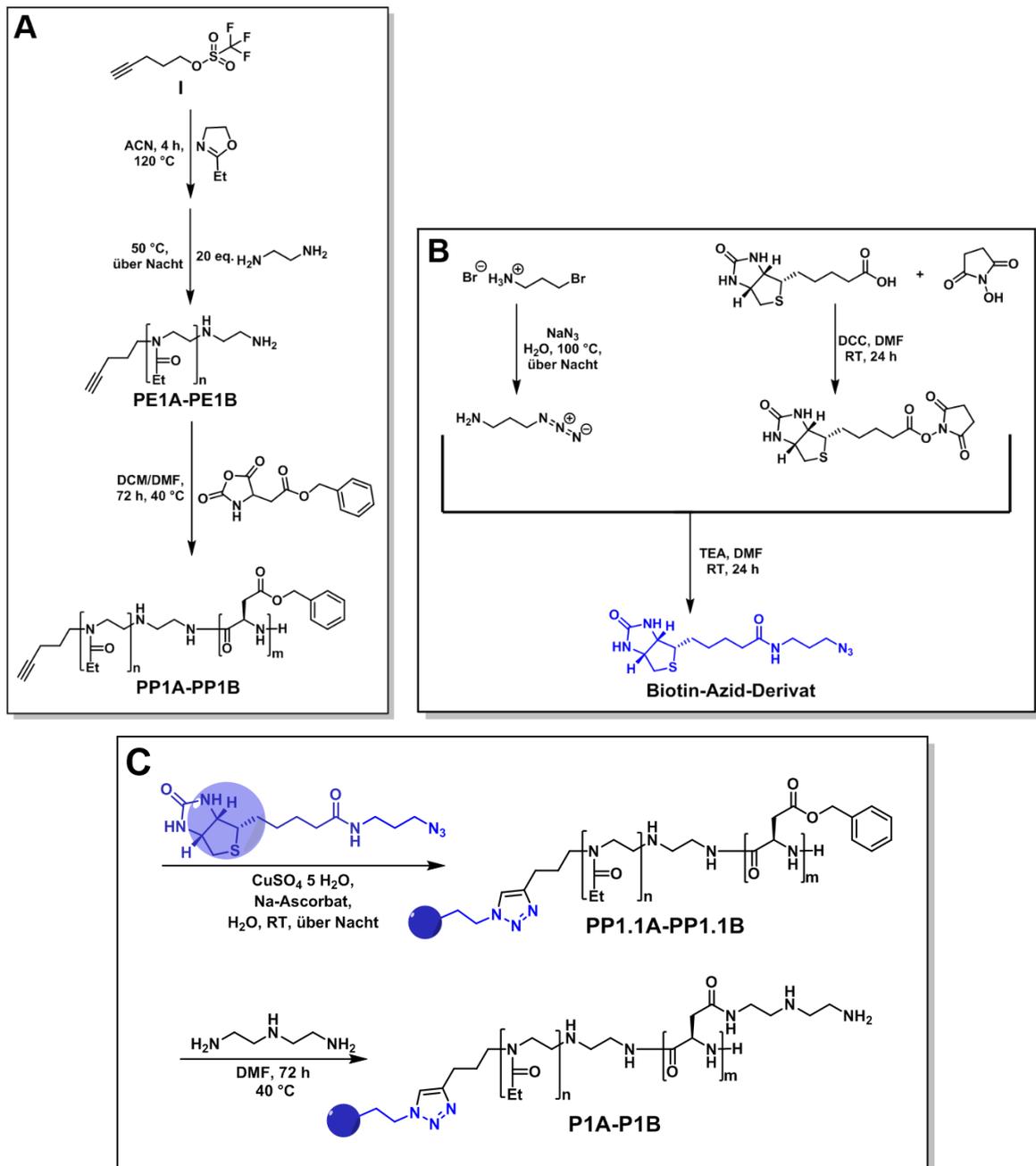
Abbildung 53 Schematische Darstellung der Polyplexmizelle mit Biotin-Einheiten auf der PEtOx-Schale für den aktiven Transport.

Die Funktionen und Eigenschaften der Polyplexmizelle sollen aufgrund des bereits in dieser Arbeit als nicht-viraler Genvektor bewährten Blockkationers PEtOxn-b-P[Asp(DET)]m beibehalten werden. Allerdings sollen die zelluläre Aufnahme und die Gentransfereffizienz der Biotin-funktionalisierten Polyplexmizellen aufgrund der Rezeptor-vermittelten, anstelle der nicht-spezifischen absorptions-vermittelten Endozytose, signifikant verbessert werden.

6.3 Ergebnisse und Diskussion

6.3.1 Synthese und Charakterisierung Biotin-modifizierter PEtOx-*b*-P[Asp(DET)] Blockkationomere für den aktiven Gentransport

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde auf einem einfachen Syntheseweg ein innovatives, biokompatibles Blockkationomer mit einem aktiven Liganden für rezeptorvermittelte Zellaufnahme synthetisiert. Biotin wurde dabei als Targeting-Molekül an die hydrophile Poly(2-ethyl-2-oxazolin) (PEtOX)-Einheit kovalent gebunden. Der Biotin-funktionalisierte Polymerblock wurde mit dem bioabbaubaren Poly(aspartat) (PAsp)-Polymer kombiniert, welches mit Diethylentriamin (DET) modifiziert wurde. Schema 5 zeigt die Synthese der Biotin-modifizierten Blockkationomere mit der Struktur Biotin-PEtOx_n-*b*-P[Asp(DET)]_m (**P1A**, **P1B**).



Schema 5 Schematische Darstellung der Biotin-modifizierten Blockkationmere **P1A**, **P1B**.

Der Alkin-funktionalisierte Triflat-Initiator wurde in einer Synthese aus 4-Pent-1-ol und Trifluormethansulfonsäureanhydrid hergestellt und in der lebenden Polymerisation des kommerziell erhältlichen 2-Ethyl-2-oxazolins eingesetzt (Schema 5A). Mit Ethylendiamin als Terminierungsreagenz wurde eine nukleophile endständige Amin-Gruppe in der

Polymerstruktur PEtOx_n-NH₂ (**PE1**, **PE1B**) generiert, womit die anschließende lebende Polymerisation von BLA-NCA initiiert wurde. Für die nächste polymeranaloge Kopplungsreaktion wurde zunächst das Biotin-Azid-Derivat durch die Reaktion von 3-Azidopropylamin mit dem Biotin-NHS-Derivats hergestellt (Schema 5B). Anschließend wurden die Blockkatiomere **PP1A** und **PP1B** in einer Kupfer-katalysierten Click-Reaktion mit Biotin-Azid-Derivat umgesetzt, um eine Biotin-Einheit in das Polymer einzuführen (Schema 5C). Der letzte Syntheseschritt war eine quantitativ ablaufende Aminolyse mit DET für die Einführung der DNA-komplexierenden und pH-empfindlichen Seitenkette. In dieser 4-stufigen Synthese wurden zwei biokompatible Blockkatiomere **P1A** und **P1B** der Polymerstruktur Biotin-PEtOx_n-b-P[Asp(DET)]_m erhalten. Da beide synthetisierten Blockkatiomere (**P1A**, **P1B**) nahezu identische Eigenschaften, wie Molmasse und Blocklängen hatten, wurden sie in weiteren Untersuchungen als identisch behandelt. Alle hier synthetisierten Polymere und niedrigmolekulare Verbindungen wurden mithilfe von NMR-Spektroskopie, IR- und GPC-Analysen vollständig charakterisiert. Um einen Vergleich zwischen Biotin-funktionalisierten und nicht funktionalisierten Blockkatiomeren zu ziehen, wurden die Blockkatiomere **P1A** und **P1B** mit dem Referenzpolymer PEtOx₄₄-b-P[Asp(DET)]₃₀ verglichen, welches im vorherigen Abschnitt als **P2** vollständig beschrieben wurde. In diesem Abschnitt soll das nicht funktionalisierte Polymer ebenfalls die Bezeichnung **P2** tragen.

Synthese und Charakterisierung des Alkin-funktionalisierten Triflatinitiators. Für die Polymerisation von 2-Ethyl-2-oxazolin sollte ein Alkin-funktionalisierter Triflatinitiator verwendet werden, um eine endständige Alkin-Funktion im hydrophilen PEtOx-Polymerblock zu generieren. Diese endständige Alkin-Funktion war Voraussetzung für die polymeranaloge Kupfer-katalysierte Click-Reaktion mit einem Biotin-Azid-Derivat, um das Polymer mit einem aktiven Liganden zu funktionalisieren. Der Alkin-funktionalisierte Initiator wurde in Anlehnung an die von *Severa et al.* publizierte Prozedur zur Darstellung von Triflaten synthetisiert.^[197] Die Reaktion zwischen Trifluormethansulfonylsäureanhydrid

und des Alkohols 4-Pentyn-1-ol wurde unter Verwendung von Pyridin als Base in Dichlormethan bei 0 °C durchgeführt (Abbildung 54).

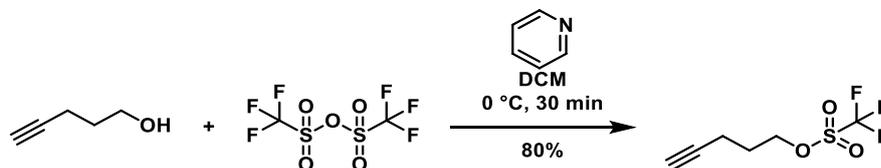


Abbildung 54 Synthese des Triflatinitiators Pent-4-ynyltrifluormethansulfonsäure.

Nach erfolgreicher Destillation wurde das Produkt als farblose Flüssigkeit in einer Ausbeute von 80% erhalten und im Tiefkühlschrank aufbewahrt. *Severa* et al. publizierten eine Lagerstabilität von mehreren Monaten bei einer Temperatur von -20 °C. Das Produkt wurde mithilfe von ^1H -, ^{19}F - und ^{13}C -NMR charakterisiert und die NMR-Spektroskopie-Daten stimmten gut mit der Literatur überein.^[197] Die synthetisierte Verbindung wurde im nächsten Abschnitt als Initiator eingesetzt.

Synthese und Charakterisierung des Biotin-Azid-Derivats für die polymeranaloge Click-Chemie. Die Synthese des Biotin-Azid-Derivats ist literaturbekannt und lässt sich ausgehend von reinem Biotin und 3-Azidopropylamin darstellen (Abbildung 55).^[198–201]

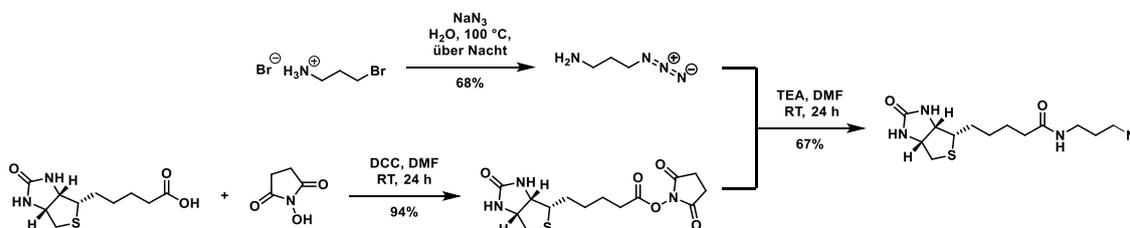


Abbildung 55 Synthese des Biotin-Azid-Derivats aus 3-Azidopropylamin und Biotin.

3-Azidopropylamin wurde hierbei aus Natriumazid und 1-Bromo-3-Aminopropan mit einer Ausbeute von 68% hergestellt. Das Biotin wurde mit einem NHS-Ester unter Steglich Bedingungen mit DCC aktiviert und in einer Ausbeute von 94% als farbloser Feststoff erhalten. Anschließend wurde in einer Aminolyse mit 3-Azidopropylamin das Biotin-Azid-Derivat mit einer Ausbeute von 67% dargestellt. Das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Reinigung als wachsartiger Feststoff erhalten. Das Biotin-Azid-

Derivat konnte mit einer Gesamtausbeute von 63% synthetisiert und als reines Produkt charakterisiert werden.

Zunächst soll auf die Charakterisierung der Zwischenprodukte eingegangen werden. Abbildung 56 zeigt die Untersuchung des 3-Azidopropylamins mittels NMR-Spektroskopie.

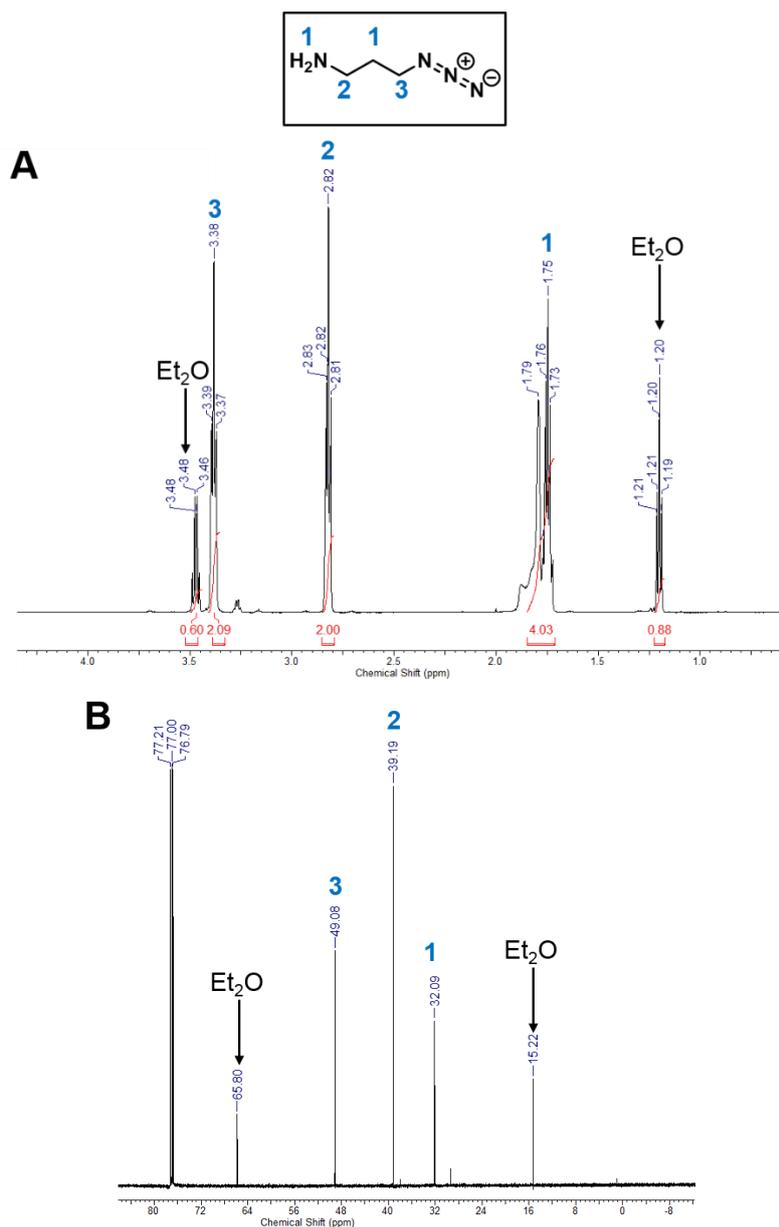


Abbildung 56 (A)¹H- und (B)¹³C-NMR-Spektren von 3-Azidopropylamin in CDCl₃.

Die NMR-Spektren des synthetisierten 3-Azidopropylamins stimmten gut mit der Literatur überein^[198,199] und bestätigten den Erfolg der Synthese eines reinen Zwischenprodukts. Zusätzlich wurde das Produkt mittels ESI-MS charakterisiert. Da die Verbindung schlagempfindlich ist und zur spontanen Explosion neigt, wurde das Produkt lediglich eingengt und das Lösungsmittel nicht vollständig entfernt. Im nächsten Schritt wurde Biotin mit NHS unter Steglich-Bedingungen mit DCC in DMF bei Raumtemperatur aktiviert. Der Aktivester wurde dann mit 3-Azidopropylamin unter basischen Bedingungen bei Raumtemperatur in DMF umgesetzt. Abbildung 57 zeigt die ¹H-NMR-Spektren der beiden Biotin-Derivate.

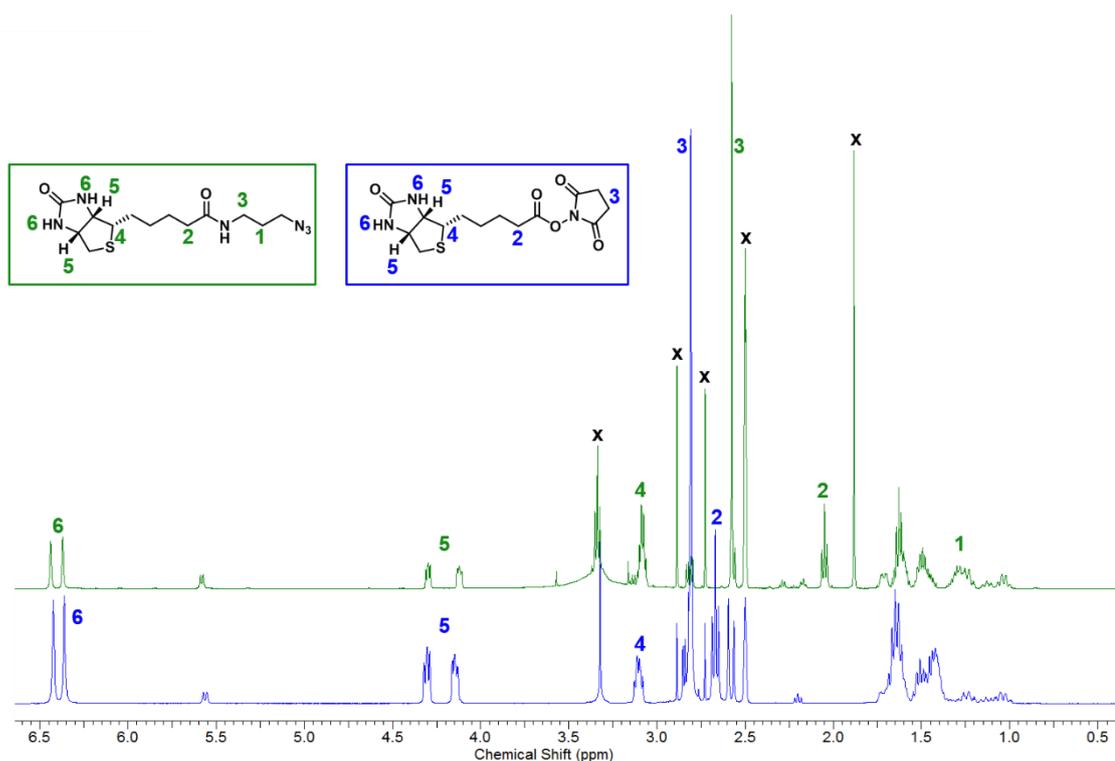


Abbildung 57 ¹H-NMR Spektren des Biotin-NHS- (blau) und Biotin-Azid-Derivats (grün) in DMSO-d₆.

Die mit x markierten Signale gehören nicht zu den Verbindungen und konnten den Lösungsmitteln Essigsäure, DMSO-d₆, DMF und Wasser zugeordnet werden. Die nummerierten Signale in blau stehen charakteristisch für die Biotin-NHS-Verbindung und die Signale in grün wurden dem Biotin-Azid-Derivat zugeordnet. Die Signale 1 und 3 wurden

den CH₂-Gruppen des 3-Azidopropylamin-Restes am Biotin-Azid-Derivat zugeordnet, welche die erfolgreiche Aminolyse bestätigen. Das Signal der CH₂-Gruppen des NHS-Esters (3) wurde im ¹H-NMR des Biotin-Azid-Derivats (grün) nicht beobachtet, was ebenfalls den Erfolg der Reaktion belegt. Insbesondere die Tieffeld-Verschiebung des Signals 2, welches in blau charakteristisch für die CH₂-Gruppe im NHS-Ester und in grün für die Amid-Gruppe benachbarte CH₂-Gruppe ist, ist ein deutlicher Hinweis für die erfolgreiche Umsetzung zum Biotin-Azid-Derivat. Die Signale 4, 5 und 6 wurden der Biotin-Einheit zugeordnet. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Biotin-Funktionalität auch nach der Umsetzung mit 3-Azidopropylamin unverändert geblieben war. Der Vergleich der FT-IR-Spektren der beiden Biotin-Derivate geben zusätzlichen Aufschluss über den Erfolg der Synthese (Abbildung 58).

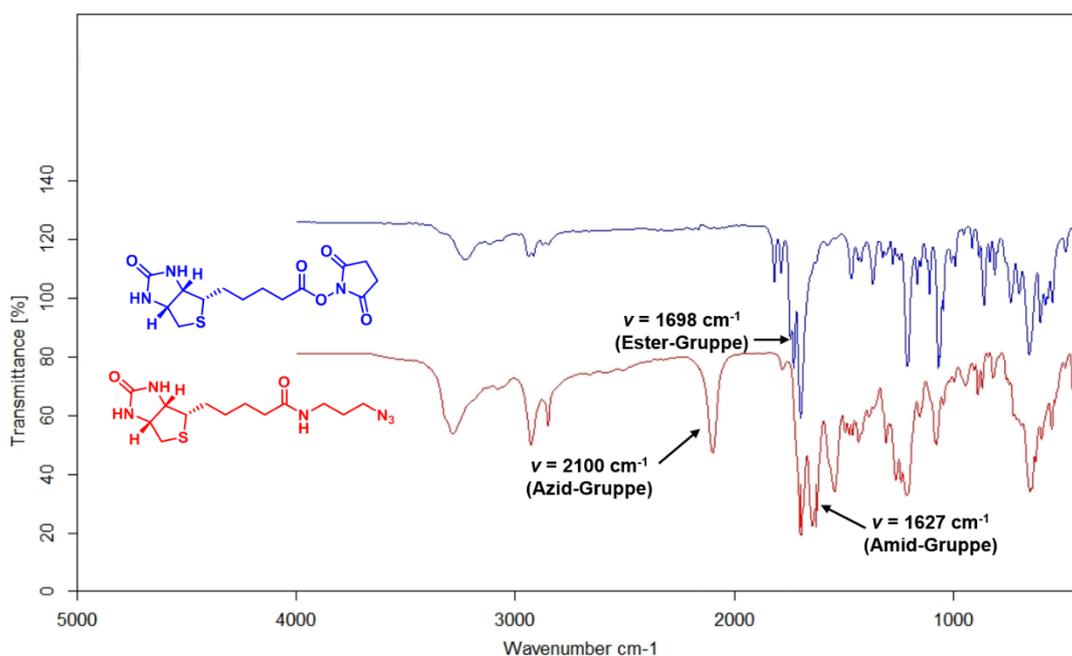


Abbildung 58 FT-IR-Spektren des Biotin-NHS-(blau) und Biotin-Azids-Derivats (rot).

Es ist deutlich zu erkennen, dass die charakteristische Bande für die Ester-Gruppe bei 1698 cm⁻¹ nach der Aminolyse mit 3-Azidopropylamin verschwunden ist und stattdessen eine Bande bei 1627 cm⁻¹ beobachtet wurde, welche charakteristisch für die Amid-Gruppe ist. Insbesondere die Bande bei 2100 cm⁻¹, welche durch die Azid-Gruppe resultiert,

verdeutlicht die erfolgreiche Umsetzung der Biotin-NHS-Verbindung zum gewünschten Biotin-Azid-Derivat.

Synthese und Charakterisierung der Makroinitiatoren Poly(2-ethyl-2-oxazolin)_n-NH₂ (PE1A, PE1B). Poly(2-ethyl-2-oxazolin) wurde durch eine lebende, kationische ringöffnende Polymerisation von 2-Ethyl-2-oxazolin, initiiert durch Pent-4-ynyl-Trifluormethansulfonsäure dargestellt (Abbildung 59).

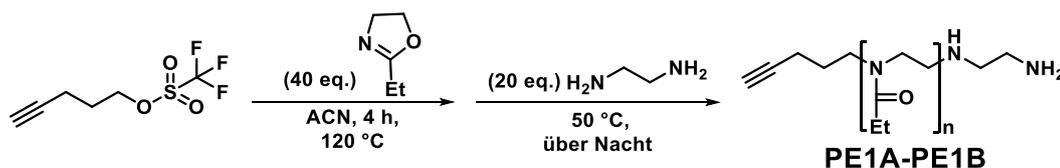


Abbildung 59 Synthese der PEtOxn-Homopolymere (**PE1**, **PE1B**) mit endständiger Alkin-Funktion und primärer Amin-Gruppe.

Die Polymerisation fand in Acetonitril bei 120 °C statt. Die Terminierung wurde mit Ethylendiamin durchgeführt, um eine endständige primäre Amin-Gruppe zu generieren. Diese Amin-Gruppe sollte in der anschließenden nukleophil ringöffnenden Polymerisation von BLA-NCA als Initiator fungieren. Ein großer Überschuss an Ethylendiamin ist notwendig, um mögliche intermolekulare Reaktionen während der Terminierung zu vermeiden. Der mittels GPC-Analyse ermittelte Polydispersitätsindex (\bar{M}_w/\bar{M}_n) von 1.08 lässt auf eine enge Molmassenverteilung und eine erfolgreiche lebende Polymerisation schließen, sodass intermolekulare Reaktionen mit Ethylendiamin ausgeschlossen wurden (Abbildung 60B).

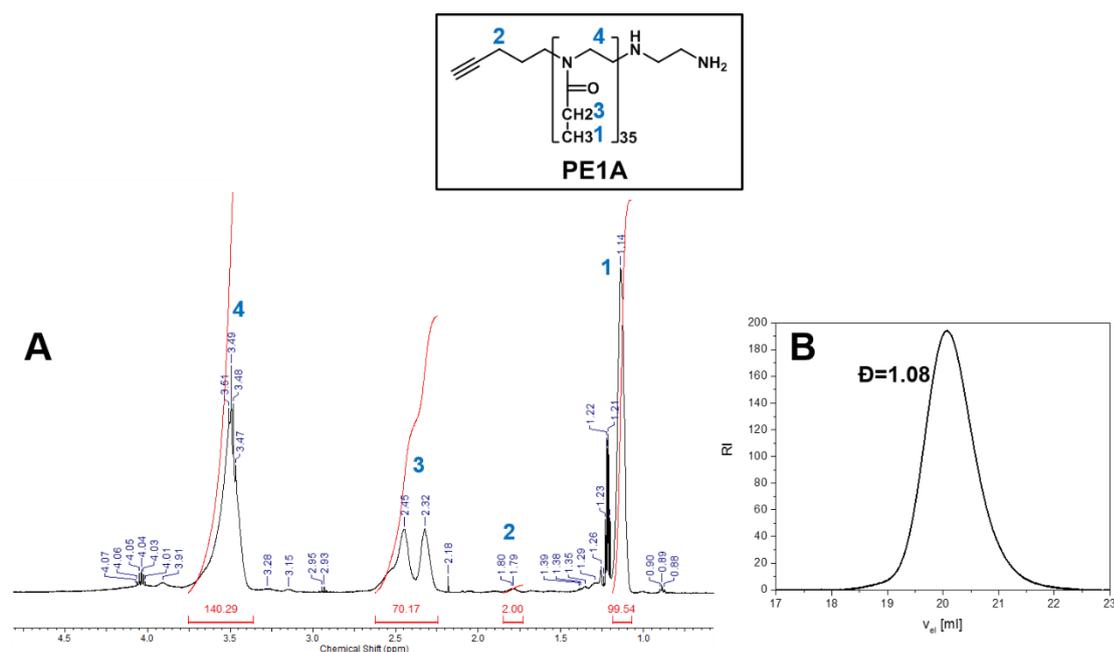


Abbildung 60 (A) ¹H-NMR-Spektrum (in CDCl₃) und (B) GPC-Chromatogramm des Alkin-funktionalisierten Homopolymers PEtOx₃₅-NH₂ (**PE1A**).

Der Polymerisationsgrad und die molaren Massen der Alkin-funktionalisierten Homopolymere wurden mithilfe der ¹H-NMR-Spektroskopie und Endgruppenanalyse ermittelt (Abbildung 60A). Das Signal 2 mit der chemischen Verschiebung von 1.79 ppm konnte eindeutig der endständigen Alkin-Funktion des Homopolymers **PE1A** zugeordnet werden. Für die Kalkulation des Polymerisationsgrades und folglich der molaren Massen wurde auf dieses Signal (2) referenziert. Die Signale bei 1.14, 2.32 und 3.49 ppm wurden der Ethyl- und CH₂-Gruppe des Poly(2-ethyl-2-oxazolins) zugeordnet. Tabelle 8 fasst die analytischen Daten der synthetisierten Homopolymere zusammen.

Tabelle 8 Analytische Daten der Alkin-funktionalisierten Homopolymere PEtOx_n-NH₂ (**PE1A**, **PE1B**).

No.	n ^{a)}	M _n ^{a)} [g/mol]	M _n ^{b)} [g/mol]	D ^{b)}	Ausbeute [%]
PE1A	35 (40)	3 596	5 770	1.08	51
PE1B	40 (40)	4 093	6 170	1.07	40

a) Polymerzusammensetzung und Molmasse wurden mittels ¹H-NMR-Spektroskopie in CDCl₃ und Endgruppenanalyse bestimmt, die theoretisch eingesetzten Äquivalente sind in Klammern angegeben; b) Molmasse M_n und Polydispersitätsindex D wurden über die GPC-Analyse bestimmt (PMMA Standards in DMF/5 mg/mL LiBr).

Es wurden zwei nahezu identische Alkin-funktionalisierte PEtOxn-NH₂ Homopolymere mit einer Wiederholungseinheit von 35 (**PE1A**) und 40 (**PE1B**) dargestellt. Beide Polymere hatten eine molare Masse von ca. 3.5 bis 4 kDa. Die niedrigen Polydispersitätsindices von 1.08 (**PE1A**) und 1.07 (**PE1B**) bestätigten die erfolgreiche lebende Polymerisation. Die Polymere wurden nach der Dialyse gegen VE-Wasser und Fällung aus kaltem Diethylether als farblose Feststoffe in moderaten Ausbeuten von 40-51% erhalten. Die beiden Homopolymere wurden als Makroinitiatoren in der folgenden Blockcopolymerisation von BLA-NCA eingesetzt.

Synthese und Charakterisierung der Blockcopolymere PEtOxn-b-PBLA_m (PP1A, PP1B). Für die Darstellung der Blockcopolymere mit einer endständigen Alkin-Funktion am hydrophilen PEtOxn-Polymer wurden die Homopolymere **PE1A** und **PE1B** als Makroinitiatoren in der lebenden, nukleophil ringöffnenden Polymerisation von β-Benzyl-L-asparaginsäure-N-carboxyanhydrid (BLA-NCA) verwendet (Abbildung 61).

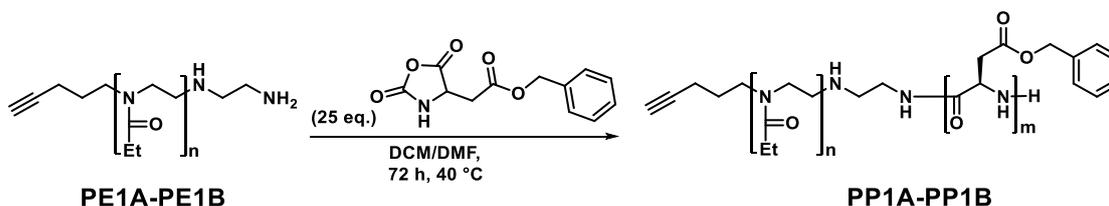


Abbildung 61 Synthese der Blockcopolymere PEtOxn-b-PBLA_m (**PP1A**, **PP1B**) mit einer endständigen Alkin-Funktion und **PE1A** bzw. **PE1B** als Makroinitiatoren.

Die synthetisierten Blockcopolymere wurden mittels ¹H-NMR-Spektroskopie, IR- und GPC-Analysen charakterisiert. Abbildung 62 zeigt die erfolgreiche Umsetzung anhand des ¹H-NMR-Spektrums und GPC-Chromatogramms von **PP1A**.

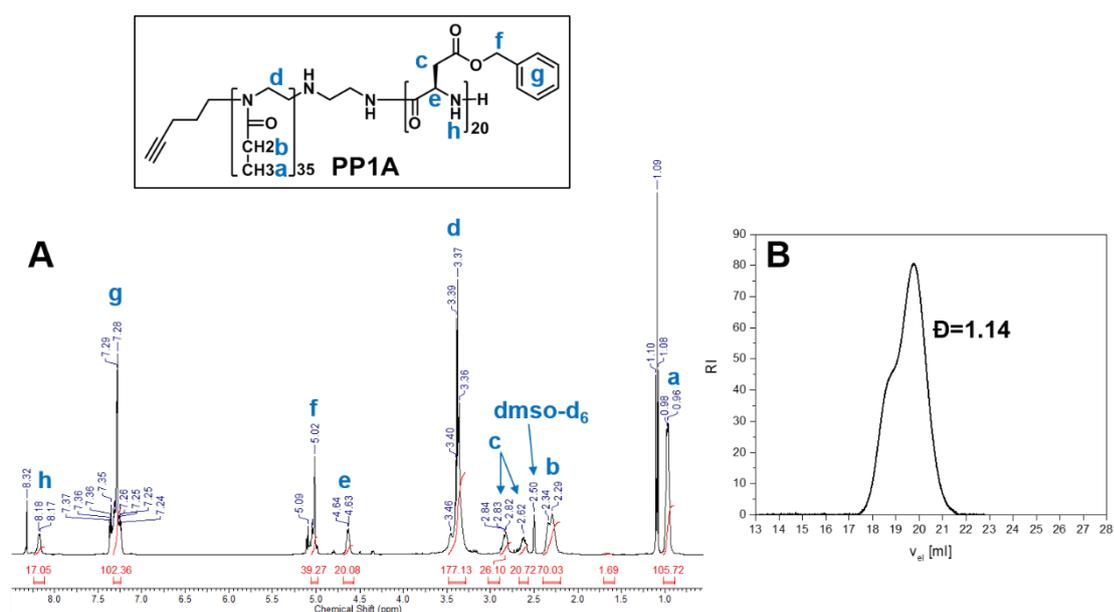


Abbildung 62 (A) ^1H -NMR-Spektrum und (B) GPC-Chromatogramm des Blockcopolymeres **PP1A**.

Die neuen Signale (*c*, *e-h*) mit der chemischen Verschiebung bei 2.62, 2.83, 4.63, 5.02, 7.28 und 8.18 ppm demonstrieren die erfolgreiche Blockcopolymerisation von BLA-NCA zu PEtOx₃₅-*b*-PBLA₂₀ (**PP1A**). Die molare Masse des Blockcopolymeres und der Polymerisationsgrad der hydrophoben PBLA-Einheit wurden anhand des Signals *e* mit der chemischen Verschiebung von 4.63 ppm berechnet. Die GPC-Analyse ergab einen Polydispersitätsindex (\bar{D}) von 1.14, was für eine enge Molmassenverteilung und damit für eine erfolgreiche lebende Blockcopolymerisation steht. Tabelle 9 fasst die analytischen Daten der synthetisierten Blockcopolymeren **PP1A** und **PP1B** zusammen.

Tabelle 9 Analytische Daten der Alkin-funktionalisierten Blockcopolymeren PEtOx_n-*b*-PBLA_m (**PP1A**, **PP1B**).

No.	n^a	m^a	n/m	M_n^a [g/mol]	M_n^b [g/mol]	\bar{D}^b	d_h^c [nm]	Ausbeute [%]
PP1A	35 (40)	20 (25)	1.8	7 741	7 900	1.14	204 ± 9	92
PP1B	40 (40)	22 (25)	1.8	8 652	9 290	1.18	228 ± 12	77

a) Polymerzusammensetzung und Molmasse wurden mittels ^1H -NMR-Spektroskopie in DMSO- d_6 und Endgruppenanalyse bestimmt, die theoretisch eingesetzten Äquivalente sind in Klammern angegeben; b) Molmasse M_n und Polydispersitätsindex \bar{D} wurden über die GPC-Analyse bestimmt (PMMA Standards in DMF/5 mg/mL LiBr); c) Der hydrodynamische Durchmesser d_h wurde über DLS Messungen einer 1 mM Polymerlösung in Wasser bestimmt.

Beide Blockcopolymere wurden nach Reinigung durch Fällung aus kaltem Diethylether als farblose Feststoffe in exzellenten Ausbeuten 77-92% erhalten. Da die kalkulierten Polymerisationsgrade für die PBLA-Einheit nur sehr gering von den theoretisch eingesetzten Äquivalenten abwichen, wurde davon ausgegangen, dass die Homopolymere **PE1A** und **PE1B** die Blockcopolymerisation von BLA-NCA gut initiiert hatten. Demnach wurden zwei nahezu identische Alkin-funktionalisierte Blockcopolymere der Zusammensetzung PEtO_x_n-b-PBLA_m mit molaren Massen von 8 kDa (**PP1A**) und 9 kDa (**PP1B**) erhalten. Die Blockcopolymere hatten ein Blocklängenverhältnis (n/m) von 1.8 mit 20 PBLA-Einheiten für **PP1A** und 22 PBLA-Repetiereinheiten für **PP1B**. Aufgrund des eingeführten hydrophoben PBLA-Polymerblocks, verfügten die synthetisierten Blockcopolymere über amphiphile Eigenschaften und bildeten in Wasser oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) mizellare Strukturen mit Durchmesser von 204-228 nm aus. Der gemessene hydrodynamische Durchmesser deutete jedoch auf die Bildung von größeren Aggregaten anstelle von Mizellen hin. Die amphiphilen Blockcopolymere wurden in der folgenden polymeranalogen Reaktion mit dem Biotin-Liganden modifiziert.

Polymeranaloge Click-Reaktion für die Einführung des aktiven Biotin-Liganden. Die Biotin-Einheit als Ligand für aktives Targeting wurde in einer Kupfer-katalysierten Click-Reaktion polymeranalog in die Blockcopolymerstruktur eingeführt (Abbildung 63).

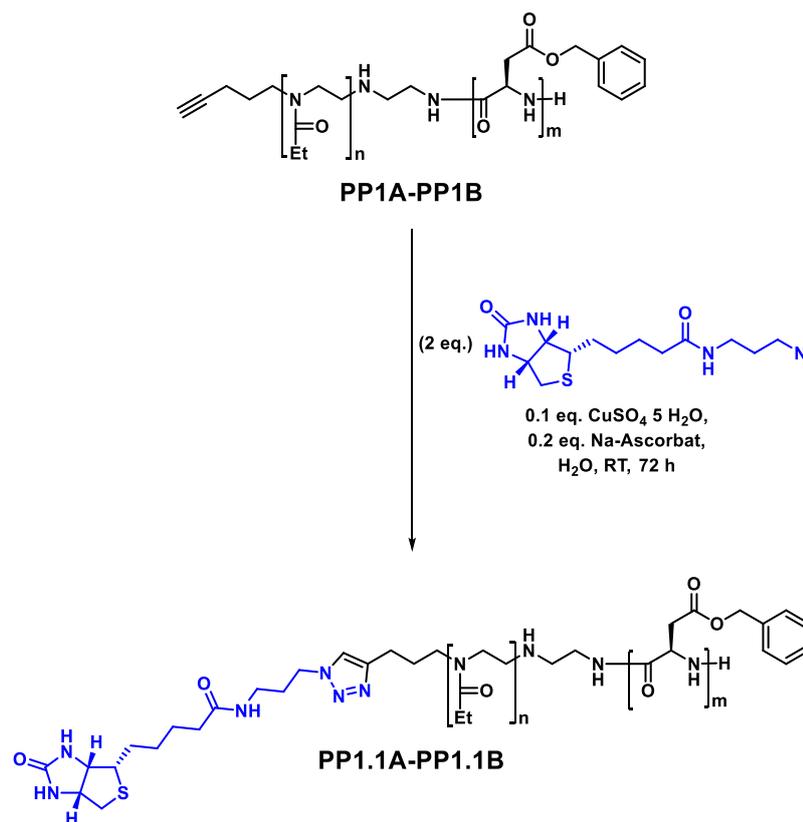


Abbildung 63 Kupfer-katalysierte Click-Reaktion am Blockcopolymer **PP1A** und **PP1B** zur polymeranalogen Einführung der Biotin-Einheit.

Die Reaktion zwischen der endständigen Alkin-Gruppe am Blockcopolymer und des Biotin-Azid-Derivats wurde in Wasser mit Kupfersulfat als Katalysator durchgeführt. Abbildung 64 zeigt das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Biotin-funktionalisierten Blockcopolymers **PP1.1A**.

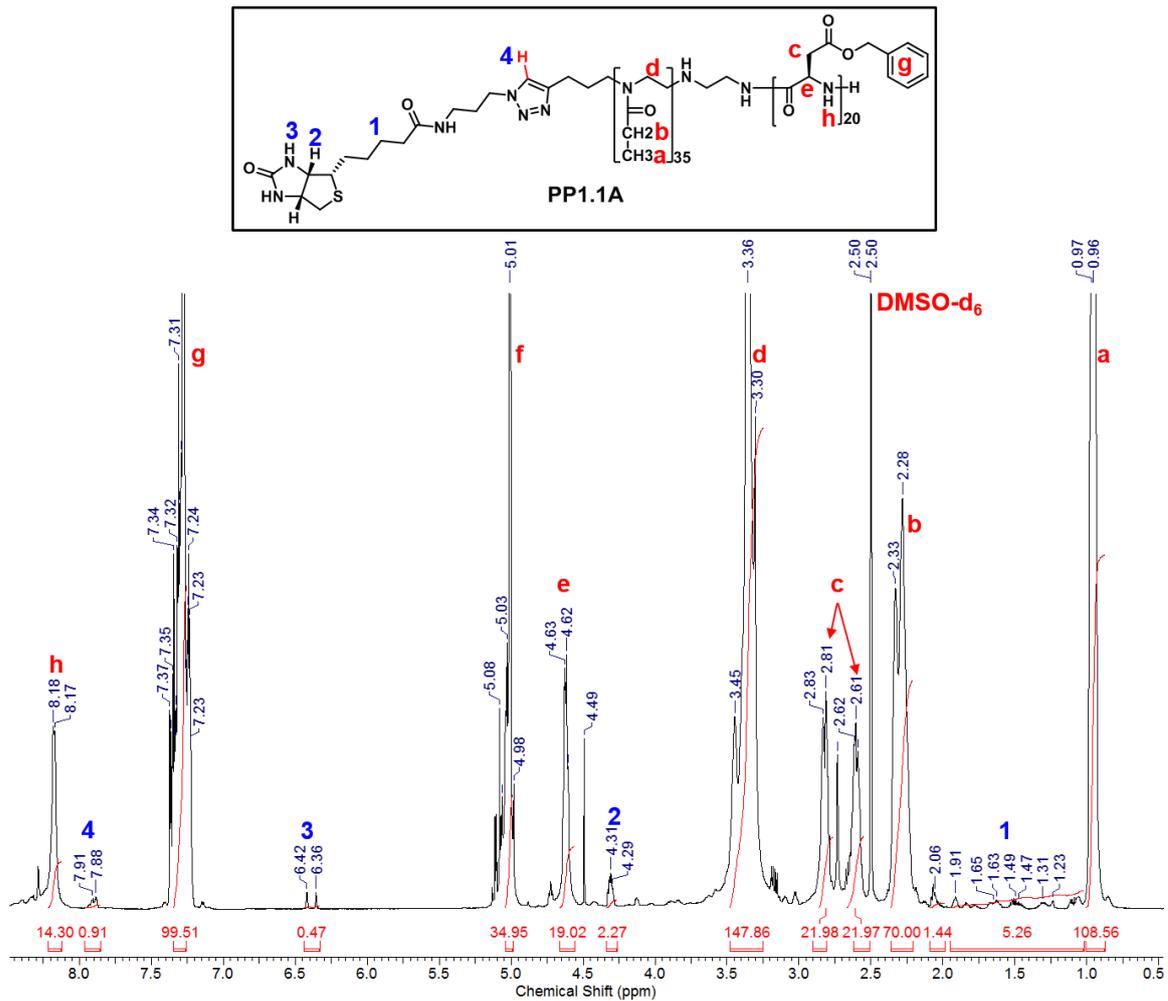


Abbildung 64 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Biotin-modifizierten Blockcopolymers PEO₃₅-b-PBLA₂₀ (PP1.1A) in DMSO-d₆.

Die Signale *a-h* konnten erfolgreich den PEO- und PBLA-Polymerblöcken zugeordnet werden. Die Signale 1-4 wurden als die neu eingeführte Biotin-Einheit identifiziert. Insbesondere anhand des Signals 4 mit der chemischen Verschiebung von 7.88 ppm, welches dem Wasserstoffatom in 5-Position des Triazolrings zuzuordnen ist, ist deutlich zu erkennen, dass die polymeranaloge Click-Reaktion erfolgreich war. Das Integral von 0.91 belegt eine nahezu quantitative Umsetzung. Die Biotin-modifizierten Blockcopolymere PP1.1A und PP1.1B wurden außerdem mittels IR- und GPC-Analysen charakterisiert (Abbildung 65).

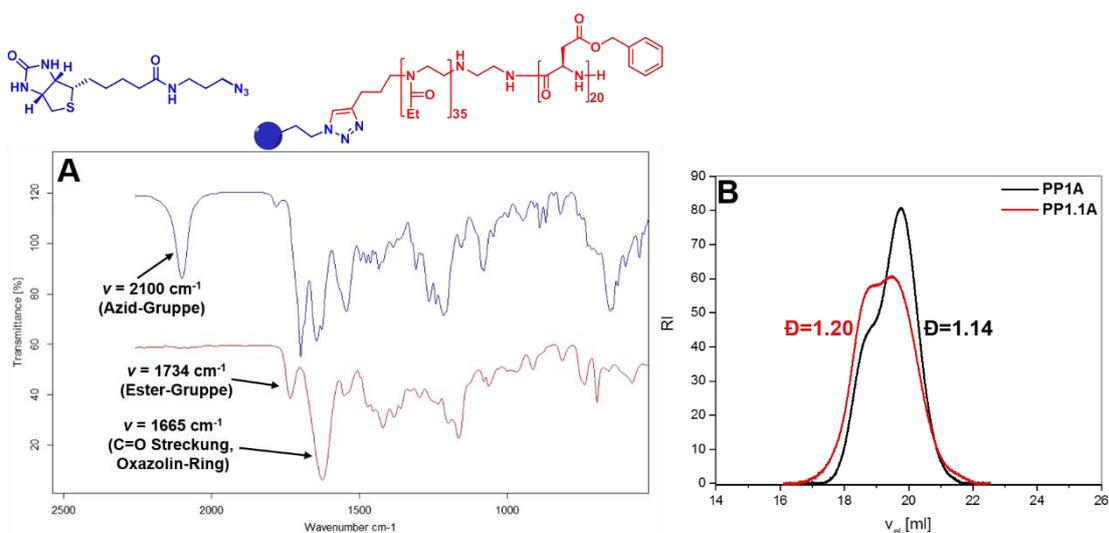


Abbildung 65 (A) IR-Spektren des Biotin-Azid-Derivats (blau) und des Biotin-modifizierten Blockcopolymeres **PP1.1.A** (rot); (B) GPC-Chromatogramme des Blockcopolymeres **PP1A** (schwarz) und des Biotin-modifizierten Blockcopolymeres **PP1.1A** (rot).

Im IR-Spektrum des Biotin-modifizierten Blockcopolymeres **PP1.1A** wurden charakteristische Banden für die Ester-Gruppe bei 1734 cm⁻¹ und für den Oxazolin-Ring bei 1665 cm⁻¹ gefunden. Die GPC-Analyse lieferte einen Polydispersitätsindex (\bar{D}) von 1.20, was auf eine erfolgreiche polymeranaloge Click-Reaktion hinweist. Tabelle 10 fasst die analytischen Daten für die Biotin-modifizierten Blockcopolymeren **PP1.1.A** und **PP1.1B** zusammen.

Tabelle 10 Analytische Daten der Biotin-modifizierten Blockcopolymeren **PP1.1A** und **PP1.1B**.

No.	n ^{a)}	m ^{a)}	n/m	M _n ^{a)} [g/mol]	M _n ^{b)} [g/mol]	\bar{D} ^{b)}	Ausbeute [%]
PP1.1A	35 (40)	20 (25)	1.8	8 067	8 490	1.20	74
PP1.1B	40 (40)	22 (25)	1.8	8 978	9 170	1.24	15

a) Polymerzusammensetzung und Molmasse wurden über ¹H-NMR-Spektroskopie in DMSO-d₆ und Endgruppenanalyse bestimmt, die theoretisch eingesetzten Äquivalente sind in Klammern angegeben; b) Molmasse M_n und Polydispersitätsindex \bar{D} wurden über die GPC-Analyse bestimmt (PMMA Standards in DMF/5 mg/mL LiBr).

Es wurde eine molare Masse von ca. 8 kDa für das Blockcopolymer **PP1.1A** und ca. 9 kDa für **PP1.1B** mithilfe der ¹H-NMR-Spektroskopie berechnet. Die Biotin-modifizierten Blockcopolymeren wurden in der folgenden Reaktion mit DET zu Blockkationeren umgesetzt.

Synthese und Charakterisierung der Biotin-modifizierten Blockkationere PEtOx_n-b-P[Asp(DET)]_m (P1A, P1B). Der letzte Schritt der Synthese war eine polymeranaloge Aminolyse der Blockcopolymeren (PP1.1A, PP1.1B) mit DET zu Biotin-modifizierten Blockkationeren P1A und P1B. Um mögliche inter- oder intramolekulare Reaktionen zu vermeiden, wurde DET im 50-fachen Überschuss in Bezug auf die Benzyl-Gruppe in der PBLA-Einheit des Polymers eingesetzt. Abbildung 66 zeigt das ¹H-NMR-Spektrum des Blockkationers P1A.

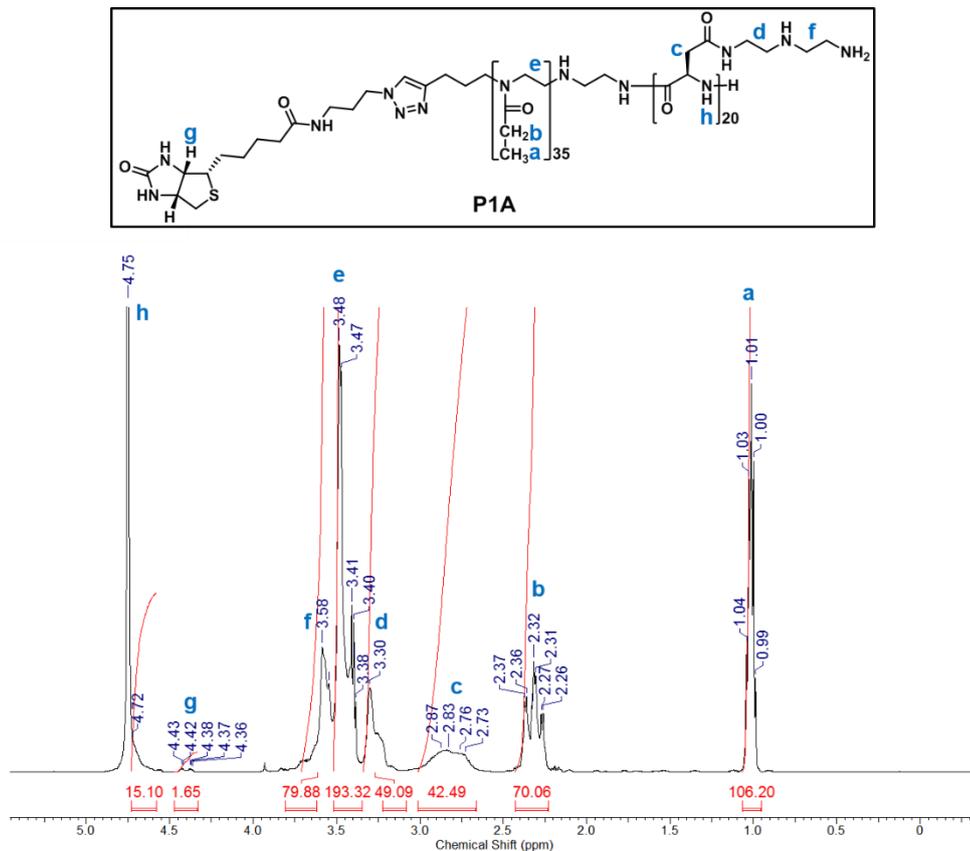


Abbildung 66 ¹H-NMR-Spektrum des Biotin-modifizierten Blockkationers P1A in D₂O.

Es wurden keine aromatischen Signale im Tieffeld beobachtet, was die Aminolyse der Seitenkette mit DET belegt. Die neuen Signale *d* und *f* mit der chemischen Verschiebung von 3.30 und 3.58 ppm sind auf die Einführung der DET-Seitenkette zurückzuführen und bestätigten somit den Erfolg der polymeranalogen Reaktion zur Zielverbindung. Zusätzlich

wurden die IR-Spektren des Blockcopolymers **P1.1A** mit dem finalen Blockkationomer **P1A** verglichen (Abbildung 67).

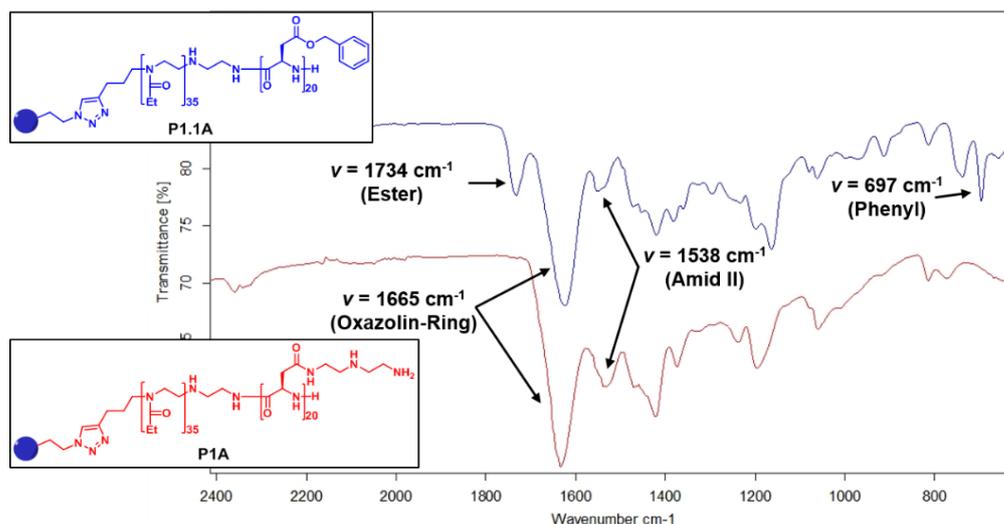


Abbildung 67 Vergleich der IR-Spektren des Biotin-modifizierten Blockcopolymers **P1.1A** (blau) und des Biotin-modifizierten Blockkationomers **P1A** (rot).

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Bande für die Ester-Gruppe bei 1734 cm^{-1} im roten Spektrum des finalen Blockkationomers **P1A** und die Bande für die Phenyl-Gruppe bei 697 cm^{-1} im blauen IR-Spektrum (**P1.1A**) nicht vorhanden waren. Dieses Ergebnis lieferte ein weiteres Indiz für eine erfolgreiche Umsetzung mit DET. Im Folgenden wurden die analytischen Daten der Biotin-modifizierten Blockkationomere **P1A** und **P1B** und des Referenzpolymers PEtOx₄₄-b-P[Asp(DET)]₃₁ (**P2**) ohne Biotin-Einheit tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 11).

Tabelle 11 Analytische Daten der Biotin-modifizierten Blockkationomere PEtOx_n-b-P[Asp(DET)]_m (**P1A**, **P1B**) und des Referenzpolymers **P2**.

No.	n ^{a)}	m ^{a)}	n/m	M _n ^{a)} [g/mol]	M _n ^{b)} [g/mol]	Đ ^{b)}	Ausbeute [%]
P1A	35 (40)	20 (25)	1.8	7 968	14 000	1.10	41
P1B	40 (40)	22 (25)	1.8	8 869	14 020	1.12	40
P2	44 (40)	31 (25)	1.4	10 707	12 490	1.09	46

a) Polymerzusammensetzung und Molmasse wurden mittels ¹H-NMR-Spektroskopie in D₂O und Endgruppenanalyse bestimmt, die theoretisch eingesetzten Äquivalente sind in Klammern angegeben; b) Molmasse M_n und Polydispersitätsindex Đ wurden über die GPC-Analyse bestimmt (PMMA Standards in DMF/5 mg/mL LiBr);

Die finalen Blockkatiomere **P1A** und **P1B** wurden mittels Dialyse gereinigt und als farblose Feststoffe in moderaten Ausbeuten 40-41% erhalten. Die Polydispersitätsindices (\bar{D}) von 1.10 und 1.12 deuteten auf eine erfolgreiche polymeranaloge Aminolyse ohne inter- oder intramolekulare Reaktionen hin. Es wurde ein Blocklängenverhältnis von 1.8 für beide Blockkatiomere berechnet und die Molmassen betragen 8 kDa für **P1A** und 9 kDa für **P1B**. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Blockkatiomere **P1A** und **P1B** in den folgenden Abschnitten als identische Polymere mit der Bezeichnung **P1** betrachtet. Kupfersulfat diente als Katalysator in der vorangegangenen Click-Reaktion zwischen der endständigen Alkin-Gruppe des Blockcopolymers und des Biotin-Azid-Derivats. Obwohl eine Dosis von Kupfersulfat von 13 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$ für einen erwachsenen Menschen unbedenklich ist, können größere Mengen von Kupfer zytotoxisch sein. Eine Menge von $220.5 \pm 23.8 \mu\text{g}/\text{mL}$ an Kupfersulfat verursacht eine 50%ige Reduktion der Zellviabilität in HepG₂-Zellen und stellt damit die letale Dosis (LD_{50}) dar.^[202] Aus diesem Grund wurden ICP-Messungen und Elementaranalysen gemacht, um den Kupfergehalt in den Blockkatiomeren festzustellen. Die ICP-Messungen ergaben einen Kupfergehalt von 40 ppm, während die Elementaranalyse einen ähnlichen Wert von 60 ppm Kupfer-Gehalt in dem Blockkatiomer **P1A** lieferte. Da es sich lediglich um geringe Spuren von Kupfer handelte, die keine toxischen Auswirkungen haben sollten, wurden die Blockkatiomere **P1A** und **P1B** im Weiteren als nicht-virale Genvektoren für den pDNA-Transport eingesetzt. Zusätzlich wurden die Blockkatiomere in dem folgenden Abschnitt in einem CCK-Assay auf Zytotoxizität in HEK293 Zellen untersucht. Um einen Vergleich zwischen den Biotin-modifizierten Polyplexmizellen und den Polyplexmizellen mit nicht-funktionalisierter Schale machen zu können, wurden die Blockkatiomere **P1A** und **P1B** mit dem Referenzpolymer **P2** verglichen. **P2** hat mit 40 PEtOx-Wiederholungseinheiten und 31 P[Asp(DET)]-Repetiereinheiten ein Blocklängenverhältnis (n/m) von 1.4 und eine molare Masse von 11 kDa. Daher ist es gut als Referenzpolymer geeignet. Zusammenfassend wurden zwei Biotin-funktionalisierte Blockkatiomere PEtOx_n-b-P[Asp(DET)]_m erfolgreich in guten Ausbeuten in einer einfachen 4-stufigen Synthese dargestellt. Die lebende

Polymerisation ermöglichte definierte Molmassen und Blocklängen. Im folgenden Abschnitt wurden das Biotin-modifizierte Blockkatiomer **P1** und das Referenzpolymer **P2** als nicht-virale Genvektoren für die Komplexierung von Plasmid-DNA eingesetzt, um den Effekt einer Biotin-vermittelten Gentransfereffizienz im Vergleich zu einer passiven Anreicherung der Polyplexmizellen zu untersuchen.

6.3.2 Bildung und Charakterisierung von Polyplexmizellen mit einer Biotin-modifizierten PEtOx-Schale für eine rezeptorvermittelte Zellaufnahme

Das synthetisierte Blockkatiomer PEtOx_n-b-P[Asp(DET)]_m (**P1**) mit einer Biotin-Einheit am hydrophilen Polymerblock wurde als nicht-viraler Genvektor für den Transport von pDNA untersucht. Durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem Blockkatiomer und der negativ geladenen DNA wurden Polyplexmizellen gebildet und hinsichtlich ihrer Eigenschaften charakterisiert. Die Bildung der Polyplexmizellen wurde bereits im Abschnitt 4.3.2 dieser Arbeit detailliert erklärt. Alle Untersuchungen richteten sich nach den bekannten biologischen Barrieren und Hindernissen für nicht-virale Genvektoren.^[29] Die Polyplexmizellen hatten eine Biotin-funktionalisierte PEtOx-Schale, die eine rezeptorvermittelte Zellaufnahme ermöglichen sollte. Diese funktionalisierten Polyplexmizellen wurden auf ihre kolloidale Stabilität in HEPES-Puffer, in isotonischen Kochsalz-Lösungen und in wässrigen sauren Lösungen (pH 5) über eine gewisse Zeitdauer untersucht. Weiterhin war es interessant, die DNA-Bindungseffizienz des Biotin-modifizierten Blockkatiomers **P1** mit dem Referenzpolymer **P2** zu vergleichen. Bei den Untersuchungen wurden Polyplexmizellen in den N/P-Verhältnissen von 0.2-300 gebildet, um den Einfluss des zunehmenden N/P-Verhältnisses zu ermitteln. Des Weiteren wurden die Größe, Morphologie und die Oberflächenladung der Komplexe mit Biotin-Einheit und ohne Modifizierung untersucht. In Hinblick auf die Kupfer-katalysierte Click-Reaktion zur Einführung der Biotin-Gruppe, wurden zytotoxische Effekte des Blockkatiomers **P1** und der **P1**/pDNA-Polyplexmizellen ermittelt und mit dem Referenzpolymer **P2** verglichen. Neben

minimaler Zytotoxizität, ist die Freisetzung der DNA in das Zytoplasma ein wichtiger Aspekt für eine erfolgreiche Gentransfektion bzw. Genexpression. Aus diesem Grund wurde das Dissoziationsverhalten der Nanokomplexe in einer Modell-Austauschreaktion mit Heparin, als Polyanion mittels Gelelektrophorese und Fluoreszenzintensitätsmessungen untersucht. Bei den Untersuchungen wurde der Einfluss des Targeting-Liganden, Biotin studiert. Der Vergleich der beiden Komplexe war insbesondere bei der *in vitro* Untersuchung der Gentransfektionseffizienz interessant. Hierfür wurde angenommen, dass durch die rezeptorvermittelte Endozytose eine höhere Genexpression erreicht werden könnte, als durch die adsorptionsvermittelte Zellaufnahme der nicht funktionalisierten Komplexe. Die Fähigkeit eine hohe Anzahl an Zellen zu transfizieren, ist eines der wichtigsten Aspekte bei der Entwicklung von nicht-viralen Genvektoren.

Untersuchung der DNA-Bindungseffizienz des Biotin-modifizierten Blockkatiomers P1 und des Referenzpolymers P2. Eine effiziente Verpackung der DNA im Kern der Polyplexmizelle ist ein wichtiges Kriterium für eine erfolgreiche Genexpression. Damit stellt eine komplette Komplexierung der DNA durch elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Blockkatiomer **P1** den ersten Schritt zur erfolgreichen Gentransfektion dar. Die Komplexierungskraft des Biotin-modifizierten Blockkatiomers **P1** wurde in zwei unabhängigen Methoden, mittels Gelelektrophorese und einem SYBR-Green Ausschluss-Assay evaluiert. Zunächst soll auf die Ergebnisse der Gelelektrophorese eingegangen werden. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes an das Agarose-Gel, konnte die Migration der freien DNA visualisiert werden. Die Polymer/pDNA-Komplexe wandern abhängig von ihrer Größe und Ladungsdichte im Agarose-Gel. Die beiden Faktoren Größe und Ladungsdichte werden durch den Komplexierungsprozess verändert, sodass nur freie oder nicht vollständig verpackte DNA im elektrischen Feld wandern würde. Abbildung 68A zeigt das Agarose-Gel nach der Gelelektrophorese.

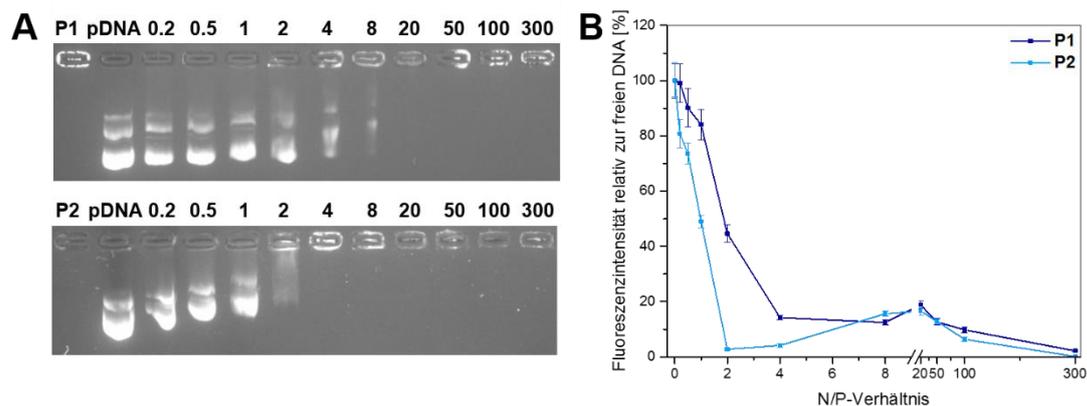


Abbildung 68 (A) Gelelektrophorese und (B) Fluoreszenzspektroskopie des SYBR-Green Ausschluss-Assays der nativen und komplexierten pDNA aus Biotin-PEtOx₃₅-b-PAsp(DET)₂₀ (**P1**) und PEtOx₄₄-b-PAsp(DET)₃₁ (**P2**) mit steigendem N/P-Verhältnis.

Die Polyplexmizellen aus dem Biotin-modifizierten Blockkatiomer **P1** und dem Referenzpolymer **P2** wurden in den N/P-Verhältnissen 0.2 bis 300 gebildet, um das N/P-Verhältnis zu ermitteln, bei der die DNA vollständig komplexiert vorlag. Bei einem N/P-Verhältnis von 4 wurde bei den Polyplexmizellen aus dem Biotin-modifizierten Blockkatiomer **P1** nur noch eine verschmierte DNA-Bande beobachtet, die bei N/P = 8 fast vollständig verschwand. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass die DNA bei einem N/P-Verhältnis von 4-8 vollständig komplexiert vorlag. Im Gegensatz dazu, komplexierte das Referenzpolymer **P2** die DNA schon ab einem N/P-Verhältnis von 2, wo ebenfalls nur noch eine leichte DNA-Bande zu sehen war. Die DNA-Bande verschwindet ab N/P = 4 vollständig. Da die Molmassen und die Polymerblocklängen der beiden Blockkatiomere nahezu identisch waren, wurde angenommen, dass die Biotin-Einheit des Polymers **P1** die Komplexierungskraft etwas herabsetzte. Dieser Effekt könnte auf mögliche elektrostatische Wechselwirkungen oder Wasserstoff-Brücken-Bindungen zwischen der Biotin-Einheit und der DNA zurückgeführt werden. Erwähnenswert dabei ist die Arbeit von *Kataoka et al.* vom Jahr 2007, in der unter anderem die Komplexierungskraft von c(RGDfK)-PEG-b-PLys mit der des nicht funktionalisierten Blockkatiomers PEG-b-PLys verglichen wurde.^[203] Beide Polymere komplexierten die pDNA vollständig ab einem N/P-Verhältnis von 1.25, sodass kein Einfluss der RGD-Funktionalisierung festgestellt werden konnte.^[203]

Des Weiteren konnten die Ergebnisse der Gelelektrophorese anhand des SYBR Green Ausschluss-Assays bestätigt werden. Der Anteil der freien DNA wurde hierbei durch Messung der Fluoreszenzintensität evaluiert (Abbildung 68B). Als Negativkontrolle wurde die Polymerlösung mit SYBR Green gemischt und untersucht. Als Positivkontrolle diente die DNA-Lösung in Gegenwart des Fluoreszenzfarbstoffs. Die gemessenen Werte wurden auf die Positivkontrolle referenziert. Wie in Abbildung 68B zu sehen ist, nahm die Fluoreszenzintensität mit steigendem N/P-Verhältnis und damit mit der sukzessiven Komplexierung der DNA ab. Das Minimum der Fluoreszenzintensität wurde bei $N/P = 4$ für die Polyplexmizellen aus **P1** und bei $N/P = 2$ für die Komplexe aus **P2** erreicht. In guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Gelelektrophorese, wo die DNA-Migration jeweils bei den genannten N/P-Verhältnissen nur als verschmierte Bande visualisiert wurde, bestätigte das SYBR-Green Ausschluss-Assay die komplette Komplexierung der DNA ab $N/P = 4$ für das Biotin-modifizierte Blockkatiomer **P1** und ab $N/P = 2$ für das Referenzpolymer **P2**. Hiermit wurde die höhere DNA-Bindungseffizienz des Referenzpolymers **P2** zusätzlich bestätigt. Die Fluoreszenzintensität sank in dem Bereich von $N/P = 100-300$ auf ein zweites Minimum bei einem N/P-Verhältnis von 300. Diese Beobachtung könnte mit dem Überschuss an positiver Ladung durch die höhere Polymerkonzentration erklärt werden. Da die Effizienz der Gentransfektion auch von der Stabilität der Polyplexmizellen abhängt und die DNA nur effektiv vor Serumproteinen und Nukleasen im komplett komplexierten Zustand geschützt werden kann, wurde für alle weiteren Untersuchungen mindestens ein N/P Verhältnis von 8 verwendet.

Untersuchung der Polyplexmizellen hinsichtlich ihrer Langzeitstabilität und Stabilität in isotonischen Medien. Die Erhaltung der Bioaktivität während einer längeren Lagerzeit und in isotonischen Medien, ist eine weitere wichtige Herausforderung für die Entwicklung nicht-viraler Genvektoren. In diesem Abschnitt soll die Langzeitstabilität in HEPES-Puffer (10 mM, pH 7.4) und die kolloidale Stabilität in 50 mM und 150 mM Kochsalz-Lösung demonstriert werden. Dafür wurden Polyplexmizellen aus **P1** und **P2** in den N/P-Verhältnissen von 8 und 100 gebildet, um sowohl den Einfluss der Biotin-Einheit, als auch

des N/P-Verhältnisses zu ermitteln. Die Polyplexmizellen wurden in regelmäßigen Abständen innerhalb einer Messzeit von 4 Wochen mittels DLS-Messungen auf die Partikelgröße und mittels Fluoreszenzmessungen auf ihre Langzeitstabilität untersucht (Abbildung 69).

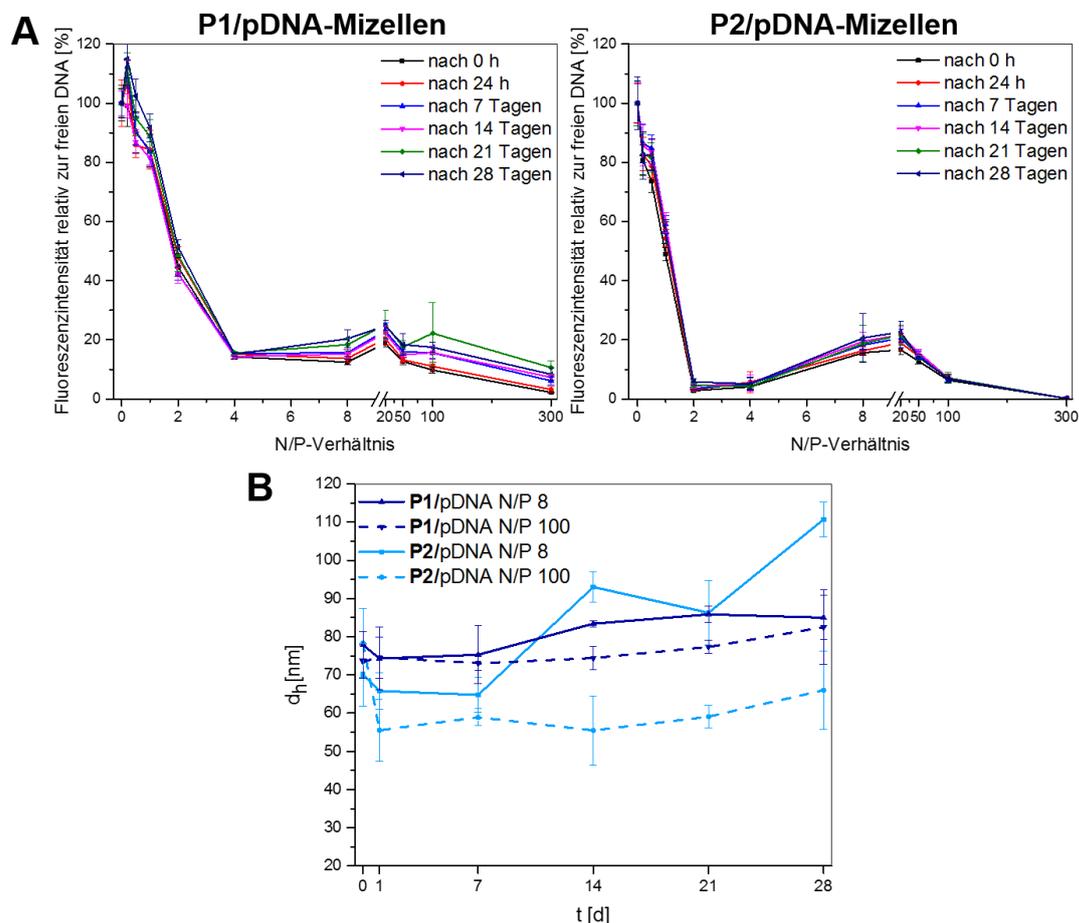


Abbildung 69 (A) Fluoreszenzspektroskopie des SYBR-Green Ausschluss-Assays und (B) DLS-Messungen der Polyplexmizellen aus **P1** und **P2** zur Ermittlung der Langzeitstabilität in HEPES-Puffer (10 mM, pH 7.4)

Ein Zerfall der Polyplexmizellen würde sich durch eine erhöhte Fluoreszenzintensität äußern, da der verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green wieder in die freie DNA interkalieren könnte. In den DLS-Messungen würde sich ein Zerfall oder Aggregation der Polyplexmizellen in einer drastischen Änderung der Partikelgröße bemerkbar machen. Abbildung 69A zeigt nahezu konstante Fluoreszenzintensitäten für alle N/P-Verhältnisse

0.2-300 in einem Zeitraum von 28 Tagen, was die Langzeitstabilität der Polyplexmizellen demonstrierte. Der Verlauf der Kurven für die Polyplexmizellen aus **P1** und **P2** unterschieden sich nur gering. Lediglich bei einem N/P Verhältnis von 100 wurde für die Biotin-funktionalisierten Polyplexmizellen eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität von $9.76 \pm 1.06\%$ auf $22.19 \pm 10.36\%$ nach 21 Tagen in HEPES-Puffer festgestellt. Die DLS-Messungen der Polyplexmizellen aus **P1** zeigten jedoch einen konstanten hydrodynamischen Durchmesser (d_h) für beide N/P-Verhältnisse von 8 und 100 in dem gemessenen Zeitraum von 28 Tagen (Abbildung 68B). Die Partikelgröße der Polyplexmizellen mit dem N/P-Verhältnis 100 betrug am Anfang der Lagerung 73.47 ± 4.34 nm. Nach 21 Tagen wurde ein hydrodynamischer Durchmesser von 77.32 ± 1.71 nm gemessen, was auf eine kolloidale Langzeitstabilität ohne Zerfall und Aggregation der Biotin-modifizierten Polyplexmizellen hinwies. Die Polyplexmizellen aus dem Referenzpolymer **P2** zeigten ein leichtes Aggregationsverhalten für ein N/P-Verhältnis von 8. Der hydrodynamische Durchmesser nahm von 70.13 ± 8.23 nm auf 93.01 ± 4.00 nm nach 14 Tagen und auf 110.68 ± 4.55 nm nach 28 Tagen zu. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Biotin-modifizierten Polyplexmizellen mit den N/P-Verhältnissen 0.2-300 exzellente kolloidale Stabilität in HEPES-Puffer für mindestens 28 Tage zeigten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde von einer guten Abschirmung der kationischen Ladungsdichte durch die neutrale PEO_x-Schale und damit einer geeigneten Schale-Kern-Mizellenstruktur ausgegangen. Die Biotin-Funktionalisierung schien dabei keinen Einfluss zu haben. In Hinblick auf die intravenöse Gabe der Gentherapie und die Salzkonzentration im Blut des Patienten, ist die Stabilität in Kochsalz-Lösungen ein wichtiges Kriterium, welches im Folgenden diskutiert werden soll. Eine mögliche Salz-induzierte Aggregation wurde anhand der Partikelgrößen der Polyplexmizellen in 50 mM und 150 mM wässriger Natriumchlorid-Lösung untersucht. Dafür wurden die Polyplexmizellen aus **P1** und **P2** mit den N/P-Verhältnissen von 8 und 100 gebildet. Abbildung 70 zeigt die DLS-Messungen des hydrodynamischen Durchmessers in regelmäßigen Abständen innerhalb der 28 Tagen Messzeit.

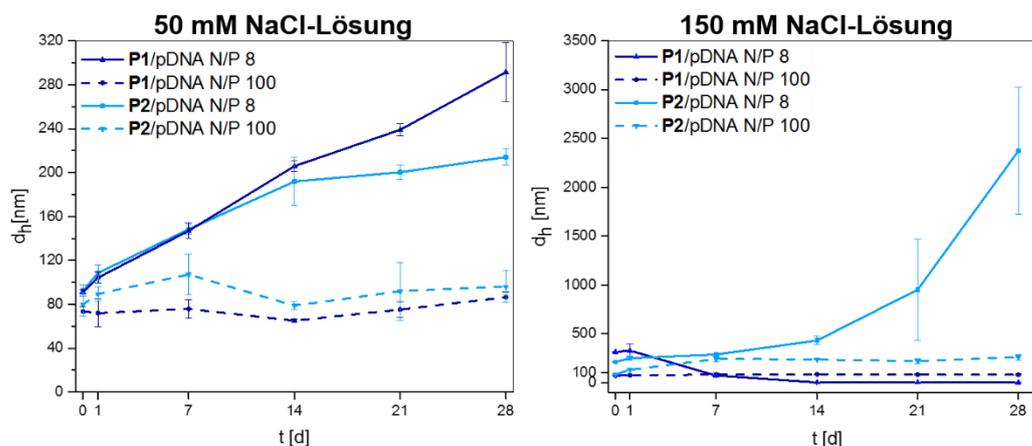


Abbildung 70 DLS-Messungen des hydrodynamischen Durchmessers der Polyplexmizellen in 50 mM (links) und 150 mM wässriger NaCl-Lösungen zur Untersuchung der Stabilität gegen Salz-induzierte Aggregation.

Die Polyplexmizellen aus **P1** und **P2** mit dem N/P-Verhältnis 100 waren in 50 mM Kochsalzlösung stabil innerhalb der Messzeit von 28 Tagen. Die Komplexe mit dem kleineren N/P-Verhältnis von 8 zeigten jedoch Aggregationsverhalten. Die Partikelgröße der Biotin-modifizierten Polyplexmizellen nahm von 91.28 ± 2.04 nm auf 291.40 ± 26.94 nm innerhalb von 28 Tagen zu. Der hydrodynamische Durchmesser der nicht funktionalisierten Polyplexmizellen verhielt sich ähnlich und nahm von 92.64 ± 5.07 nm auf 214.10 ± 7.40 nm zu. In 150 mM Kochsalz-Lösung waren lediglich die Polyplexmizellen aus dem Biotin-haltigen Blockkatiomer **P1** und dem N/P-Verhältnis von 100 stabil. Die Partikelgröße blieb innerhalb der 28 Tage nahezu konstant, während die nicht funktionalisierten Polyplexmizellen Partikelgrößen von bis zu $2 \mu\text{m}$ für N/P = 8 und 260.78 ± 29.27 nm für N/P = 100 nach 28 Tagen zeigten. Die Biotin-funktionalisierten Polyplexmizellen mit dem kleineren N/P-Verhältnis von 8 aggregierten direkt zu 314.30 ± 2.34 nm großen Partikeln und zerfielen schließlich nach nur 14 Tagen in 150 mM Kochsalz-Lösung. Die kolloidale Stabilität war also abhängig von der Salzkonzentration, des N/P-Verhältnisses und der Funktionalisierung der Oberfläche der Polyplexmizellen. Der Effekt der Salz-induzierten Aggregation wurde bereits auf Seite - 100 - erklärt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Funktionalisierung mit Biotin die Polyplexmizellen, insbesondere mit einem N/P-Verhältnis von 100, eine größere kolloidale Stabilität auswiesen. Eine mögliche Erklärung

dafür ist, dass die PEtOx-Schale der Polyplexmizellen eine größere Hydrathülle aufgrund der Biotin-Einheiten hat und somit die Wechselwirkung bzw. der Ladungsausgleich mit den Natriumchlorid-Ionen verlangsamt stattfindet.^[187]

Studien zur Morphologie, Größe und Oberflächenladung der Polyplexmizellen aus den Biotin-modifizierten Blockkatiomer P1 und den Referenzpolymer P2. Für die Zellaufnahme spielen Form, Größe und Oberflächenladung der Polyplexmizellen eine wichtige Rolle. Die Form und Größe der Komplexe wurden mittels TEM-Analysen untersucht. Der hydrodynamische Durchmesser und die Oberflächenladung wurden mithilfe von DLS- und Zetapotential-Messungen ermittelt. Abbildung 71 zeigt homogen verteilte und sphärische Polyplexmizellen, sowohl aus dem Biotin-modifizierten Blockkatiomer **P1** als auch aus dem Referenzpolymer **P2**.

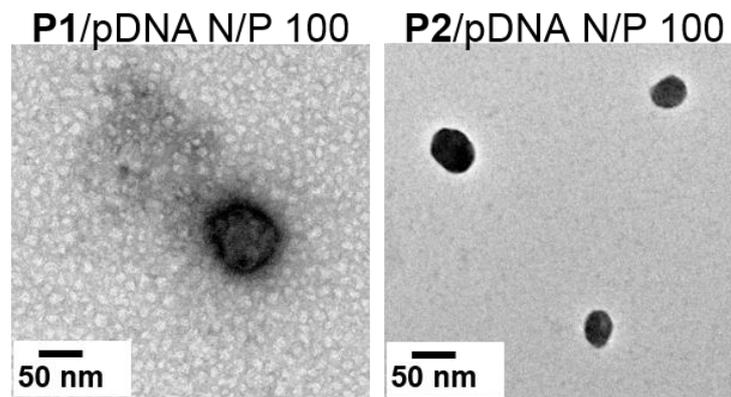


Abbildung 71 TEM-Analyse der Polyplexmizellen aus **P1** und **P2** mit einem N/P-Verhältnis von 100. Die Aufnahmen wurden angefertigt von Herrn Volker Brandt im Arbeitskreis von Prof. J. Tiller.

Die Polyplexmizellen mit dem N/P-Verhältnis von 100 hatten einen Durchmesser von ca. 50 nm. Für ein N/P-Verhältnis von 8 wurden ebenfalls homogene sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 50 nm beobachtet. Es wurde daher angenommen, dass die Form der Partikel unabhängig von der Oberflächen-Funktionalisierung mit Biotin und des N/P-Verhältnisses war. Da die TEM-Analytik eine qualitative Methode ist, wurden DLS-Messungen für die Ermittlung der Größenverteilung durchgeführt (Abbildung 72A).

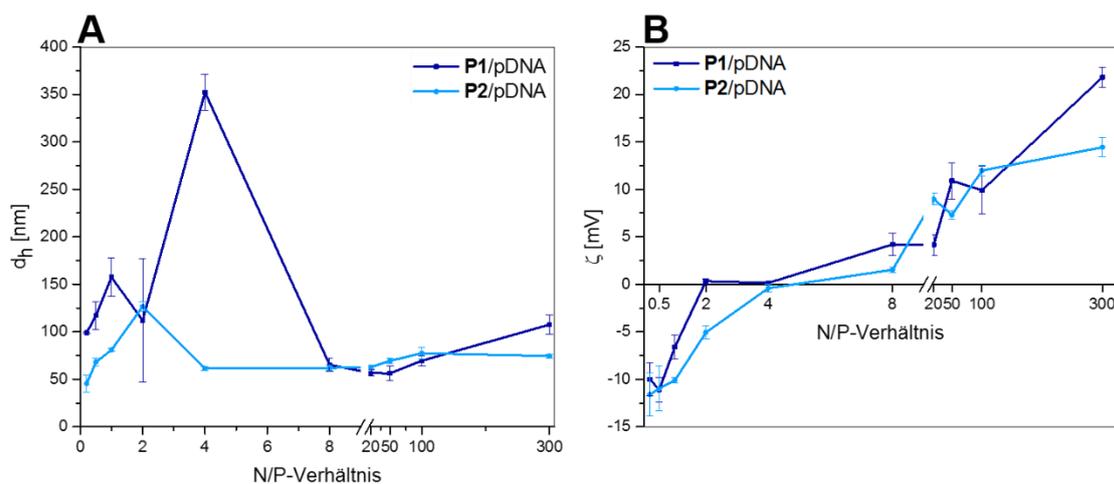


Abbildung 72 DLS-Messungen des (A) hydrodynamischen Durchmessers (d_h) und des (B) Zetapotentials der Polyplexmizellen aus **P1** und **P2** mit zunehmenden N/P-Verhältnisses.

Auf Grundlage der Untersuchungen zur Komplexierungskraft der Polymere mittels Gelelektrophorese und SYBR-Green Ausschluss-Assays war bekannt, dass die DNA ab einem N/P-Verhältnis von 4 für das Biotin-modifizierte Blockkatiomer (**P1**) und von 2 für das Referenzpolymer (**P2**) vollständig verpackt vorlag. Wie in Abbildung 72A zu sehen ist, wurde bei den genannten N/P-Verhältnissen von 4 und 2 jeweils der isoelektrische Punkt für die Komplexe aus **P1** und **P2** erreicht. Dieser Punkt der Ladungsneutralisierung durch die Komplexierung der pDNA mit den Blockkatiomeren, ist als ein Maximum in den DLS-Kurven sichtbar. Die Biotin-funktionalisierten Polyplexmizellen aus **P1** erreichten dabei einen hydrodynamischen Durchmesser von 352.20 ± 18.98 nm, gefolgt von einem Abfall der Größen auf 65.27 ± 7.07 nm. Für ein N/P-Verhältnis größer als 8 fluktuierten die Partikelgrößen um diesen Wert. Die Polyplexmizellen aus **P2** erreichten am isoelektrischen Punkt eine Partikelgröße von 126.70 ± 5.11 nm, die ebenfalls auf 61.41 ± 2.05 nm absanken und für ein N/P-Verhältnis größer als 4 um diesen Wert schwankten. Die Größen der Polyplexmizellen unterschieden sich kaum für $N/P \geq 8$, sodass von keinem Einfluss der Biotin-Einheit auf die Partikelgröße nach vollständiger Komplexierung der DNA ausgegangen wurde. Verglichen mit dem publizierten polymeren Wirkstoff-Transport-System von *Kim et al.* wurden ebenfalls keine signifikanten Größenunterschiede der

Oberflächen-funktionalisierten Systeme gefunden. Für den Biotin-funktionalisierten Wirkstoffvektor aus Graftcopolymeren basierend auf Polysuccinimid (PSI) wurde ein Durchmesser von 310 nm berichtet, während der nicht funktionalisierte Vektor eine Größe von 290 nm aufwies.^[186] Weiterhin soll erwähnt werden, dass die mit den DLS-Messungen ermittelten Größen gut mit der Größenbestimmung mittels der TEM-Analyse übereinstimmen. Die Biotin-funktionalisierten Polyplexmizellen mit einem Durchmesser von ca. 65 nm befinden sich in einem optimalen Größenbereich für Gen- und Wirkstofftransport, da sie gut über die Endozytose aufgenommen werden können. Für die Zellaufnahme spielt auch die Oberflächenladung eine wichtige Rolle. Aufgrund der negativ geladenen Zellmembran, werden leicht positiv geladene Komplexe besser aufgenommen. Komplexe mit einer hohen positiven Ladungsdichte führen allerdings zur Destabilisierung der Zellmembran und somit zu zytotoxischen Effekten.^[29] Die DLS-Messungen zeigten für die Komplexe aus **P1** und **P2** eine stetige Zunahme des Zetapotentials von negativen zu positiven Werten mit steigendem N/P-Verhältnis (Abbildung 72B). Entsprechend der maximalen Partikelgröße bei N/P = 4 für **P1**/pDNA- und N/P = 2 für **P2**/pDNA-Komplexe, wurden bei diesen N/P-Verhältnissen nahezu neutrale Partikel gemessen, was die Tendenz zur Aggregatbildung erklärt. Im Bereich von N/P = 8-20 fluktuierte die Oberflächenladung der Biotin-funktionalisierten Polyplexmizellen um +4 mV. Diese leicht positive Oberflächenladung bestätigte eine hervorragende Abschirmung der kationischen Ladung durch die neutrale PEtOx-Hülle. Für das hohe N/P-Verhältnis von 300, stieg das Zetapotential auf einen Wert von 21.80 ± 1.08 mV. Die nicht funktionalisierten Polyplexmizellen hatten eine weniger positive Oberflächenladung von 14.43 ± 0.99 mV bei dem hohen N/P-Verhältnis von 300. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde angenommen, dass die Oberflächenfunktionalisierung mit Biotin die Abschirmung der kationischen Ladungsdichte bei einem N/P-Verhältnis von 300 negativ beeinflusst. In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, dass *Kataoka* et al. keinen Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung mit cyclischen RGD-Peptiden weder auf die Größe noch auf das Zetapotential der Polyplexmizellen beobachten konnten.^[203] Ungeachtet dessen

zeigten die Biotin-funktionalisierten Polyplexmizellen mit N/P-Verhältnissen zwischen 8 und 100 gute Voraussetzungen für eine effiziente Zellaufnahme mit 65 nm großen Partikel und einer leicht positiven Oberflächenladung von 4 mV. Darüber hinaus verfügten die Polyplexmizellen über eine Schale-Kern-Mizellenstruktur mit einer neutralen PEtOx-Palisade zur effektiven Abschirmung der kationischen Ladung im Bereich $N/P = 8-100$.

Untersuchungen der pH-Sensitivität der Polyplexmizellen im sauren Medium. Der Gentransport wird vermutlich auf endosomalen Weg realisiert. Hierbei begünstigt die Abnahme des pH-Wertes von 7.4 auf 5.5 den endosomalen Austritt der pH-sensitiven Polyplexmizellen. Dabei spielen sowohl der osmotische Druck als auch die Destabilisierung der endosomalen Membran durch kationische Ladungen eine wichtige Rolle. Bei der Entwicklung der nicht-viralen Genvektoren ist es notwendig zu beachten, dass die Membran-destabilisierende Wirkung durch kationische Ladungen außerhalb des Endosoms reduziert wird. Dieses Verhalten kann durch die Verwendung von pH-empfindlichen Seitenketten, wie DET und einer guten Abschirmung der kationischen Ladung durch eine neutrale Hülle, wie PEtOx, erreicht werden. Die Ethylendiamin-Einheit im P[Asp(DET)]-Polymerblock ist dafür bekannt, eine zwei-stufige Protonierung unter einer gewissen *Gauche-Anti*-Konformationsänderung einzugehen. Damit verbunden wird eine effektive Puffer-Funktion in saurer endosomaler Umgebung bei pH 5.^[121,122] Um das Verhalten der Biotin-funktionalisierten Polyplexmizellen zu untersuchen, wurden DLS-Messungen des hydrodynamischen Durchmessers der Komplexe mit $N/P = 8$ und $N/P = 100$ in einem pH 5 sauren Puffer durchgeführt (Abbildung 73).

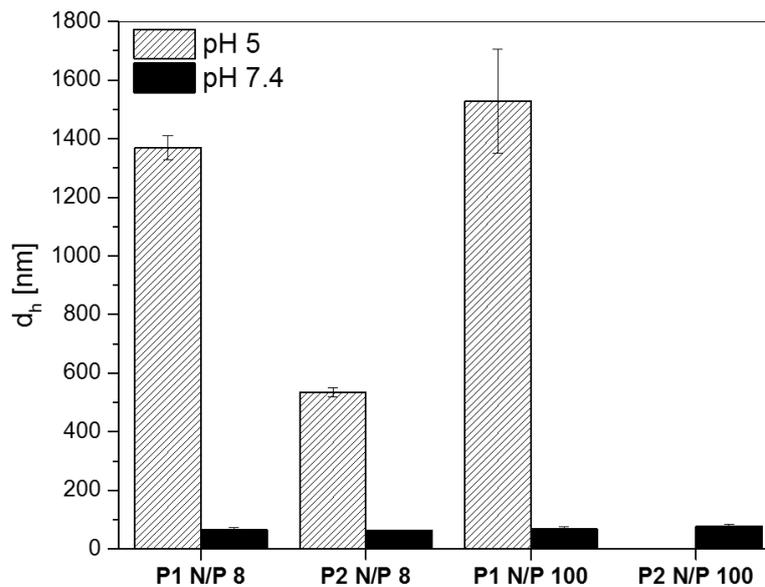


Abbildung 73 DLS-Messungen zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers (d_h) der Polyplexmizellen aus **P1** und **P2** in Puffer-Lösungen mit pH 5 und pH 7.4.

Die Polyplexmizellen aus **P1** und **P2** hatten sowohl mit dem N/P-Verhältnis von 8 als auch von 100 in pH-neutraler Puffer-Lösung Partikelgrößen zwischen 60 und 77 nm. In endosomal-saurem Medium (pH 5) nahmen die Biotin-funktionalisierten Polyplexmizellen eine Größe von über 1 μm an. Diese Tendenz zur Bildung von großen Partikeln wurde für beide N/P-Verhältnisse gleichermaßen beobachtet. Die **P2**/pDNA-Komplexe mit N/P = 8 bildeten in pH 5 saurer Puffer-Lösung Komplexe mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 534.50 ± 15.42 nm. Für N/P = 100 konnten keine Partikel gemessen werden, sodass eine Dissoziation der Polyplexmizellen vermutet wurde. Auf Grundlage dieser Ergebnisse, ist zu erkennen, dass durch die Einführung der Biotin-Einheit deutlich größere Partikel in endosomal-saurer Umgebung erhalten wurden, die in Gegensatz zu nicht-funktionalisierten Partikel keinen Zerfall zeigten. Die Größenzunahme kann auf die Zweifach-Protonierung der DET-Seitenkette und der damit verbundenen erhöhten Ladungsdichte zurückgeführt werden. Durch die Zweifach-Protonierung wird die intramolekulare Repulsion innerhalb der Ethylendiamin-Einheit erhöht, sodass es zur Ausweitung der Polymerketten und zur Quellung der Polyplexmizellen kommt (Abbildung 44).^[100] Diese Größenzunahme und die ermittelte Stabilität in endosomal-saurer

Umgebung der Biotin-funktionalisierten Polyplexmizellen ist förderlich für einen effizienten endosomalen Austritt.

Untersuchungen der Polyplexdissoziation in einer Austauschreaktion mit Heparin als Modellanion. Für den Einsatz des Biotin-modifizierten Blockkationomers (**P1**) als nicht-viraler Genvektor, wurde die Freisetzung der DNA aus der Polyplexmizelle untersucht. Dafür wurden Polyplexmizellen in den N/P-Verhältnissen von 8 und 100 gebildet und einer Austauschreaktion mit Heparin, als Modellanion für anionische Biomakromoleküle, ausgesetzt. Die Freilassung der DNA aus dem Komplex wurde mittels Gelelektrophorese visualisiert und mithilfe von Fluoreszenzintensitätsmessungen des SYBR Green Fluoreszenzfarbstoffs detektiert. Zunächst soll auf die Ergebnisse der Gelelektrophorese eingegangen werden (Abbildung 74).

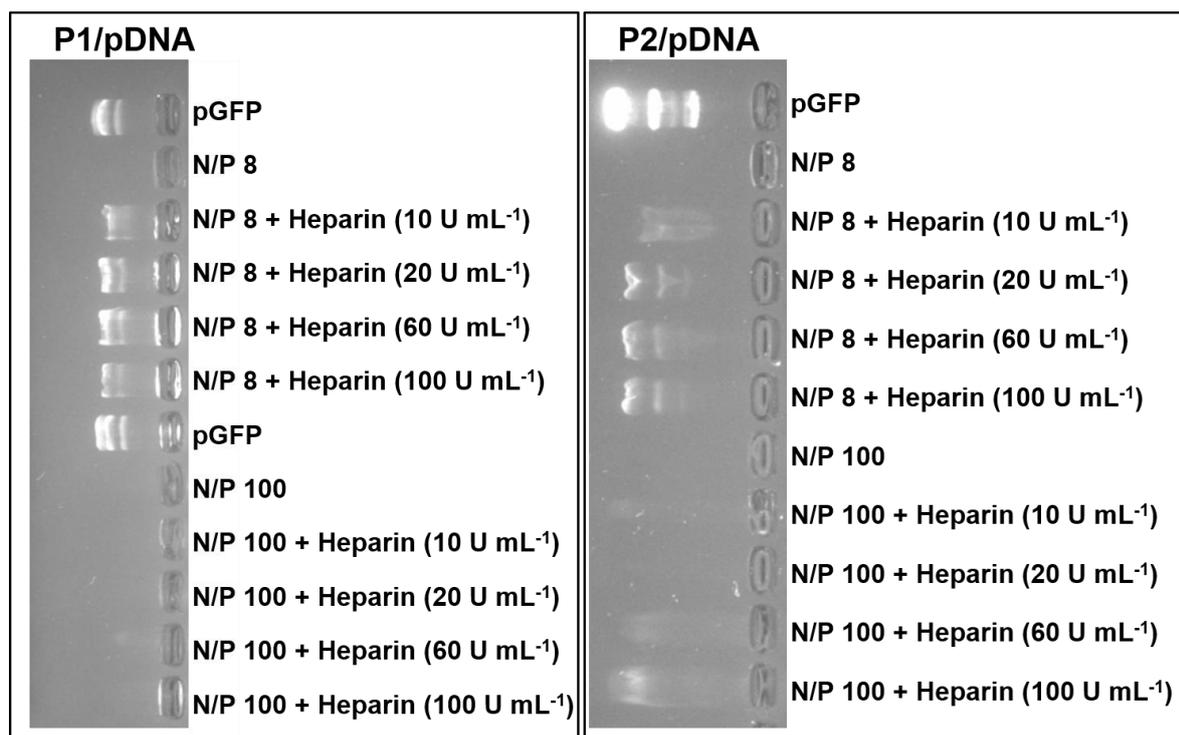


Abbildung 74 Untersuchung der Freisetzung der DNA aus den Polyplexmizellen mit N/P = 8 und N/P = 100 in einer Austauschreaktion mit Heparin mittels Gelelektrophorese.

Bei beiden Polyplexmizellen mit dem N/P-Verhältnis von 8 wurde bei einer Heparin-Konzentration von 10 U mL^{-1} eine verschmierte DNA-Bande beobachtet, die auf eine noch intakte Wechselwirkung mit der DNA hinweist. Erst ab einer Konzentration von 20 U mL^{-1} , wurde die DNA aus den Polyplexmizellen gleichermaßen aus **P1** und **P2** vollständig freigesetzt, sodass die Migration der nativen DNA im Agarose-Gel sichtbar war. Bei den Biotin-modifizierten Polyplexmizellen mit einem N/P-Verhältnis von 100 wurde selbst bei einer Konzentration von 100 U mL^{-1} Heparin keine DNA-Bande im Agarosegel beobachtet. Im Gegensatz dazu, wurde bei den **P2**/pDNA-Komplexen eine verschmierte DNA-Bande bei einer Heparin-Konzentration von 60 U mL^{-1} ermittelt. Diese Ergebnisse konnten erfolgreich mittels Fluoreszenzspektroskopie belegt werden (Abbildung 75).

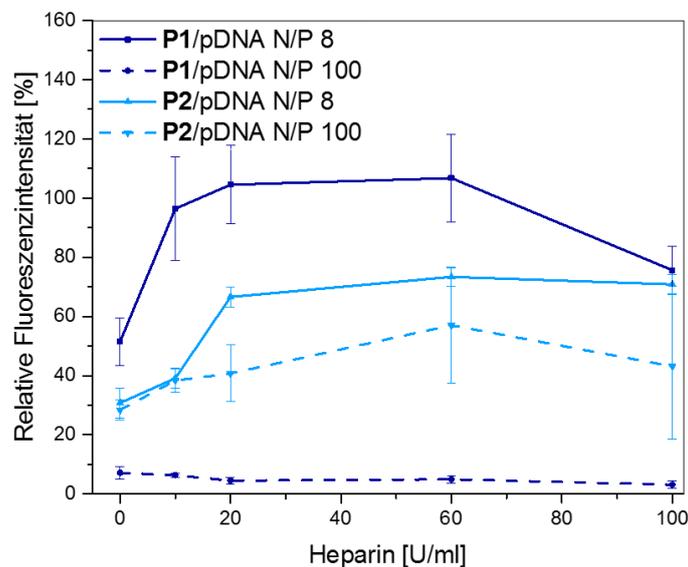


Abbildung 75 Untersuchung der Freisetzung der DNA aus den Polyplexmizellen mit N/P = 8 und N/P = 100 in einer Austauschreaktion mit Heparin mittels Fluoreszenzintensitätsmessungen.

Hierfür wurde die DNA, genau wie bei dem SYBR Green Ausschluss-Assay, mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green angefärbt. Nach Inkubation mit Heparin in den jeweiligen Konzentrationen, wurde die Fluoreszenzintensität gemessen. Die Freisetzung der DNA würde die Interkalation des Farbstoffs in die Doppelhelix ermöglichen, was eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität zur Folge hätte. In guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen

aus der Gelelektrophorese wurde eine Zunahme der Fluoreszenzintensität für die Polyplexmizellen mit einem N/P-Verhältnis von 8 ab einer Heparin-Konzentration von 10 U mL^{-1} für **P1** und 20 U mL^{-1} für **P2** beobachtet. Ebenso wurde für **P2/pDNA**-Komplexe mit einem N/P-Verhältnis von 100 ab einer Heparin-Konzentration von 60 U mL^{-1} ein leichter Anstieg der Fluoreszenzintensität detektiert. Aufgrund dieses Ergebnisses und der leicht verschmierten DNA-Bande im Agarosegel wurde von keiner vollständigen DNA-Freisetzung ausgegangen. Dennoch schienen die Biotin-funktionalisierten Polyplexmizellen mit dem N/P-Verhältnis von 100 stabiler gegenüber dem Polyanion Heparin zu sein, was auf eine stärkere Komplexierungskraft des Biotin-modifizierten Blockkatiomers (**P1**) bei $\text{N/P} = 100$ hindeutete.

Zytotoxizitäten der Blockkatiomere in Abwesenheit und als Komplex mit DNA. Eine hohe Zytokompatibilität ist ein wichtiges Kriterium für *in vitro* und *in vivo* Anwendungen von Blockkatiomeren als nicht-virale Genvektoren. Aus diesem Grund wurde das Biotin-funktionalisierte Blockkatiomer **P1** und die **P1/pDNA**-Polyplexmizellen in einem gängigen CCK-Zellviabilität-Assay auf ihre Zytotoxizität untersucht (Abbildung 76).

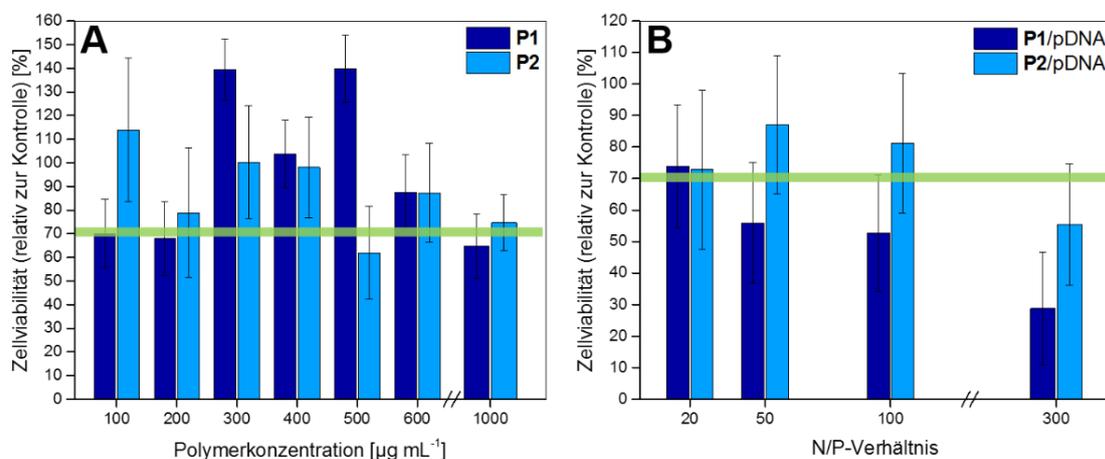


Abbildung 76 Zellviabilität-Assay in HEK293 Zellen mit (A) dem Biotin-funktionalisierten Blockkatiomer **P1** und dem Referenzpolymer **P2** und (B) den Polyplexmizellen aus **P1** und **P2**.

Die Auswertung des Zellviabilität-Assay demonstrieren, dass die beiden Blockkatiomere **P1** und **P2** in allen untersuchten Konzentrationen eine relative Zellviabilität von über 70%

hatten und damit selbst in hohen Konzentrationen von 1 mg mL^{-1} nicht zelltoxisch waren. Dieses Ergebnis belegt zusätzlich, dass die gemessene Menge an Kupfersulfat im zytokompatiblen Spurenbereich lag. Die Polyplexmizellen aus dem Referenzpolymer **P2** zeigten keine toxischen Effekte in HEK293 Zellen, selbst bei einem hohen N/P-Verhältnis von 300. Die Polyplexmizellen mit der Biotin-funktionalisierten PEtOx-Schale verursachten eine Abnahme der Zellviabilität mit steigendem N/P-Verhältnis. Diese betrug bei N/P = 300 nur $29 \pm 18\%$. Dieses Ergebnis kann vermutlich mit der relativ hohen positiven Oberflächenladung von $21.80 \pm 1.08 \text{ mV}$ bei N/P = 300 der funktionalisierten **P1**/pDNA-Komplexe zusammenhängen. In diesem Fall konnte bereits beobachtet werden, dass die Abschirmung der kationischen Ladungen durch die Oberflächenmodifikation mit Biotin-Molekülen reduziert wird. So können zytotoxische Effekte durch Destabilisierung der Zellmembran wegen der erhöhten positiven Ladungsdichte hervorgerufen werden. Studien mit Biotin-funktionalisierten polymeren Wirkstoff-Transport-Systemen von Doxorubicin oder Paclitaxel-Kurkumin erzielten ähnliche Ergebnisse.^[186,188] Bei der Untersuchung der polymeren Transportsysteme ohne Wirkstoff, hatten Biotin-funktionalisierte Polymere eine ähnlich gute Zellviabilität wie die nicht funktionalisierten Referenzpolymere. Die Wirkstoff-beladenen Systeme unterschieden sich dagegen signifikant. Die Biotin-modifizierten Transportsysteme zeigten eine deutlich niedrigere Zellviabilität aufgrund der höheren Zellaufnahme und damit verbunden der höheren Wirkstoffdosis in den Zellen.^[186,188] Dieser Zusammenhang könnte auch auf die hier beobachtenden Ergebnisse zutreffen. Möglicherweise führte die Oberflächen-Funktionalisierung mit Biotin zu einer höheren Zellaufnahme und damit zu einer höheren Akkumulation von pDNA, was folglich in reduzierter Zellviabilität resultierte.

Untersuchung der *in vitro* Gentransfektionseffizienz in HEK293 Zellen. Neben minimaler Zytotoxizität, ist eine hohe Gentransfektionseffizienz ein entscheidendes Kriterium für erfolgreiche Proteinexpression. Für die Untersuchung der *in vitro* Gentransfektionsaktivität wurde das eGFP exprimierende Plasmid (peGFP) mit **P1** und **P2** in den N/P-Verhältnissen 20-300 komplexiert. Die Transfektion in HEK293 Zellen wurde qualitativ mit dem

Fluoreszenzmikroskop und quantitativ mithilfe von Durchflusszytometrie untersucht. Abbildung 77 zeigt die Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen der mit **P1**/peGFP- und **P2**/peGFP-Komplexen transfizierten Zellen.

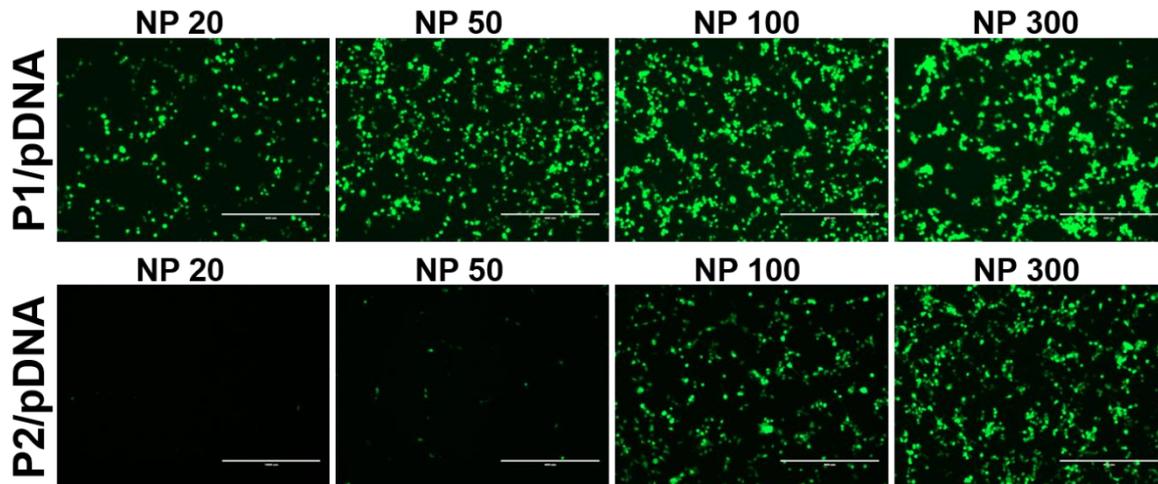


Abbildung 77 Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen der mit **P1**/peGFP- und **P2**/peGFP-Komplexen transfizierten HEK293 Zellen nach 48 h Inkubationszeit.

Die Anzahl der eGFP-positiven Zellen stieg mit steigendem N/P-Verhältnis. Die Mikroskopieaufnahmen zeigen deutlich, dass die Biotin-funktionalisierten Polyplexmizellen bereits ab einem N/P-Verhältnis von 20 eine moderate Anzahl an Zellen transfizierten. Im Gegensatz dazu, waren die Polyplexmizellen aus dem Referenzpolymer **P2** erst ab einem N/P-Verhältnis von 100 in der Lage Zellen zu transfizieren. Um die erfolgreiche Steigerung der Transfektionseffizienz durch die Einführung eines aktiven Liganden zusätzlich zu demonstrieren, wurden Durchflusszytometrie-Messungen durchgeführt (Abbildung 78).

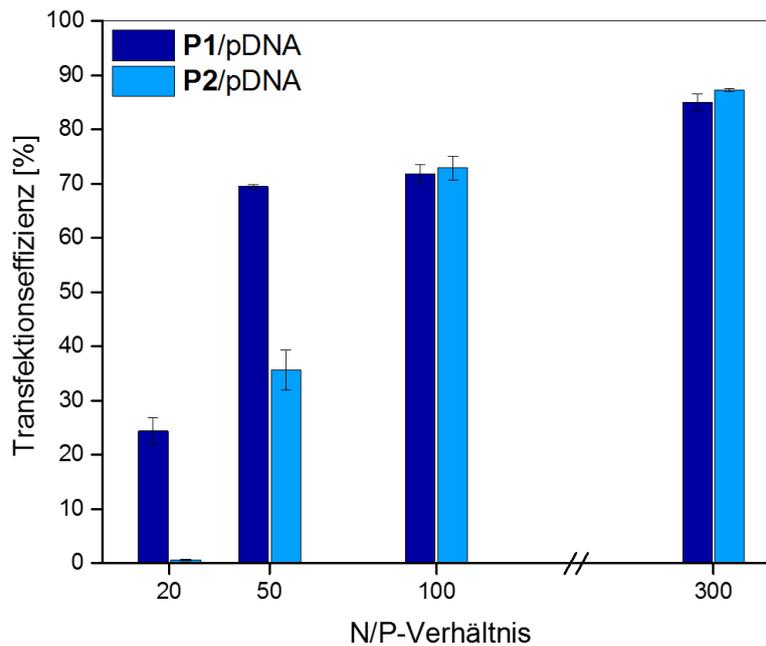


Abbildung 78 Durchflusszytometrie-Messungen der transfizierten HEK293 Zellen mit **P1**/peGFP- und **P2**/peGFP-Komplexen nach 48 h Inkubationszeit.

Die quantitative Analyse der Gentransfektionseffizienz mithilfe des Durchflusszytometers stimmte gut mit den qualitativen Ergebnissen mittels Fluoreszenzmikroskopieanalysen überein. Während die Polyplexmizellen mit der Biotin-Einheit bei einem N/P-Verhältnis von 20 $24.40 \pm 2.41\%$ der HEK293 Zellen transfizierten, wurden nur $0.67 \pm 0.15\%$ transfizierte Zellen mit **P2**/peGFP-Komplexen gefunden. Auch bei einem N/P-Verhältnis von 50 zeigten die Oberflächen-funktionalisierten Polyplexmizellen eine höhere Gentransfektionsaktivität von $69.45 \pm 0.43\%$. Im Gegensatz dazu waren mit **P2**/peGFP-Mizellen nur $35.68 \pm 3.66\%$ GFP-positive Zellen. Bei den höheren N/P-Verhältnissen nahm die Gentransfektionseffizienz von **P1**/peGFP- und **P2**/peGFP-Komplexen nahezu gleiche Werte von 72% für N/P = 100 und 86% für N/P = 300 an.

In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, dass serumhaltige Zellmedien oft einen negativen Effekt auf die Transfektionsaktivität ausüben. Das hängt damit zusammen, dass das Serum aus anionischen Proteinen besteht, welche mit dem Blockkatiomer wechselwirken und sich auf den Polyplexmizellen abscheiden können. Solche

Wechselwirkungen sind insbesondere mit stark positiv geladenen Polyplexmizellen ausgeprägt und führen zu reduzierter Endozytose und Gentransfektionseffizienz. Aus diesem Grund wurde die Gentransfektionsaktivität der Polyplexmizellen aus **P1** und **P2** in serumhaltigen und serumfreien DMEM-Zellmedium verglichen (Abbildung 79).

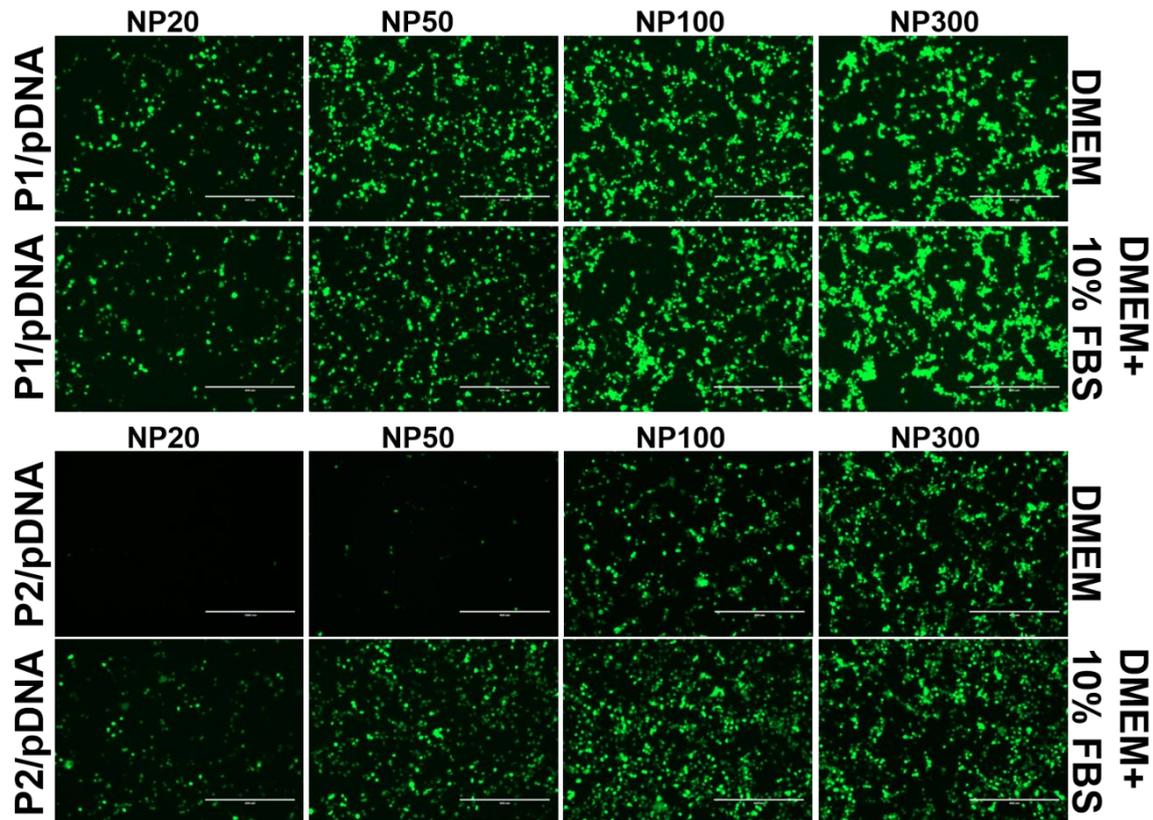


Abbildung 79 Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen der transfizierten HEK293 Zellen mit Polyplexmizellen aus **P1** und **P2** in serumfreiem und serumhaltigem DMEM-Zellmedium nach 48 h Inkubationszeit.

Die Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen zeigen deutlich, dass die Gentransfektionseffizienz der Polyplexmizellen aus **P1** und **P2** in Gegenwart von Serumproteinen nicht inhibiert oder eingeschränkt wurde. Insbesondere bei den transfizierten HEK293 Zellen mit **P1**/pDNA-Komplexen konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der GFP-positiven Zellen in DMEM und DMEM+10% FBS beobachtet werden. Bei den transfizierten Zellen mit **P2**/pDNA-Komplexen wurde sogar ein gegenteiliger Effekt beobachtet. Die Anzahl der GFP-positiven Zellen war in serumhaltigem DMEM-Medium qualitativ höher, als in serumfreiem.

Im serumhaltigen Zellmedium wurden sogar transfizierte HEK293 Zellen ab einem N/P-Verhältnis von 20 anstelle von 100 beobachtet. Diese Ergebnisse wurden zusätzlich mit der Messung der Fluoreszenzintensitäten der GFP-positiven Zellen in den unterschiedlichen Medien bestätigt (Abbildung 80).

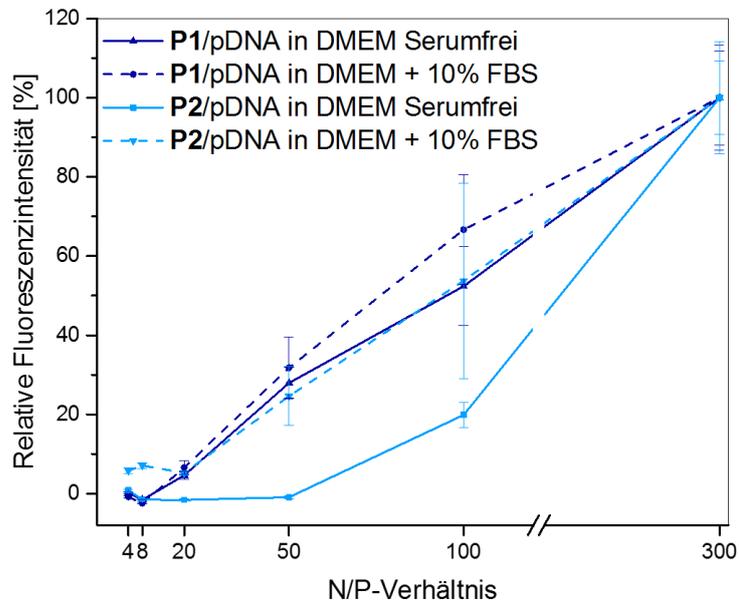


Abbildung 80 Relative Fluoreszenzintensitäten der GFP-positiven Zellen mit **P1/pDNA** und **P2/pDNA**-Komplexen nach 48 h Inkubation in serumfreien und serumhaltigen DMEM-Medium.

Die Fluoreszenzintensitäten der HEK293 Zellen mit den Biotin-modifizierten Polyplexmizellen stieg ab einem N/P-Verhältnis von 20 nahezu identisch in serumfreien und serumhaltigen DMEM-Medium. Der Anstieg der Intensitäten verdeutlicht die Zunahme der Anzahl der transfizierten Zellen mit steigendem N/P-Verhältnis. Die Zellen der nicht modifizierten Polyplexmizellen zeigten erst ab einem N/P-Verhältnis von 20 eine Zunahme der Fluoreszenzintensitäten in serumhaltigen und ab N/P = 50 in serumfreien Zellmedium. Diese Ergebnisse stimmten sehr gut mit den Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen überein und verdeutlichten den schützenden Effekt der hydrophilen und neutralen PEtOx-Schale. Sowohl die Biotin-modifizierten, als auch nicht modifizierten Polyplexmizellen zeigten eine hervorragende Serumkompatibilität. Auch PEGylierte Blockkationomere zeigen keine Reduktion der Gentransfektion in serumhaltigen Zellmedien, jedoch eine verringerte

Zellaufnahme aufgrund der abschirmenden Wirkung.^[22,128] Im Vergleich dazu konnten wir in diesem Abschnitt die Steigerung der Zellaufnahme bzw. Gentransfektionseffizienz durch die Modifizierung mit dem aktiven Liganden Biotin demonstrieren und das „PEG-Dilemma“ erfolgreich umgehen.

6.4 Zusammenfassung

In einer neuen und einfachen vier-stufigen Synthese konnten zwei Blockkationomere mit einer Biotin-Einheit als Ligand für aktives Targeting in Krebszellen hergestellt werden. Das in drei Stufen synthetisierte Biotin-Azid-Derivat wurde in einer Kupfer-katalysierten Click-Reaktion polymeranalog in das Blockkationomer mit der Struktur Biotin-PEtOxn-b-P[Asp(DET)]m eingeführt. Die hydrophile PEtOx-Einheit und das kationische P[Asp(DET)]-Segment wurden mit definierten Blocklängen (n, m) und kontrollierten Molmassen dargestellt und mittels ¹H-NMR-Spektroskopie, IR- und GPC-Analysen vollständig charakterisiert. Abbildung 81 zeigt die Polymerstrukturen und Eigenschaften der erfolgreich synthetisierten Blockkationomere mit Biotin als Targeting-Molekül.

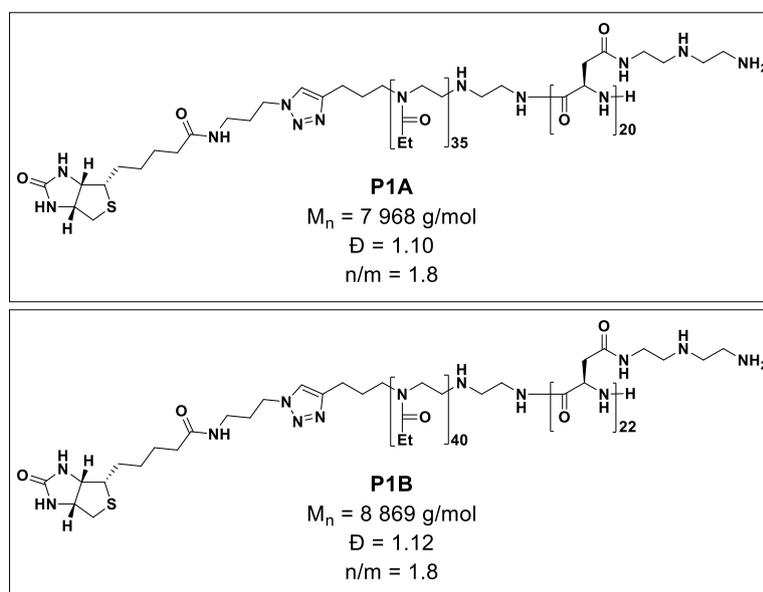


Abbildung 81 Synthetisierten Biotin-funktionalisierten Blockkationomere **P1A** und **P1B** und ihre analytischen Daten.

Die synthetisierten Blockkationomere bildeten mit Plasmid-DNA Polyplexmizellen in einer Schale-Kern-Architektur, wobei die Oberfläche mit Biotin-Einheiten funktionalisiert vorlag.

Abbildung 82 fasst die Ergebnisse mit den Biotin-modifizierten Polyplexmizellen dar.

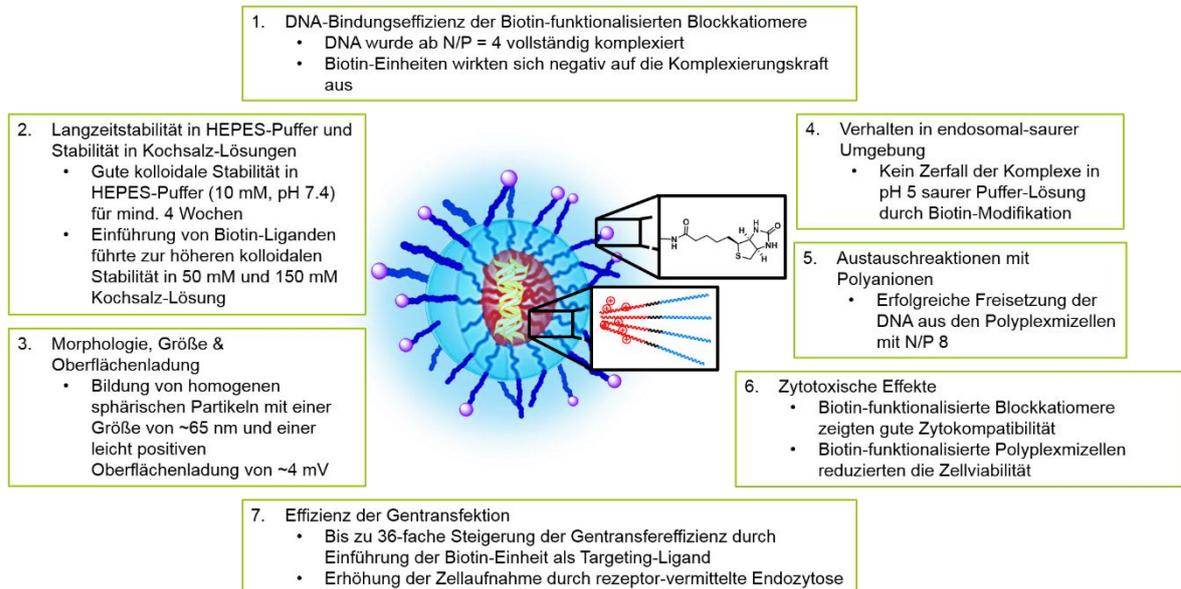


Abbildung 82 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse mit Biotin-funktionalisierten Polyplexmizellen.

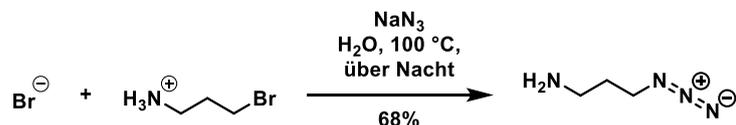
Die Biotin-modifizierten Polyplexmizellen bildeten homogene, sphärische Partikel mit einem Durchmesser von ca. 65 nm und einer Oberflächenladung von +4 mV. Obwohl die Biotin-funktionalisierten Blockkationomere die pDNA erst ab einem N/P-Verhältnis von 4 anstelle von 2 vollständig komplexierten, führte die Biotin-Modifikation zu zahlreichen und in Hinblick auf erfolgreichen Gentransfer wichtigen Vorteilen. Durch die Einführung der Biotin-Einheit auf die Oberfläche der Polyplexmizellen konnte die kolloidale Stabilität in HEPES-Puffer beibehalten werden und die Stabilität in Kochsalz-Lösungen sogar signifikant gesteigert werden. In Hinblick auf extrazellulären Transport ist die Stabilität des Komplexes und damit der Schutz der DNA entscheidend. Intrazellulär ist jedoch die Dissoziation des Komplexes für die Freisetzung der DNA für eine erfolgreiche Proteinexpression gewünscht. Die Freisetzung der DNA aus den Biotin-funktionalisierten Polyplexmizellen mit N/P = 8 wurde mit einer Heparinkonzentration von 20 U mL⁻¹ erfolgreich erreicht. Die DNA-

Freisetzung aus dem Komplex mit N/P = 100 war aufgrund der höheren Komplexierungskraft leider nicht möglich. In Hinblick auf die Anwendung der Gentherapie gegen Krebserkrankungen ist die Balance zwischen minimaler Zytotoxizität und maximaler Gentransfereffizienz ein wichtiges Kriterium. Das hier synthetisierte Biotin-funktionalisierte Blockkatiomer zeigte trotz der Kupfer-katalysierten polymeranalogen Reaktion eine hervorragende Zytokompatibilität sogar in hohen Konzentrationen von 1 mg mL^{-1} . Im Gegensatz dazu wurde die Zellviabilität durch die Biotin-modifizierten Polyplexmizellen reduziert. Eine mögliche Erklärung dafür ist die positive Oberflächenladung der Komplexe ab N/P = 50. Eine weitere Annahme ist die höhere Akkumulation des Plasmids durch die rezeptorvermittelte Aufnahme mittels der Biotin-Einheit als aktiver Ligand. Die höhere Zellaufnahme wurde durch Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen und Durchflusszytometrie bestätigt. Die Gentransfereffizienz wurde durch die Einführung eines Biotin-Liganden und damit durch eine Rezeptor-vermittelte Endozytose um bis zu 36-Fache gesteigert. Durch die Schale-Kern-Mizellenstruktur und die hydrophile PEtOx-Palisade wurde die Gentransferaktivität der Biotin-funktionalisierten Komplexe durch serumhaltiges Zellmedium nicht reduziert. Als Fazit wurde festgehalten, dass die Einführung des Biotin-Liganden für aktives Targeting mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose die Gentransfereffizienz maßgeblich erhöht, während die Eigenschaften der Polyplexmizelle beibehalten wurden.

6.5 Experimentelles

6.5.1 Synthesevorschrift des Biotin-Azid-Derivats

Synthesevorschrift für die Darstellung von 3-Azidopropylamin



Die Darstellung von 3-Azidopropylamin ist literaturbekannt.^[204] 1-Bromo-3-aminopropan Hydrobromid (3.20 g, 14.62 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 10 mL demineralisiertem Wasser gelöst. Natriumazid (3.14 g, 48.24 mmol, 3.3.0 Äq.) wurde in 15 mL VE-Wasser gelöst und vorsichtig zu dem Gemisch hinzugegeben und unter Reflux über Nacht gerührt. Anschließend wurden ca. 2/3 des Wassers unter Vakuum entfernt und der Rückstand auf 0 °C gekühlt. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 50 mL Diethylether und 4 g Kaliumhydroxid. Das Kaliumhydroxid wurde portionsweise zugegeben, sodass die Temperatur 10 °C nicht überstieg. Der pH-Wert sollte dabei im alkalischen Bereich von 12-14 liegen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Diethylether extrahiert und nach Trocknen über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Produkt wurde als farbloses Öl (1.00 g, 9.99 mmol, 68%) in Diethylether erhalten.

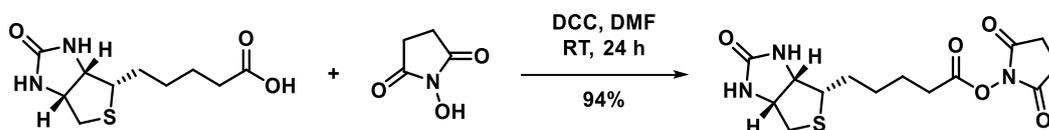
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1.73-1.76 (m, 2H, CH₂), 1.79 (bs, 2H, NH₂), 2.82 (t, J = 6.6 Hz, 2H, CH₂NH₂), 3.38 (t, J = 6.6 Hz, 2H, CH₂N₃). (OCW-IP-86_2018_05_02)

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 32.1 (CH₂), 39.2 (CH₂NH₂), 49.1 (CH₂N₃).

ESI-MS: M_{berechnet} = 100.13 [M = C₃H₈N₄]; M_{gemessen} = 101.23[M+H]⁺.

Die spektroskopischen Daten stimmten gut mit den Literaturwerten überein.^[204]

Synthesevorschrift für die Darstellung von *N*-Hydroxysuccinimidobiotin



Zu einem Gemisch aus Biotin (1.00 g, 4.09 mmol, 1.0 Äq.) und *N*-Hydroxysuccinimid (0.71 g, 6.14 mmol, 1.5 Äq.) in 40 mL DMF wurde Dicyclohexylcarbodiimid (1.10 g, 5.32 mmol, 1.3 Äq.) zugegeben und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Der gebildete Niederschlag wurde abfiltriert und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der farblose Rückstand wurde mehrfach mit Methanol und kaltem Diethylether gewaschen und anschließend unter Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (1.31 g, 3.84 mmol, 94%) erhalten.

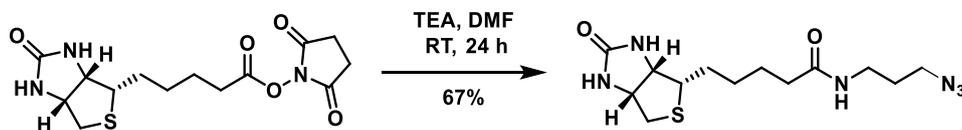
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 1.41-1.15 (m, 3H, CHCH₂), 1.61-1.67 (m, 3H, CHCH₂), 2.58 (d, J = 12.7 Hz, 1H, SCH₂), 2.67 (t, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂CO), 2.46-2.51 (m, 5H, CH₂CH₂ (succinyl), SCH₂), 3.08-3.12 (m, 1H, SCH), 4.13-4.16 (m, 1H, CH (Biotin)), 4.29-4.32 (m, 1H, CH (Biotin)), 6.36 (s, 1H, NH), 6.42 (s, 1H, NH). (OCW-IP-64_biotin-NHS rein)

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 24.3 (CH₂), 25.4 (CH₂CH₂ (succinyl)), 27.6 (CH₂), 27.8 (CH₂), 30.0 (CH₂CO), 33.3 (CH₂S), 55.2 (CHS), 59.2 (CH (Biotin)), 61.0 (CH (Biotin)), 162.7 ((HN)₂CO), 168.9 (COO), 170.3 (N(CO)₂ (succinyl)).

ESI-MS: $M_{\text{berechnet}} = 341.10$ [$M = C_{14}H_{19}N_3O_5S$]; $M_{\text{gemessen}} = 342.10[M+H]^+$.

Die spektroskopischen Daten stimmten gut mit den Literaturwerten überein.^[201]

Synthesevorschrift für die Darstellung von *N*-(3-Azidopropyl)-5-((3*aS*, 4*S*, 6*aR*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentamid



3-Azidopropylamin (281.58 mg, 2.81 mmol, 2.0 Äq.) wurde langsam zu einem Gemisch aus *N*-Hydroxysuccinimidobiotin (400.00 mg, 1.17 mmol, 1.0 Äq.) und Triethylamin (0.34 ml, 2.46 mmol, 2.1 Äq.) in 30 mL trockenem DMF gegeben. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur für 24 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO₂, MeOH/CHCl₃/CH₃COOH, 8:1:0.05) aufgereinigt. Das Biotin-Azid-Derivat wurde als farbloser, wachsartiger Feststoff (0.50 mg, 1.53 mmol, 67%) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 1.42-1.67 (8H, CH₂), 2.05 (t, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂CO), 2.56 (s, 1H, CH₂S), 2.80-2.83 (m, 1H, SCH₂), 3.06-3.11 (m, 3H, CHS, CH₂), 3.32-3.35 (m, 2H, CH₂), 4.11-4.13 (m, 1H, CH (Biotin)), 4.29-4.31 (1H, CH, Biotin)), 6.37 (s, 1H, NH (Biotin)), 6.44 (s, 1H, NH (Biotin)), 7.85 (m, 1H, NH).

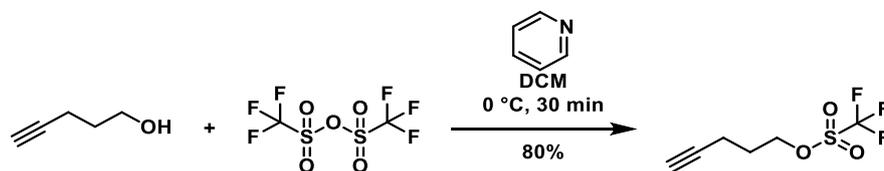
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 25.1 (CH₂), 27.9 (CH₂), 28.1 (CH₂), 28.3 (CH₂CO), 33.2 (CH₂NH), 35.1 (CH₂), 35.6 (CH₂S), 48.3 (CH₂N₃), 55.3 (CHS), 59.0 (CH (Biotin)), 60.9 (CH (Biotin)), 162.6 ((HN)₂CO).

ESI-MS: M_{berechnet} = 326.15 [M = C₁₄H₂₀N₆O₂S]; M_{gemessen} = 327.16[M+NH]⁺.

Die spektroskopischen Daten stimmten gut mit den Literaturwerten überein.^[205]

6.5.2 Synthesevorschriften der Blockkationere

Synthesevorschrift für die Darstellung des Initiators Pent-4-ynyl-trifluormethansulfonsäure



Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an die Literatur.^[197] Trifluormethansulfonsäureanhydrid (4.40 mL, 26.15 mmol, 1.1 Äq.) wurde in 12 mL trockenem DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Ein Gemisch von Pent-4-yn-1-ol (2.21 mL, 23.78 mmol, 1 Äq.) und Pyridin (1.89 mL, 23.06 mmol, 0.97 Äq.) in 8 mL DCM wurde langsam über eine Spritze dazugegeben. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktionslösung für weitere 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde 20 mL VE-Wasser zugegeben und die organische Phase dreimal mit je 15 mL VE-Wasser gewaschen. Nachdem die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet wurde, wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde destillativ (Sp. 55 °C, 2 mbar) aufgereinigt und konnte als farblose Flüssigkeit (4.10 g, 19.02 mmol, 80%) erhalten werden.

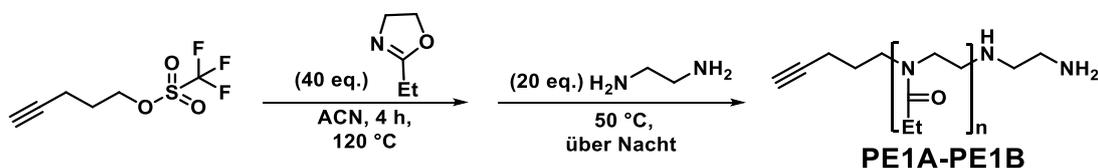
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 2.02-2.09 (m, 3H, CH, CH₂), 2.38-2.42 (m, 2H, CH₂), 4.69 (t, J = 6.0 Hz, 2H, CH₂O).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 14.5 (CH₂), 28.0 (CH₂), 70.3 (CH₂O), 75.5 (CH), 81.1 (C), 117.0 (CF₃).

¹⁹F-NMR (378 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = -74.7.

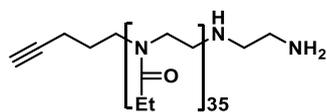
Die spektroskopischen Daten stimmten gut mit den Literaturwerten überein.^[197]

Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Darstellung der Poly(2-ethyl-2-oxazoline) mit einer endständigen Alkin-Funktion (PE1A, PE1B)



Zu 2-Ethyl-2-oxazolin (40 eq.) in trockenem Acetonitril (1 ml pro 3 mmol) wurde bei 0 °C Pent-4-ynyl-triflat (1 eq.) hinzugegeben und die Lösung wurde in einem zuvor temperierten Ölbad bei 120 °C für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde zur Termination der Polymerisation Ethylendiamin (20 eq.) zugegeben und bei 50 °C über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Chloroform aufgenommen und mit K_2CO_3 versetzt. Die Suspension wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend der Feststoff abfiltriert. Das Polymer wurde anschließend aus eiskaltem Diethylether gefällt und zentrifugiert. Das Lösungsmittel wurde anschließend abdekantiert und das Polymer am Hochvakuum getrocknet. Das Rohpolymer wurde mittels Dialyse (MWCO = 1000) gegen VE-Wasser gereinigt. Nach 48 h dialysieren, wurde das Wasser mittels Gefriertrocknung entfernt. Das Polymer wurde in wenig Chloroform gelöst, aus eiskaltem Diethylether gefällt und vom Fällungsreagenz abzentrifugiert. Nach anschließender Trocknung unter Hochvakuum, wurde das Polymer als farbloser Feststoff erhalten.

Synthese von Poly(2-ethyl-2-oxazolin)₃₅ (PE1A)

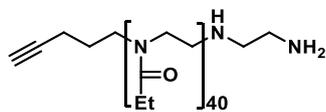


$M_{n,NMR}$	= 3596
$M_{n,GPC}$	= 5770
\bar{D}	= 1.08
Ausbeute	= 51%

Pent-4-ynyl-triflat	133.10 μ L (0.80 mmol, 1 eq.)
2-Ethyl-2-oxazolin	3.00 mL (30.30 mmol, 40 eq.)
Ethylendiamin	1.00 mL (15.10 mmol, 20 eq.)
Acetonitril	11.00 mL

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 1.14 (s, 100H, CH_3), 1.79-1.80 (m, 2H, I), 2.32-2.45 (m, 70H, CH_2), 3.47-3.51 (m, 140H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$).

Synthese von Poly(2-ethyl-2-oxazolin)₄₀ (PE1B)

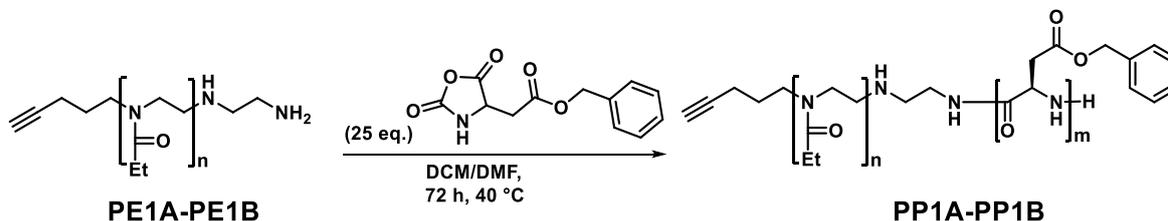


$M_{n,NMR}$	= 4093
$M_{n,GPC}$	= 6165
\bar{D}	= 1.07
Ausbeute	= 40%

Pent-4-ynyl-triflat	133.10 μ L (0.80 mmol, 1 eq.)
2-Ethyl-2-oxazolin	3.00 mL (30.30 mmol, 40 eq.)
Ethylendiamin	1.00 mL (15.10 mmol, 20 eq.)
Acetonitril	11.00 mL

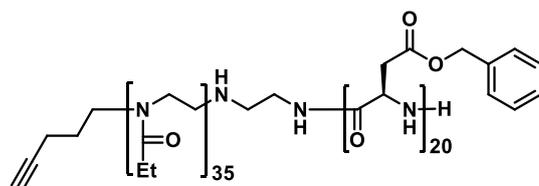
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 1.08 (s, 133H, CH_3), 1.73 (s, 2H, I), 2.26-2.36 (m, 81H, CH_2), 3.41 (m, 161H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$).

Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Herstellung der Blockcopolymer PEtOxn-b-PBLA_m (PP1A, PP1B)



Zunächst wurde der Makroinitiator PEtOx_n (**PE1A** bzw. **PE1B**) (1 eq.) in 5 mL trockenem DCM gelöst und für 2 h bei Raumtemperatur mit K₂CO₃ gerührt. Parallel wurde das Monomer BLA-NCA (m eq.) in einer Mischung aus trockenem DCM (18.0 mL) und trockenem DMF (1.8 mL) gelöst. Nachdem die Lösung des Makroinitiators zur Lösung des Monomers hinzugegeben wurde, wurde die Lösung für 72 h bei 40 °C gerührt. Das Polymer wurde durch direktes Fällern der Polymerisationslösung aus eiskaltem Diethylether gereinigt, indem es vom Fällungsreagenz abzentrifugiert wurde und der Fällungsprozess mehrere Male wiederholt wurde. Nach anschließender Trocknung des Polymers unter Hochvakuum, wurde das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Synthese von PEtOx₃₅-b-PBLA₂₀ (PP1A)



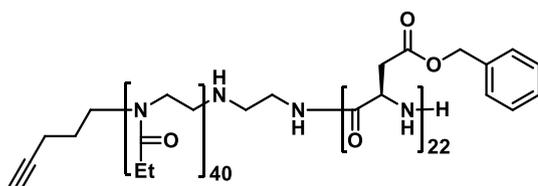
$M_{n,NMR}$	= 7741
$M_{n,GPC}$	= 7900
\bar{D}	= 1.14
Ausbeute	= 92%

PE1A	500.00 mg (0.14 mmol, 1 eq.)
BLA-NCA	866.31 mg (3.48 mmol, 25 eq.)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 0.96-0.98 (m, 106H, CH_{3,PEtOx}), 1.64-1.68 (m, 2H, l), 2.29-2.33 (m, 70H, CH_{2,PEtOx}), 2.53-2.63 (m, 21H, CH₂-C=O_{PBLA}), 2.81-2.88 (m, 26H, CH₂-

C=O_{PBLA}), 3.35-3.46 (m, 177H, CH₂-CH_{2,PEtOx}), 4.63-4.64 (m, 20H, CH_{PBLA}), 4.49-5.11 (m, 39H, CH₂-C_{6H₅,PBLA}), 7.24-7.32 (m, 102H, C_{6H₅,PBLA}), 8.17-8.18 (m, 17H, NH_{PBLA}).

Synthese von PEtOx₄₀-b-PBLA₂₂ (PP1B)

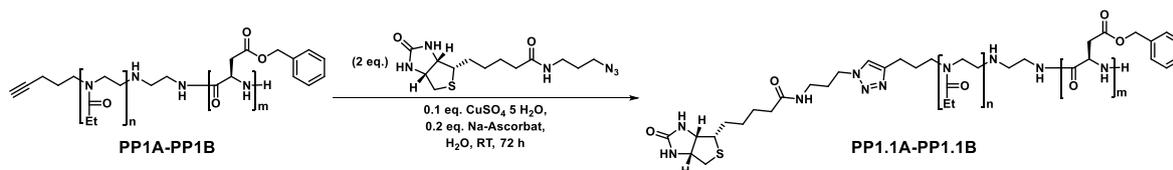


$M_{n,NMR}$ = 8652
 $M_{n,GPC}$ = 9290
 \bar{D} = 1.18
 Ausbeute = 77%

PE1B	600.00 mg (0.15 mmol, 1 eq.)
BLA-NCA	913.34 mg (3.66 mmol, 25 eq.)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 0.98 (m, 122H, CH_{3,PEtOx}), 2.31-2.35 (m, 80H, CH_{2,PEtOx}), 2.64-2.66 (m, 24H, CH₂-C=O_{PBLA}), 2.83-2.88 (m, 28H, CH₂-C=O_{PBLA}), 3.36-3.40 (m, 165H, CH₂-CH_{2,PEtOx}), 4.65 (m, 22H, CH_{PBLA}), 5.03-5.06 (m, 46H, CH₂-C_{6H₅,PBLA}), 7.29-7.31 (m, 115H, C_{6H₅,PBLA}), 8.21 (bs, 18H, NH_{PBLA}).

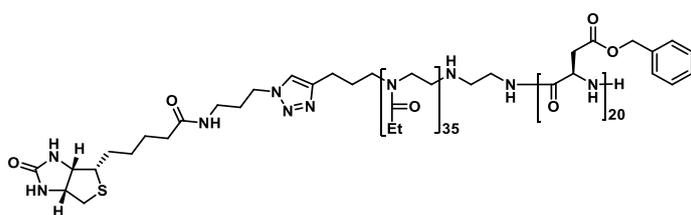
Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Herstellung der Biotin-modifizierten Blockcopolymeren PEtOx-b-P[Asp(DET)] (PP1.1A, PP1.1B) via Kupfer-katalysierter Click-Reaktion



Das Blockcopolymer **PP1A** bzw. **PP1B** (1.0 eq.) wurde in 20 mL VE-Wasser, welches vorher im Argon-Gegenstrom entgast wurde, suspendiert und anschließend wurde das Biotin-Azid-Derivat (2.0-2.5 eq.) dazugegeben. Dann wurden Natriumascorbat (0.2 eq.) und CuSO₅·5H₂O (0.1 eq.) zugegeben und bei Raumtemperatur für 48 h gerührt. Das Wasser wurde unter Vakuum entfernt und der Rückstand in gesättigter EDTA-Lösung gelöst und dialysiert. Nach anschließender Gefriertrocknung wurde das Rohprodukt in einem Gemisch

aus $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1) gelöst und zentrifugiert. Der Überstand wurde aus eiskaltem Diethylether gefällt und durch Zentrifugation vom Fällungsreagenz getrennt. Das Produkt wurde nach mehrmaligem Fällungsprozess und anschließender Trocknung unter Hochvakuum als farbloser Feststoff erhalten.

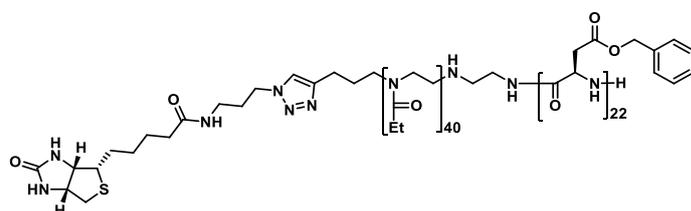
Synthese von Biotin-PEtOx₃₅-b-PBLA₂₀ (PP1.1A)



$M_{n,NMR}$	= 8067
$M_{n,GPC}$	= 8490
\bar{D}	= 1.20
Ausbeute	= 74%

PP1A	367.00 mg (0.050 mmol, 1.00 eq.)
Azid-Biotin	42.00 mg (0.130 mmol, 2.50 eq.)
Natriumascorbat	2.00 mg (0.010 mmol, 0.20 eq.)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.30 mg (0.005 mmol, 0.10 eq.)

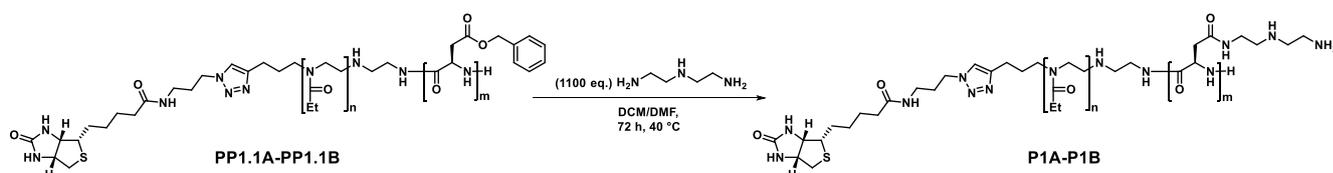
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 0.96-0.97 (m, 109H, $\text{CH}_3, \text{PEtOx}$), 1.91-2.06 (m, 2H, I), 2.28-2.33 (m, 70H, $\text{CH}_2, \text{PEtOx}$), 2.61-2.63 (m, 22H, $\text{CH}_2\text{-C=O}_{\text{PBLA}}$), 2.81-2.83 (m, 22H, $\text{CH}_2\text{-C=O}_{\text{PBLA}}$), 3.30-3.45 (m, 148H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2, \text{PEtOx}$), 4.29-4.31 (m, 2H, CH(Biotin)), 4.60-4.63 (m, 19H, CH_{PBLA}), 4.48-5.03 (m, 35H, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5, \text{PBLA}$), 7.24-7.35 (m, 100H, $\text{C}_6\text{H}_5, \text{PBLA}$), 7.88-7.91 (m, 1H, CH(Triazol)), 8.17-8.18 (m, 14H, NH_{PBLA}).

Synthese von Biotin-PEtOx₄₀-b-PBLA₂₂ (PP1.1B)


$M_{n,NMR}$	= 8978
$M_{n,GPC}$	= 9170
\bar{D}	= 1.24
Ausbeute	= 16%

PP1B	600.00 mg (0.069 mmol, 1.00 eq.)
Azid-Biotin	45.00 mg (0.138 mmol, 2.00 eq.)
Natriumascorbat	2.73 mg (0.014 mmol, 0.20 eq.)
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.70 mg (0.007 mmol, 0.10 eq.)

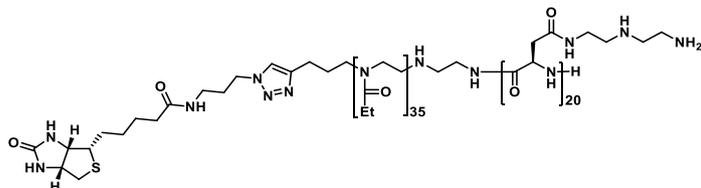
¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 0.96-0.97 (m, 121H, CH_{3,PEtOx}), 2.04-2.09 (m, 2H, l), 2.29-2.34 (m, 80H, CH_{2,PEtOx}), 2.59-2.61 (m, 23H, CH₂-C=O_{PBLA}), 2.81-2.84 (m, 27H, CH₂-C=O_{PBLA}), 3.36-3.45 (m, 168H, CH₂-CH_{2,PEtOx}), 4.30-4.35 (m, 2H, CH(Biotin)), 4.62-4.63 (m, 22H, CH_{PBLA}), 4.99-5.07 (m, 49H, CH₂-C₆H_{5,PBLA}), 7.28-7.36 (m, 124H, C₆H_{5,PBLA}), 7.89-7.92 (m, 1H, CH(Triazol)), 8.18-8.19 (m, 18H, NH_{PBLA}).

Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Herstellung der Biotin-modifizierten Blockkationomere PEtOx-*b*-P[Asp(DET)] (P1A, P1B) via Aminolyse


Das Blockcopolymer **PP1.1A** bzw **PP1.1B** (1 eq.) wurde in trockenem DMF (10 mL pro 0.01 mmol Polymer) gelöst und anschließend mit Diethylentriamin (DET) (50.00 eq. bezogen auf die Benzylesterfunktionen des Polymers) versetzt. Dann wurde die Reaktion für 72 h bei 40 °C gerührt. Anschließend wurde zu der Lösung tropfenweise 15-30 mL 10%ige Essigsäure bei 0 °C zugegeben. Das Polymer wurde durch 72 h Dialyse gegen 0.01 M

HCl-Lösung und VE-Wasser gereinigt und durch Lyophilisieren getrocknet. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Synthese von Biotin-PEtOx₃₅-b-P[Asp(DET)]₂₀ (P1A)

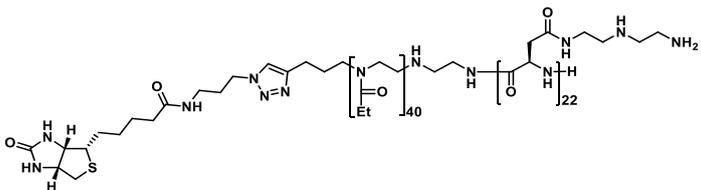


$M_{n,NMR}$	= 7968
$M_{n,GPC}$	= 14000
\bar{D}	= 1.10
Ausbeute	= 41%

PP1.1A	220.00 mg (0.03 mmol, 1 eq.)
DET	3.72 mL (33.75 mmol, 1250 eq.)

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ (ppm) = 0.99-1.04 (m, 105H, CH_{3,PEtOx}), 2.26-2.36 (m, 69H, CH_{2,PEtOx}), 2.71-2.93 (m, 42H, NH-CH_{2,DET}), 3.25-3.38 (m, 49H, CH_{2-NH_{2,DET}}), 3.47-3.48 (m, 191H, CH_{2-CH_{2,PEtOx}}), 3.58-3.67 (m, 79H, CH_{2-NH-CH_{2,DET}}), 4.56 (bs, 15H, CH_{PAsp}). (OCW_IP-85)

Synthese von Biotin-PEtOx₄₀-b-P[Asp(DET)]₂₂ (P1B)



$M_{n,NMR}$	= 8869
$M_{n,GPC}$	= 14020
\bar{D}	= 1.12
Ausbeute	= 40%

PP1.1B	250.00 mg (0.03 mmol, 1 eq.)
DET	3.31 mL (30.64 mmol, 1100 eq.)

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ (ppm) = 0.98-1.03 (m, 120H, CH_{3,PEtOx}), 2.25-2.37 (m, 78H, CH_{2,PEtOx}), 2.72-2.93 (m, 53H, NH-CH_{2,DET}), 3.19-3.25 (m, 73H, CH_{2-NH_{2,DET}}), 3.40-3.47 (m,

196H, CH₂-CH_{2,PEtOx}, 3.56-3.58 (m, 82H, CH₂-NH-CH_{2,DET}), 4.40-4.55 (m, 8H, CH_{PAsp}).
(OCW_IP-92)

ICP-OES-Messungen

Die ICP-OES-Messungen wurden von Frau Iris Henkel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Behr mit dem Duo-Gerät *Iris Intrepid* der Firma *THERMO ELEMENTAL* durchgeführt. Hierzu wurden 10 mL einer wässrigen Lösung (pH = 6) des Blockkationomers angesetzt und durch einen PTFE-Spritzenvorsatz filtriert.

Elementaranalysen

Die Elementaranalysen wurden von der Firma *Mikroanalytisches Laboratorium Kolbe* in Mülheim an der Ruhr durchgeführt.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Die Wahl der Vektoren ist maßgebend für den Erfolg des Gentransfers. Die Verwendung von viralen Vektoren resultiert in vielen nachgewiesenen Fällen in einer hohen Gentransfereffizienz, wird aber hinsichtlich ethischer und gesundheitlicher Sicherheit immer wieder kontrovers diskutiert. Aufgrund der zahlreichen Nachteile von viralen Vektoren, wie die hohen Kosten und strengen Sicherheitsaspekte bei der Herstellung, die eingeschränkte Modifizierung und geringe DNA-Ladefähigkeit, wächst das Interesse an nicht-viralen Transportsystemen. Die Suche nach alternativen Systemen führte zu einer großen Anzahl an unterschiedlichen nicht-viralen Vektoren auf Basis von Lipiden, Polymeren und anorganischen Verbindungen. Im Gegensatz zu viralen Vektoren ist der größte Vorteil von nicht-viralen Vektoren die Möglichkeit der zielgerichteten Funktionalisierung. Dabei ist ebenso eine hohe Gentransfereffizienz bei gleichzeitiger minimaler Zytotoxizität entscheidend.

In der vorliegenden Arbeit wurden neue nicht-virale Vektoren auf Basis von biokompatiblen und funktionalisierten Polymeren entwickelt und hinsichtlich ihrer Anwendung für den Transport von Plasmid-DNA (pDNA) charakterisiert. Aus den erzielten Ergebnissen konnten Struktur- und Eigenschaftsbeziehungen hergeleitet werden, die eine Aussage darüber zulassen, welche Strukturmerkmale einen Einfluss auf biologische und toxikologische Eigenschaften der gebildeten Polyplexmizellen und auf den Gentransfer haben. Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurden Blockkationere auf Basis von hydrophilen Poly(2-oxazolin) (POx), welche mit dem bioabbaubaren Poly(aspartamid) (PAsp) kombiniert wurden, synthetisiert. Der PAsp-Polymerblock lag dabei mit einer pH-sensitiven *N*-(2-Aminoethyl)-2-aminoethyl (DET)-Seitenkette, welche Puffereigenschaften in endosomal-saurer Umgebung hat, modifiziert vor. Aufgrund der Basizität der Amine in der DET-Seitenkette wurden unter physiologischen Bedingungen Blockkationere erzeugt, die durch elektrostatische Wechselwirkungen mit der DNA bei verschiedenen N/P-Verhältnissen Polyplexmizellen bildeten. Dabei bezeichnet N die Anzahl der kationischen

Amine im Blockkationomer, während P die Anzahl der Phosphatgruppen der pDNA repräsentiert.

Zunächst wurden im Kapitel 4 vier Blockkationomere der Struktur $\text{PMOx}_n\text{-}b\text{-P[Asp(DET)]}_m$ hergestellt, die sich in der Molmasse und dem Verhältnis der beiden Polymerblöcke unterscheiden. Ziel war es Struktur-Eigenschaftsbeziehungen zu untersuchen und daraus sowohl die optimalen Polymereigenschaften wie Molmasse, Blocklängen und Blocklängenverhältnisse, als auch das optimale N/P-Verhältnis zu ermitteln (Abbildung 83).

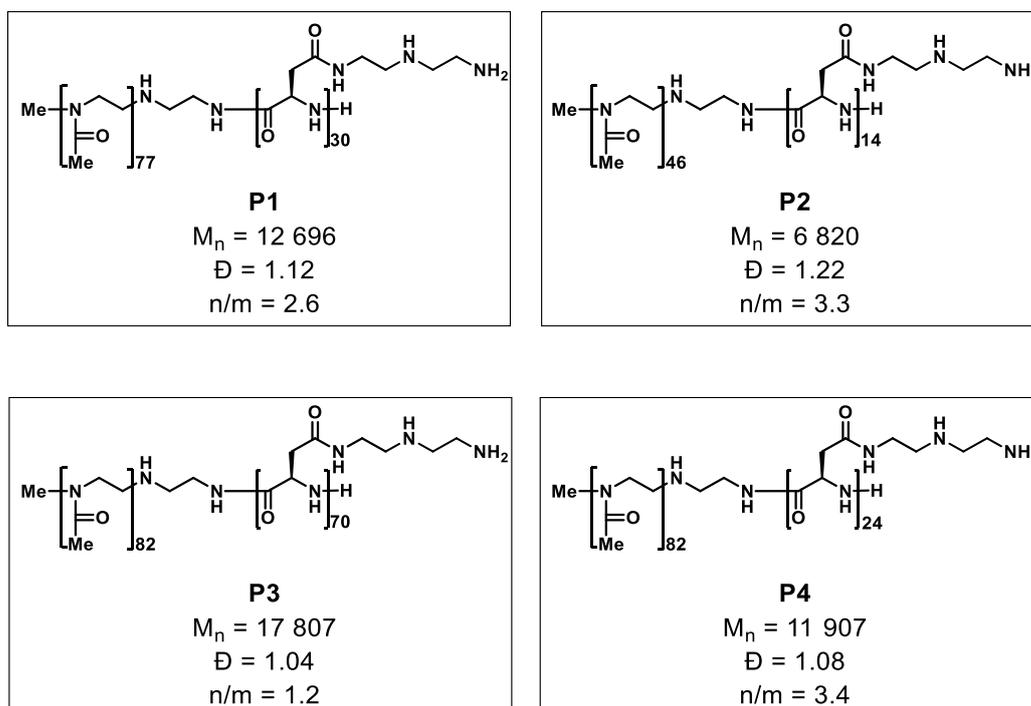


Abbildung 83 Zusammenfassende Übersicht der im Kapitel 4 erfolgreich synthetisierten Blockkationomere **P1-P4** und ihre analytischen Daten.

Die Blockkationomere wurden in einer einfachen dreistufigen Synthese ausgehend von kommerziell erhältlichen Edukten in größeren Mengen von bis 350 mg reproduzierbar hergestellt. Alle vier Blockkationomere waren in der Lage pDNA effizient zu kondensieren und stabile Polyploxmizellen zu bilden. Dabei wurden neben Strukturmerkmalen der Polymere, auch Einflüsse unterschiedlicher DNA-Sequenzen und Konzentrationen studiert, indem sowohl peGFP als auch pCherry in den Konzentrationen 100 ng/ μl und 200 ng/ μl für die

Bildung von Polyplexmizellen verwendet wurden. Bei der Charakterisierung der Polyplexmizellen konnte festgestellt werden, dass weder die DNA-Sequenz noch die Konzentration bei gleichbleibender Anzahl an Basenpaaren einen Einfluss auf die Bildung und Stabilität der Komplexe und Effizienz des Gentransfers hatten. Lediglich das N/P-Verhältnis spielte eine Rolle bei den Eigenschaften der Polyplexmizellen. Hohe N/P-Verhältnisse begünstigten die Stabilität, sodass bei N/P-Verhältnissen von 100 und 300 50-70 nm große Polyplexmizellen gebildet wurden, die bis zu 21 Tage stabil in HEPES-Puffer und isotonischen Medien waren. Auch die Transfektionsrate stieg mit zunehmenden N/P-Verhältnis stark an. Bei der Gentransfektion konnte ein Zusammenhang zwischen molarer Masse des Blockkationomers und der Gentransfereffizienz beobachtet werden. Zusammenfassend konnte in Kapitel 4 erfolgreich anhand von vier Blockkationomeren mit unterschiedlichen molaren Massen und Blocklängenverhältnissen (n/m) festgestellt werden, dass eine molare Masse über 10 kDa und ein N/P-Verhältnis über 50 besonders vorteilhaft für die Eigenschaften der gebildeten Polyplexmizellen mit pDNA sind. Hinsichtlich der Transfektionsrate spielte vor allem die molare Masse eine wichtige Rolle.

Das bekannte Ladungsproblem (engl. *charge dilemma*), im Sinne höherer Toxizität bei höherer Gentransfereffizienz, sollte in den Kapiteln 5 und 6 einerseits durch die Einführung eines reduktiv spaltbaren Linkers und andererseits durch die Einführung eines Targeting-Liganden in die Polymerstruktur, umgangen werden. Hierfür wurden, auf Basis von 2-Ethyl-2-oxazolin, Blockkationomere mit der Struktur $\text{PEtOx}_n\text{-SS-P[Asp(DET)]}_m$ und Biotin- $\text{PEtOx}_n\text{-b-P[Asp(DET)]}_m$ synthetisiert (Abbildung 84).

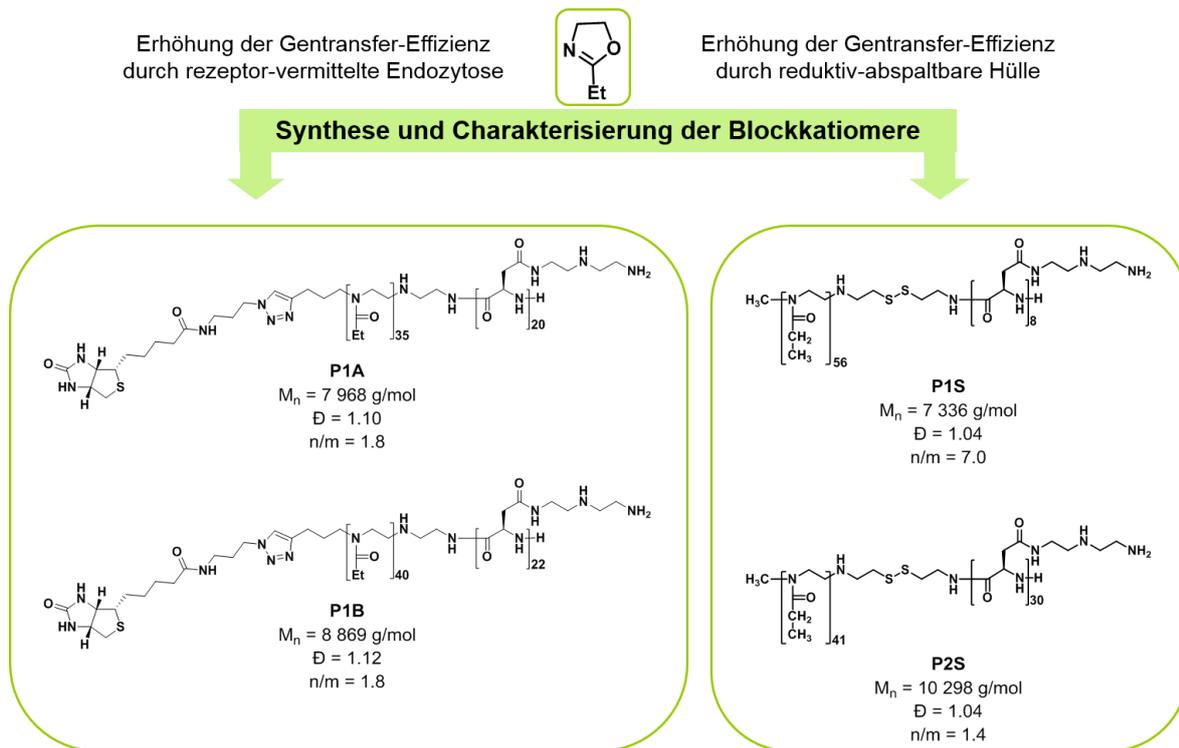


Abbildung 84 Schematische Darstellung der synthetisierten Blockkatiomere mit einer Biotin-Einheit (links) und einem reaktiv spaltbaren Disulfid-Linker (rechts) zur Steigerung der Gentransfereffizienz.

Die reaktiv spaltbaren Blockkatiomere **P1S** und **P2S** wurden in einer dreistufigen Synthese mit Methyltriflat als Initiator und Cystamin als Terminierungsreagenz synthetisiert. Die Biotin-funktionalisierten Blockkatiomere wurden mit Pent-4-ynyl-triflat als Initiator in einer vierstufigen Synthese, welche eine Kupfer-katalysierte Click-Reaktion beinhaltet, hergestellt. Der lebende Polymerisationsmechanismus von 2-Ethyl-2-oxazolin und β -Benzyl-L-asparaginsäure-*N*-carboxyanhydrid (BLA-NCA) ermöglichte die Darstellung der Blockkatiomere mit definierten Blocklängen (n , m) und kontrollierten Molmassen (M_n).

Die synthetisierten Blockkatiomere waren in der Lage mit pDNA Polyplexmizellen mit einer geeigneten Schale-Kern-Architektur zu bilden (Abbildung 85).

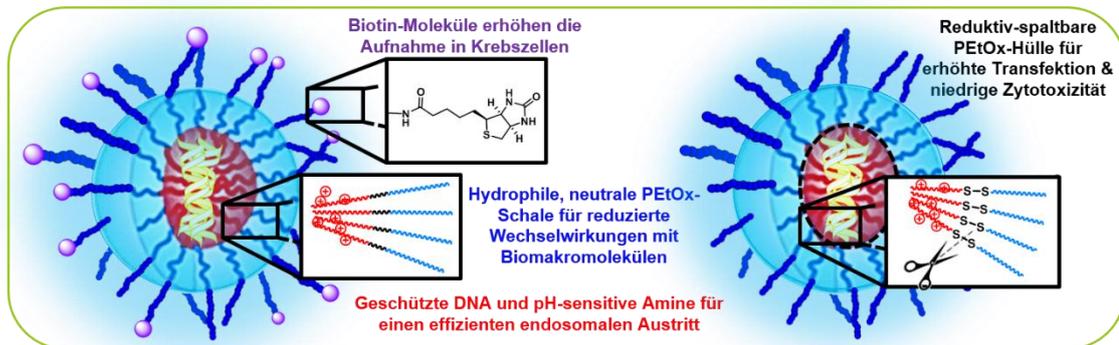


Abbildung 85 Schematische Darstellung der Strukturen der gebildeten Polyplexmizellen.

Hierbei sollte gezeigt werden, dass das *charge dilemma* durch die Bildung einer Polyplexmizelle einerseits mit einer reduktiv abspaltbaren PEtOx-Hülle und andererseits mit der Biotin-funktionalisierten PEtOx-Hülle umgangen werden kann. Zum einen soll die Gentransfereffizienz durch erhöhte Wechselwirkung zwischen der Zellmembran bzw. endosomalen Membran und des Komplexes bei gleichbleibender Zytokompatibilität gesteigert werden. Zum anderen soll die Rezeptor-vermittelte Endozytose mittels Biotin-Liganden die Gentransferaktivität steigern ohne dabei die Zytokompatibilität negativ zu beeinflussen.

Die Bildung einer stabilen Transportform (**A**) durch die Kondensation der DNA in eine kompakte Konformation und damit einhergehend die Maskierung der negativen Ladung durch das Blockkationomer, wurde mithilfe von Gelelektrophorese und SYBR Green Ausschluss-Assay untersucht. Der Anteil nicht kondensierter DNA wurde im Ausschluss-Assay mittels der Fluoreszenzintensität des DNA-Interkalationsfarbstoffs SYBR Green nach Bildung der Komplexe im Verhältnis zur nativer DNA als Referenz berechnet und in [%] angegeben (Abbildung 86).

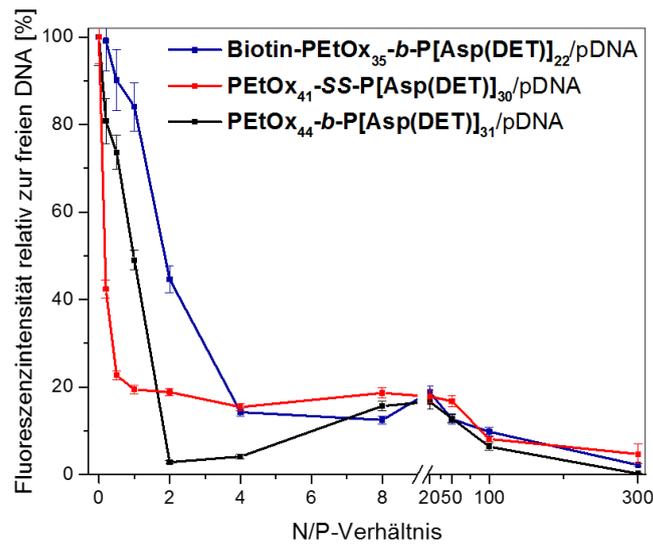


Abbildung 86 Vergleich der Komplexierungskraft von Biotin-PEtOx₃₅-b-P[Asp(DET)]₂₂ (**P1**), PEtOx₄₁-SS-P[Asp(DET)]₃₀ (**P2S**) und PEtOx₄₄-b-P[Asp(DET)]₃₁ (**P2**).

Um ein abschließendes Fazit über den Einfluss eines spaltbaren Disulfid-Linkers und einer Biotin-Einheit in der Polymerstruktur ziehen zu können, wurden in diesem Kapitel die Polymere PEtOx₄₁-SS-P[Asp(DET)]₃₀ (**P2S**) und Biotin-PEtOx₃₅-b-P[Asp(DET)]₂₂ (**P1**) mit dem Referenzpolymer PEtOx₄₄-b-P[Asp(DET)]₃₁ (**P2**) verglichen. Dabei konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die Einführung einer reaktiv spaltbaren Disulfid-Brücke mittels einer Cystamin-Einheit die Komplexierungskraft positiv beeinflusste, während die Funktionalisierung mit Biotin einen negativen Effekt auf die DNA-Bindungsaffinität hatte. So wurde die DNA mit dem Blockkationomer **P2S** bereits ab einem niedrigem N/P-Verhältnis von 1 vollständig im Kern komplexiert, während das Biotin-funktionalisierte Blockkationomer **P1** die DNA erst ab einem N/P-Verhältnis von 4 komplett verpackte. Es wurde davon ausgegangen, dass das Biotin-Molekül ebenfalls elektrostatisch oder über Wasserstoff-Brücken-Bindungen mit den Phosphat-Gruppen der DNA wechselwirken kann, was die Komplexierung im Mizellenkern behindern könnte. Weiterhin begünstigten Strukturmerkmale der Blockkationomere, wie eine Molmasse über 10 kDa und ein längerer kationischer P[Asp(DET)]-Polymerblock die Komplexierungskraft der Blockkationomere.

Mit dem Ziel eine Aussage über die Hämokompatibilität (B) und Zellaufnahme (C) der Polyplexmizellen treffen zu können, wurden die Größe, Morphologie, Oberflächenladung und Stabilität der Polyplexmizellen untersucht. Abbildung 87 zeigt die Größen und Morphologien der Biotin-funktionalisierten (blau), reaktiv-spaltbaren (rot) und nicht-funktionalisierten (schwarz) Polyplexmizellen.

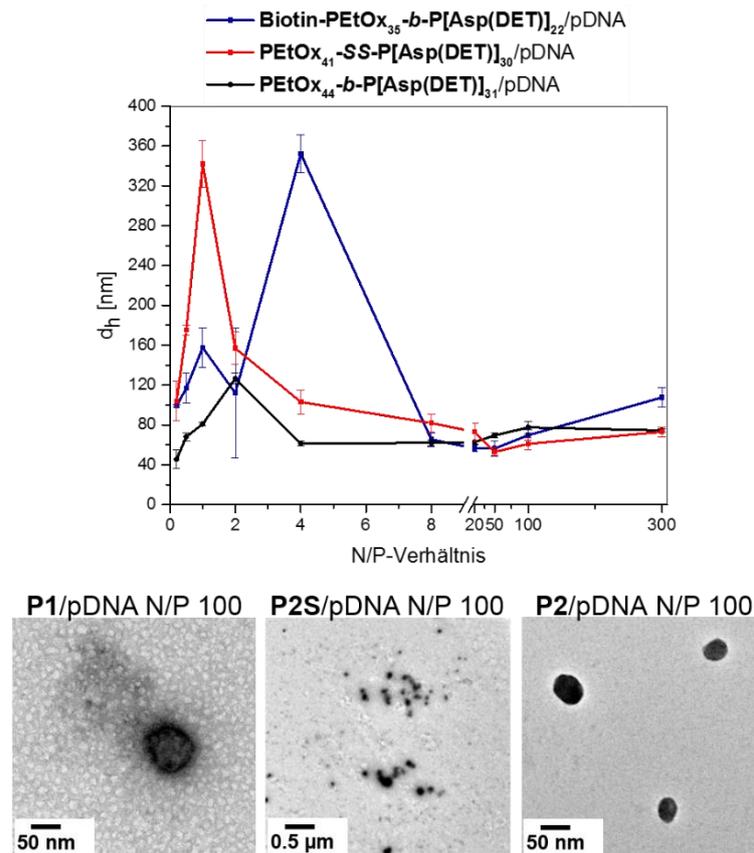


Abbildung 87 DLS-Messungen des hydrodynamischen Durchmessers (oben) und TEM-Analysen (unten) der Polyplexmizellen aus Biotin-PETox₃₅-b-P[Asp(DET)]₂₂ (P1), PETox₄₁-SS-P[Asp(DET)]₃₀ (P2S) und PETox₄₄-b-P[Asp(DET)]₃₁ (P2).

Die untersuchten Polyplexmizellen hatten unabhängig von der Funktionalisierung der Polyplexmizellen ab einem N/P-Verhältnis von 8 einen hydrodynamischen Durchmesser von ca. 60-80 nm. Damit hatten sie eine vergleichbare Größe mit Viren, Lipoproteinen und anderen natürlichen Transportsystemen^[123] und sind somit für die endozytische Aufnahme in Zellen geeignet. Des Weiteren sind sie auch für die Aufnahme in

Tumorgewebe über den EPR-Effekt geeignet, da hierbei die Partikel idealerweise eine Größenverteilung von 50-150 nm haben sollten.^[142]

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass weder die molare Masse noch die Blocklängen der Blockkationere einen Einfluss auf die Größe der gebildeten Polyplexmizellen hatten. Die TEM-Analysen bestätigten die Größen der DLS-Messungen und zeigten für alle untersuchten Polyplexmizellen sphärische und homogene Strukturen.

In Hinblick auf die extrazellulären Barrieren (**B**) ist eine hohe Komplexstabilität unter physiologischen Bedingungen Voraussetzung für einen erfolgreichen Gentransport. Hierfür zeigten die Untersuchungen der Langzeitstabilität aller Polyplexmizellen in HEPES-Puffer unabhängig vom N/P-Verhältnis und der Polymerarchitektur weder Zerfall noch Aggregatbildung innerhalb des gemessenen Zeitraums von 28 Tagen. Folglich trug die Schale-Kern-Mizellenstruktur mit der neutralen PEOx-Palisade erfolgreich zur Stabilität der Komplexe bei.

Mit dem Ziel das Verhalten der Polyplexmizellen in Gegenwart physiologisch relevanter Salzkonzentrationen des menschlichen Bluts (**B**) und im Endosom (**C**) bei einem pH-Wert von 5 zu untersuchen, wurden die Größenänderungen der Polyplexmizellen sowohl in 150 mM wässriger Natriumchlorid-Lösung als auch in saurer Puffer-Lösung untersucht (Abbildung 88).

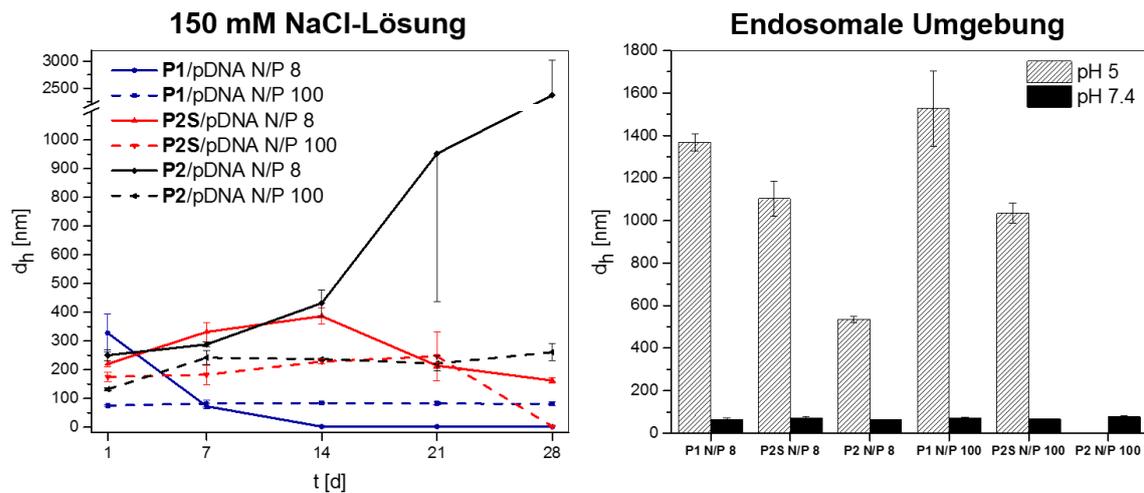


Abbildung 88 DLS-Messungen des hydrodynamischen Durchmessers der Polyplexmizellen aus Biotin-PEtOx₃₅-*b*-P[Asp(DET)]₂₂ (**P1**), PEtOx₄₁-SS-P[Asp(DET)]₃₀ (**P2S**) und PEtOx₄₄-*b*-P[Asp(DET)]₃₁ (**P2**) in 150 mM wässriger NaCl-Lösung (links) und in Puffer-Lösung mit pH 5 und pH 7.4 (rechts).

Eine Änderung des hydrodynamischen Durchmessers würde auf einen Zerfall oder Aggregation der Polyplexmizellen hindeuten. Anhand der DLS-Messungen konnte erfolgreich festgestellt werden, dass die Salz-induzierte Aggregation sowohl vom N/P-Verhältnis als auch von der Salzkonzentration abhängig war. Mit höherem N/P-Verhältnis stieg die kolloidale Stabilität. Ein enormer Vorteil bei der Funktionalisierung der Polyplexmizellen lag darin, dass bei einem N/P-Verhältnis von 8 die reduktiv spaltbaren Polyplexmizellen aus PEtOx₄₁-SS-P[Asp(DET)]₃₀ (**P2S**) und bei einem N/P-Verhältnis von 100 die Biotin-funktionalisierten Polyplexmizellen aus PEtOx₃₅-*b*-P[Asp(DET)]₂₂ (**P1**) die höchste Stabilität innerhalb von 28 Tagen zeigten. Bemerkenswert dabei war, dass die Biotin-funktionalisierten Polyplexmizellen aus **P1** mit N/P = 100 kein Salz-induziertes Aggregationsverhalten zeigten, was auf eine sehr gute Abschirmung durch die hydrophile Hülle hindeutet. Im Gegensatz dazu aggregierten die Polyplexmizellen mit N/P = 100 aus PEtOx₄₁-SS-P[Asp(DET)]₃₀ (**P2S**) und PEtOx₄₄-*b*-P[Asp(DET)]₃₁ (**P2**) nach nur einem Tag in 150 mM wässriger Natriumchlorid-Lösung zu 100-200 nm großen Partikeln. Abbildung 89 veranschaulicht schematisch die beobachtenden Größenänderungen in Abbildung 88

sowohl durch die Salz-induzierte Aggregation in 150 mM Natriumchlorid-Lösung, als auch durch die Ausdehnung der Polyplexmizellen in Puffer-Lösung mit einem pH-Wert von 5.

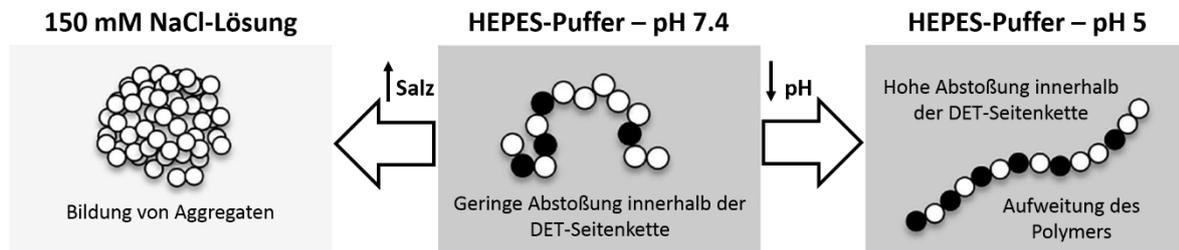


Abbildung 89 Verhalten der DET-Seitenkette in 150 mM wässriger NaCl-Lösung (links) und in Puffer-Lösung mit pH = 5 (rechts).^[141]

Die beobachtete Aggregation konnte mit dem Effekt der Salz-Ionen, die zu reduzierten repulsiven Wechselwirkungen führte und folglich zu Komplexen, die sich wie neutral geladene Partikel in Lösung verhielten, erklärt werden. Es konnte erfolgreich festgestellt werden, dass die kolloidale Stabilität in Salz-Lösung neben der Funktionalisierung der PEtOx-Hülle, auch von der Anzahl der kationischen Amin-Gruppen beeinflusst wird. Diese ist sowohl von den Repetiereinheiten des P[Asp(DET)]-Blocks als auch von dem N/P-Verhältnis abhängig.

Mit dem Ziel den endosomalen Austritt, als den limitierenden Schritt des Gentransports, effizient zu gestalten, war eine maßgebliche Ausdehnung des Polymers bzw. der Polyplexmizellen in pH 5 saurer Lösung wünschenswert. Hierfür wurden erfolgreich Polyplexmizellen im Größenbereich von 500-1600 nm gemessen (Abbildung 88). Es zeigte sich ein enormer Vorteil der Funktionalisierung sowohl durch die Einführung einer reduktiv spaltbaren Disulfid-Brücke als auch einer Biotin-Einheit, da dadurch signifikant höhere Ausdehnungen der Komplexe zu 1-1.6 µm großen Partikeln erreicht wurden. Als Begründung für die Größenzunahme wurde die doppelte Protonierung der Ethylendiamin-Einheit bei einem pH-Wert von 5 betrachtet. Dadurch werden die repulsiven Wechselwirkungen innerhalb der DET-Seitenkette erhöht, was folglich zur Aufweitung des Polymers und Quellung der Polyplexmizellen führt (Abbildung 89). Diese starke Größenzunahme der Polyplexmizellen aus den Blockkatiomeren **P1** und **P2S** in endosomal-

saurer Umgebung sind vorteilhaft für einen effizienten endosomalen Austritt und damit für eine erfolgreiche Gentransfektion.

In Hinblick auf das *charge dilemma* sollen im Folgenden die Oberflächenladungen, die Zytotoxizitätsmessungen und die ermittelten Transfektionseffizienz der Polyplexmizellen gegenübergestellt werden (Abbildung 90).

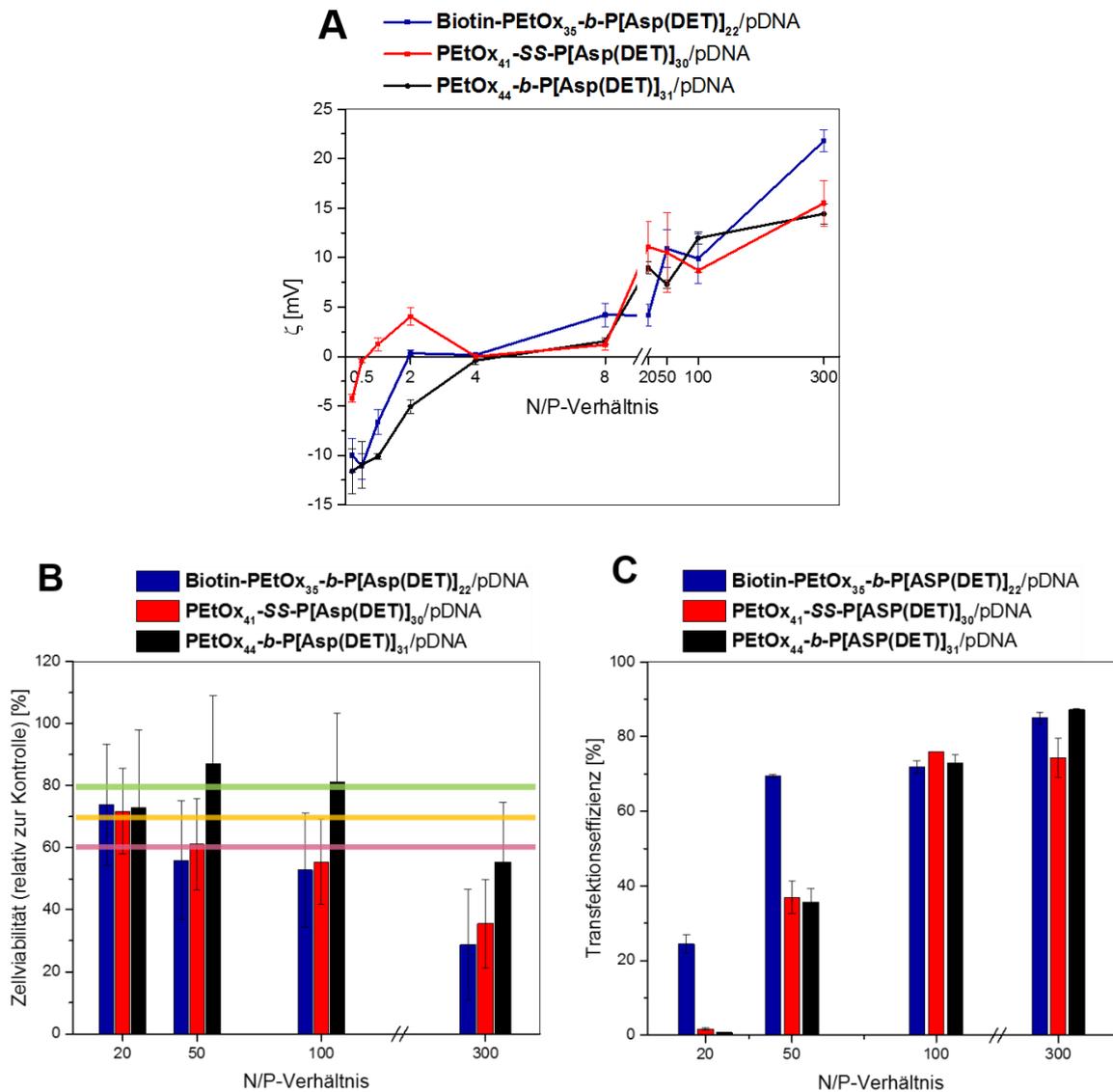


Abbildung 90 Bestimmung des (A) Zetapotentials, der (B) Zellviabilität und der (C) Transfektionseffizienz der Polyplexmizellen.

Da das *charge dilemma* den Zusammenhang zwischen einer hohen Transfektionseffizienz und einer gleichzeitig hohen Zytotoxizität beschreibt, welche gleichermaßen auf erwünschte und unerwünschte elektrostatische Wechselwirkungen mit der Zellmembran und anderen Blutbestandteilen beruhen, ist eine leicht kationisch geladene Oberfläche wünschenswert.^[39,206] Hierfür lag das Zetapotential für alle Polyplexmizellen mit N/P = 4-100 in einem leicht positiven Bereich von ca. +4 mV. Folglich konnten die kationischen Ladungen, welche potentielle zytotoxische Eigenschaften haben können,^[39,206] erfolgreich durch die hydrophile Poly(2-ethyl-2-oxazolin) (PEtOx)-Hülle abgeschirmt werden. Lediglich die Biotin-funktionalisierten Polyplexmizellen zeigten eine höhere positive Ladungsdichte bei einem hohen N/P-Verhältnis von 300, was auf eine reduzierte Abschirmung verursacht durch die Biotin-Einheiten hinwies. Eine hohe kationische Ladungsdichte kann die Zellmembran destabilisieren und zerstören, was folglich zur Zytotoxizität führen würde. Diese drückt sich in der Zellviabilität aus, die als prozentueller Anteil an lebenden Zellen nach 48 h Behandlung mit dem Polymer bzw. den Polyplexmizellen ermittelt wurde. Die Zytotoxizität wurde in Anlehnung an die DIN ISO 10993-5:2009 beurteilt (Tabelle 12).

Tabelle 12 Zytotoxizitätsskala für *in vitro* Zytotoxizitätsprüfung in Anlehnung an die DIN EN ISO 10993-5.^[207]

Gradeinteilung	Zellviabilität [%] (bzgl. Kontrolle)	Interpretation
0	100-81	Nicht zytotoxisch
1	80-71	Schwach zytotoxisch
2	70-61	Mäßig zytotoxisch
3	60-0	Stark zytotoxisch

Zellen, welche mit nicht zytotoxischen Substanzen behandelt wurden, zeigen keine morphologischen Auffälligkeiten, während schwach zytotoxische Substanzen epidermale Zellschichten ablösen können. In Falle einer starken Zytotoxizität liegt fast die ganze epidermale Zellschicht zerstört vor. Dieser stark zytotoxische Zustand wurde bei der Behandlung mit Biotin-funktionalisierten und reduktiv spaltbaren Polyplexmizellen mit einem N/P-Verhältnis von 300 ermittelt und ist auf das Zetapotential über +15 mV zurückzuführen. Dem *charge dilemma* entsprechend wurde bei einem N/P-Verhältnis von 300 neben höchster Zytotoxizität auch die höchste Transfektionsrate in HEK 293 Zellen

beobachtet. Die Transfektionseffizienz wurde hierbei mit Durchflusszytometrie, eine Fluoreszenz-basierte Methode zum Zählen und Analysieren von Zellen im Flüssigkeitsstrom, ermittelt. Hierfür wurden HEK293 Zellen mit den Polyplexmizellen, welche das Reporterogen trugen, das von der Zielzelle in GFP (*green fluorescent protein*) übersetzt wird, transfiziert.

Es konnte erfolgreich festgestellt werden, dass die Funktionalisierung der Polyplexmizellen, insbesondere mit N/P-Verhältnissen unter 300, einen signifikanten Einfluss auf Zellviabilität und Transfektionseffizienz hatte. Alle Polyplexmizellen mit dem N/P-Verhältnis von 20 zeigten innerhalb der Fehlergrenzen eine Zellviabilität über 80%, allerdings transfizierten nur die Biotin-funktionalisierten Polyplexmizellen bei diesem niedrigem N/P-Verhältnis. Im Falle der Polyplexmizellen mit N/P = 50 lag die Zellviabilität bei den funktionalisierten Komplexen aus **P1** und **P2S** im schwach zytotoxischen Bereich, während die nicht funktionalisierten Partikel keine Toxizität zeigten. Hierbei bewiesen ebenfalls die Biotin-funktionalisierten Polyplexmizellen die höchste Transfektionseffizienz von ca. 70%. Die reduktiv spaltbaren Polyplexmizellen und nicht funktionalisierten Partikeln erreichten lediglich eine Transfektionsrate von ca. 36%. Mit einem N/P-Verhältnis von 100 hatten alle untersuchten Polyplexmizellen nahezu die gleiche Transfektionsaktivität von ca. 76%. Jedoch zeigten nur die nicht funktionalisierten Polyplexmizellen aus **P2** keine zytotoxischen Effekte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der zielführende Ansatz die Einführung einer Biotin-Einheit als aktiver Ligand für eine Rezeptor-vermittelte Zellaufnahme vor allem bei den N/P-Verhältnissen von 20 und 50 sehr erfolgreich und vielversprechend ist. Dadurch konnte die Transfektionseffizienz erfolgreich gesteigert werden bei gleichzeitiger minimaler Zytotoxizität.

Für weiterführende Arbeiten wäre es interessant, die Biotin-funktionalisierten Polyplexmizellen aus dem Blockkationomer **P1** in Krebszelllinien zu testen, um die Rezeptor-vermittelte Zellaufnahme spezifisch in Krebszellen gegenüber gesunden Zellen zu untersuchen. In diesem Zusammenhang wäre es von hohem Interesse zusätzlich ein

suizidales Gen zu verwenden. Außerdem stehen weitere *in vitro* Untersuchungen, wie beispielsweise die Charakterisierung zur Hämokompatibilität und DNase-Test, sowie *in vivo* Studien aus.

8 Allgemeiner experimenteller Teil

8.1 Vorschriften zur Charakterisierung der Polyplexmizellen

Bildung der Polyplexmizellen mit den synthetisierten Blockkationeren durch Komplexierung der DNA

Für die Bildung der Polyplexmizellen wurden die Blockkationere und die Plasmid-DNA in definierten Stickstoff zu Phosphor Verhältnissen (N/P) gemischt. Zur Bestimmung der N/P Verhältnisse wurde angenommen, dass die pDNA pro 330 g/mol eine Phosphatgruppe enthält. Bei einer Molmasse von 1 461 928.77 g/mol für die pDNA ergibt sich, dass 1 µg pDNA 3.238×10^{-9} mol Phosphatgruppen enthält. Mithilfe der ^1H NMR-Spektroskopie und der Endgruppenanalyse war die Anzahl der Amin-Gruppen der Blockkationere bekannt, sodass die Polymermenge für die gewünschten N/P-Verhältnisse kalkuliert werden konnten. Für die einfachere Handhabung wurde eine Stammlösung der DNA mit den Konzentrationen von $c = 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ und $200 \text{ ng}/\mu\text{L}$ hergestellt. Es wurden Stammlösungen der Blockkationere für jedes N/P-Verhältnis so eingestellt, dass für die Komplexierung der DNA jeweils 10 µL der jeweiligen Stammlösung entnommen wurde. Als Komplexierungsmedium wurde spritzenfiltrierter HEPES-Puffer der Konzentration 10 mM mit dem pH-Wert von 7.4 verwendet. Für die Komplexierung wurden jeweils 10 µL der DNA-Stammlösung mit 10 µL der jeweiligen Blockkationer-Stammlösung durch mehrmaliges Pipettieren der Lösungen gemischt. Die Proben wurden kurz gevortext und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Gelelektrophorese

Die frisch hergestellten Polyplexmizellen mit den N/P Verhältnissen von 0.2-300 wurden zusammen mit einer Negativkontrolle (Polymer) und einer Positivkontrolle (DNA) mittels Gelelektrophorese auf einem 1%igen Agarosegel analysiert. Dazu wurde das Agarosegel mit 5 µL „Midori Green Advance“ als DNA Farbstoff versetzt. Als Elektrophorese-Puffer TAE-Puffer verwendet. Für die Beladung des Gels wurden jeweils 3 µL der Proben mit 1 µL

„Quick-load purple DNA Dye“ vermischt. Anschließend wurden die Proben für 20 min bei 120 V aufgetrennt. Ein „Gel Documentation System“ (GelDoc) wurde verwendet, um die DNA-Migration sichtbar zu machen.

SYBR Green Ausschluss-Assay

Für die Bildung der Polyplexmizellen wurde die DNA-Stammlösung vorher mit 1 µL SYBR Green pro 100 µL DNA-Stammlösung angefärbt. Die Polyplexmizellen wurden unter Lichtausschluss wie beschrieben gebildet. Für die Messung der Fluoreszenzintensität mit dem TECAN Microplate Reader, wurden die Proben in einem 96er Well-Plate mit 100 µL HEPES-Puffer (10 mM, pH 7.4) aufgefüllt. Neben den Polyplexmizellen mit den verschiedenen N/P-Verhältnissen, wurden negative und positive Proben zusätzlich vermessen. Als Positivkontrolle wurde mit SYBR Green gefärbte DNA-Lösung in 100 µL HEPES-Puffer vermessen. Als Negativkontrollen wurden eine mit SYBR Green versetzte Polymerlösung in 100 µL HEPES-Puffer, sowie nur SYBR Green Farbstoff in 100 µL HEPES-Puffer eingesetzt.

Untersuchung der Morphologie mittels TEM-Analyse

Zur Aufnahme der TEM-Bilder wurde das Gerät CM200 der Firma Philips mit der Kamera Orius SC200 der Firma Gatan verwendet. Die Polyplexmizellen wurden wie oben beschrieben mit dem bestimmten N/P-Verhältnis gebildet. Für die Analyse wurde die Probe in einem Verhältnis von 1:10 mit Wasser verdünnt. Zur Kontrastierung wurde Uranylacetat verwendet. Bei der Probenpräparation wurden 20 µL Probe auf ein Kupfergrid gegeben. Nach einer Minute wurde der Tropfen mit einem Filterpapier getrocknet. Die Aufnahmen wurden im Arbeitskreis von Herrn Prof. J. Tiller von Frau Monika Meuris und Herrn Volker Brandt aufgenommen.

Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers der Polyplexmizellen mittels DLS-Messungen

Die Polyplexmizellen wurden wie oben beschrieben gebildet und mit 100 μL HEPES-Puffer (10 mM, pH 7.4) aufgefüllt. Nachdem die Proben für je 1 min equilibriert wurden, wurden fünf Messungen mit je acht Einzelmessungen durchgeführt. Anschließend wurde der Durchschnittswert dieser Messungen für die weitere Analyse verwendet.

Bestimmung des Zetapotentials der Polyplexmizellen mittels DLS-Messungen

Das Zetapotential wurde unmittelbar nach der Messung der Partikelgröße durchgeführt. Dazu wurden die zuvor eingesetzten 100 μL der Polyplexmizellen-Proben mit 700 μL einer 10 mM KCl-Lösung verdünnt. Es wurden je fünf Messungen pro Probe bei Raumtemperatur durchgeführt. Mit der aus den Messungen erhaltenen elektrischen Mobilitäten, wurde mithilfe der *Smoluchowski* Gleichung das Zetapotential bestimmt.

Bestimmung der Langzeitstabilität mittels DLS-Messungen

Für die Bestimmung der Langzeitstabilität wurden die Polyplexmizellen wie oben beschrieben hergestellt. Es wurde jedoch anstelle von 10 μL der Stammlösungen mit jeweils 30 μL der DNA- und Polymerstammlösungen komplexiert. Für die Messung des hydrodynamischen Durchmessers wurden an den gewissen Zeitpunkten in einem Zeitraum von 21 Tagen jeweils 10 μL der Polyplexmizellen-Lösungen entnommen und mit 100 μL HEPES-Puffer (10 mM, pH 7.4) verdünnt. Die Durchführung der DLS-Messungen verlief dabei genau wie oben beschrieben.

Bestimmung der Langzeitstabilität in Kochsalz-Lösungen mittels DLS-Messungen

Für die Charakterisierung der Langzeitstabilität in isotonischer Umgebung, wurden zwei verschieden konzentrierte Kochsalz-Lösungen hergestellt. Die Polyplexmizellen wurden

wie oben beschrieben, allerdings mit jeweils 30 μL der DNA- und Polymerstammlösungen, hergestellt. Den Proben wurden jeweils 20 μL einer 50 mM bzw. 150 mM NaCl-Lösung zugegeben. Nachdem die Lösungen inkubiert wurden, wurde an den bestimmten Zeitpunkten in einem Zeitraum von 21 Tagen je 10 μL entnommen und mit 100 μL HEPES-Puffer (10 mM, pH 7.4) verdünnt. Die Durchführung der DLS-Messungen verlief dabei genau wie oben beschrieben.

Bestimmung der reduktiven Spaltung des Disulfid-Linkers mittels DLS-Messungen

Es wurden Polyplexmizellen mit dem N/P-Verhältnis von 4 wie oben beschrieben gebildet. Nach 30 min. Inkubationszeit wurden 2 mL der DTT-Lösung (10 mM bzw. 10 μM), die zuvor im Argon-Gegenstrom entgast und in HEPES-Puffer (10 mM, pH 7.4) angesetzt wurde, zu 20 μL der Polyplexmizellen-Lösung gegeben. Die Spaltung der Disulfid-Brücke wurde mithilfe von DLS-Messungen in einem Zeitraum von 5 h verfolgt. Dabei wurden alle 3 min. Messungen des hydrodynamischen Durchmessers durchgeführt.

Bestimmung der Partikelgröße im saurem Milieu (pH 5) mittels DLS-Messungen

Es wurden Polyplexmizellen mit den N/P-Verhältnissen von 8 und 100 wie oben beschrieben gebildet. Nach 30 min Inkubationszeit wurden jeweils 200 μL der sauren Pufferlösung mit einem pH-Wert von 5 dazugegeben. Der hydrodynamische Durchmesser der Polyplexmizellen wurde mittels DLS-Messungen ermittelt.

Untersuchung der Stabilität gegen Anionen mittels Fluoreszenzspektroskopie

Die Polyplexmizellen wurden wie oben beschrieben in den N/P-Verhältnissen 8 und 100 gebildet. Die DNA-Stammlösung wurde zuvor mit 1% des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green angefärbt. Um die gewünschte Konzentration der Heparin-Lösungen einzustellen, wurde eine 100 U/mL Heparin-Lösung mit HEPES-Puffer (10 mM, pH 7.4) verdünnt. Für die

Heparin-Lösung mit $c = 0$ U/mL, wurde nur HEPES-Puffer (10 mM, pH 7.4) verwendet. Für die Bestimmung der Stabilität der Polyplexmizellen gegen Anionen, wurden die Proben mit 100 μ L der jeweiligen Heparin-Lösung ($c = 0, 10, 20, 60, 100$ U/mL) versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Es wurden außerdem noch zwei Kontrollen angefertigt. Zum einen eine Positivkontrolle aus 5 μ L der gefärbten DNA-Stammlösung pDNA und 100 μ L HEPES-Puffer (10 mM, pH 7.4). Zum anderen eine Negativkontrolle aus 1 μ L SYBR Green und 100 μ L HEPES-Puffer. Sämtliche Proben wurden unter Lichtausschluss in ein 96-Well-Plate überführt. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurde gegen den Wert der positiven Kontrolle (DNA + SYBR Green) normiert.

Untersuchung der Stabilität gegen Anionen mittels Gelelektrophorese

Die, im oben beschriebenen Abschnitt, hergestellten Proben wurden zusammen mit der Positivkontrolle (pDNA + SYBR Green) auf ein 1%-iges Agarosegel geladen. Als Elektrophorese-Puffer wurde TEA-Puffer verwendet. Als DNA-Farbstoff wurde das Agarosegel mit 5 μ L „Midori Green Advance“ angefärbt. Für die Beladung des Gels wurden jeweils 2 μ L der Proben mit 1 μ L „Quick-load purple DNA Dye“ vermischt. Anschließend wurden die Proben für 20 min bei 120 V aufgetrennt. Ein „Gel Documentation System“ (GelDoc) wurde verwendet, um die DNA-Migration sichtbar zu machen.

Zellkultivierung

Die HEK293 Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit 10% FBS, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin-Streptomycin bei 37 °C in einem Inkubator mit 5% CO₂ kultiviert.

Untersuchung der *in vitro* Zytotoxizität

Die *in vitro* Zytotoxizität der synthetisierten Polymere und gebildeten Polyplexmizellen in HEK293 Zellen wurde mithilfe eines gängigen WST (water soluble tetrazolium)-Assays ermittelt. Dafür wurden die Zellen in einem 96-Well-Plate mit einer Zelldichte von 5 000 Zellen pro Well in 100 µL DMEM full für 24 h kultiviert. Danach wurde das Zellmedium gegen 100 µL DMEM serumfrei ausgewechselt. Die Zellen wurden mit 10 µL der verschiedenen Polymerkonzentrationen (0-1000 µg ml⁻¹) oder mit 10 µL der Polyplexmizellen mit unterschiedlichen N/P-Verhältnissen versetzt. Die HEK293 Zellen wurden 24 h bei 37 °C in einem Inkubator mit 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 10 µL des CCK-8-Reagenzes versetzt und für weitere 3 h im Inkubator bei 37 °C und 5%-CO₂-Atmosphäre inkubiert. Schließlich wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm mithilfe eines Microplate Readers gemessen. Die relative Zellviabilität wurde anhand folgender Gleichung ermittelt (Gl. 1).

$$Relative\ Zellviabilität\ [\%] = \left(\frac{OD450_{sample} - OD450_{blank}}{OD450_{control} - OD450_{blank}} \right) \times 100$$

Dabei wurden die optischen Dichten OD450_{control} und OD450_{sample} ohne bzw. mit Probe ermittelt.

Qualitative Evaluation der *in vitro* Gentransfektion mithilfe von Fluoreszenzmikroskopieanalyse

Es wurde die *in vitro* Transfektion des grün fluoreszierenden Proteinplasmids (pEGFP-C1) der Polyplexmizellen, gebildet aus den Blockkationomeren, in HEK293 Zellen untersucht. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 10 000 Zellen pro Well in einer 96-Well-Plate in 100 µL frischem DMEM full Zellmedium für 24 h bei 37 °C und 5%-CO₂-Atmosphäre kultiviert. Die Polyplexmizellen wurden wie beschrieben gebildet. Das Zellmedium wurde durch 100 µL frisches Zellmedium mit oder ohne FBS erneuert und die Zellen mit 2 µL der jeweiligen Probe versetzt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit 2 µL pEGFP ohne

Transfektionsreagenz versetzt. Anschließend wurden die Zellen für weitere 48 h bei 37 °C und 5%-CO₂-Atmosphäre im Inkubator inkubiert. Die Zellen wurden schließlich mit einem DMI 4000B Mikroskop der Firma Leica mit einem 4x und 10x Zoom-Objektive fotografiert. Die Bilder wurden mit der Software ImageJ 1.51k visualisiert.

Quantitative Evaluation der *in vitro* Gentransfektion mithilfe von Durchflusszytometrie-Analyse

Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 50 000 Zellen pro Well in einer 24-Well-Plate in 500 µL frischem DMEM full Zellmedium für 24 h bei 37 °C und 5%-CO₂-Atmosphäre kultiviert. Die Polyplexmizellen wurden wie oben beschrieben gebildet. Das Zellmedium wurde durch 500 µL frisches Zellmedium mit 10% FBS erneuert und die Zellen jeweils mit 40 µL der jeweiligen Probe versetzt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit 40 µL peGFP ohne Transfektionsreagenz versetzt. Nach 24 h Inkubationszeit wurde das Medium erneut durch frisches DMEM+10%FBS ausgewechselt und die Zellen für weitere 24 h bei 37 °C und 5%-CO₂-Atmosphäre im Inkubator inkubiert. Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit 100 µL Trypsin versetzt. Nach 3 min Inkubationszeit wurde mit 500 µL kaltem Zellmedium DMEM+10%FBS homogenisiert und in ein Zentrifugenröhrchen mit 5 mL PBS-Lösung gegeben. Nach 4 min Zentrifugationszeit, wurde das feste Pellet in 100 µL FACS-Puffer (PBS+2 mM EDTA+2% FCS) gelöst und schließlich mithilfe des Durchflusszytometers untersucht.

8.2 Allgemeine Arbeitstechniken und verwendete Geräte

Lösemittel und Chemikalien

Die für die Synthesen verwendeten Lösungsmittel CH_2Cl_2 , MeCN, Et_2O , CHCl_3 und DMF wurden, falls nicht anders angemerkt, zuvor über ein Lösungsmitteltrocknungssystem des Typs *MB SPS 800* der Firma *M. Braun GmbH* über aktivierte Aluminiumoxidsäulen getrocknet. Die Entnahme erfolgte hierbei im Stickstoffstrom nach dreimaliger Evakuierung und Spülung der Vorlage mit Stickstoff. Alle weiteren trockenen Lösemittel wurden mittels Calciumchlorid, Kaliumcarbonat oder Calciumhydrid getrocknet, über 3 Å Molsieb destilliert und unter Argon-Schutzgas-Atmosphäre gelagert. Lösungsmittel technischer Qualität wurden zuvor am Rotationsverdampfer des Typs *Rotavapor 210* der Firma *Büchi* destilliert. Restliche Lösemittel wurden falls nötig unter Hochvakuum durch eine Vakuumpumpe des Typs *DUO10* der Firma *Pfeiffer Vacuum* entfernt. Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen *Sigma Aldrich*, *TCI Europe*, *Alfa Aesar*, *Acros Organics*, *ABCR* oder *Carl Roth* erworben und, sofern nicht explizit angegeben, ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Verwendete Plasmid-DNA (pDNA)

Die Plasmid-DNA **pEGFP-C1** wurde von der Firma *Tebu-Bio* in einer Giga-Präparation aus 1 L LB-Kultur mit 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin (Km) in einem Endotoxin-freien Prozess präpariert. Dabei handelte es sich um insgesamt 1 mL des Plasmids **pEGFP-C1** mit 4731 Basenpaaren (bp).

Arbeitstechniken

Alle Hydrolyse-empfindlichen Reaktionen wurden unter Argon-Schutzgas-Atmosphäre in zuvor bei 600 °C ausgeheizten Reaktionskolben unter Verwendung der Schlenk-Technik durchgeführt. Dabei wurden diese nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit

entsprechenden Septen verschlossen. Die Zugabe der flüssigen Reaktanten erfolgte unter Verwendung von Einmalspritzen und Feststoffe wurden im Argongegenstrom hinzugegeben. Bei den verwendeten Dialysemembranen handelte es sich um regenerierte Zellulose des Typs *ZelluTrans/Roth V-Series* der Firma *Carl Roth*. Diese wiesen eine Wandstärke von 20– 30 μm , eine Breite von 45 mm und einen MWCO = 1000 auf.

NMR-Spektroskopie

Die ^1H -, ^{13}C - und ^{19}F -NMR-Spektren wurden mit dem FT-NMR-Geräten der Firma *Bruker* des Typs *AVANCE HD-III Nanobay* (400 MHz), *AVANCE HD-III* (600 MHz) und mit den FT-NMR-Geräten der Firma *Agilent* des Typs *DD2* (500 MHz) aufgenommen. Die chemische Verschiebung δ wurde in parts per million (ppm) und die Kopplungskonstanten J in Hz angegeben. Des Weiteren wurde zu jedem Kernresonanzsignal in Klammern die Signalmultiplizität (s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quin = Quintett, m = Multiplett), sowie die durch Integration bestimmte Anzahl an Kernen angegeben. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm ACDLabs 12.1.

Gelpermeationschromatographie

Die GPC-Messungen wurden mit dem Gerät L-5000 LC Controller, 655A-11 Liquid Chromatograph der Firma *Merck Hitachi* durchgeführt. Das Eluent war DMF (HPLC-Grade + 5 g/L LiBr). Es wurde über eine Vorsäule (PSS GRAM) und zwei Säulen (PSS GRAM analytical 1000 \AA und PSS GRAM analytical 30 \AA) bei einer Durchflussrate von 1 mL/min und einer Temperatur von 60 $^\circ\text{C}$ gemessen. Die Kalibrierung erfolgte mit einem PMMA-Kalibrierkit der Firma *PSS* verwendet. Die Detektierung erfolgte mit dem RI Detector Smartline 2300 der Firma *Knauer*. Für die Messungen wurden Proben mit einer Konzentration von 3 mg/mL hergestellt. Vor der Messung wurden die Proben mit einem 0.2 μm PTFE-Spritzenvorsatzfilter filtriert. Die H_2O -GPC-Messungen wurden mit dem GPC-Automaten SECcurity GPC System der Firma *PSS* in Milli-Q Wasser mit 0.1 M NaNO_3 und 0.01% TFA bei

einer Flussrate von 0.5 mL/min durchgeführt. Es wurden je 100 µL Probe bei Raumtemperatur vermessen. Die eingesetzten Säulen stammen von der Firma PSS (Vorsäule + 3 Trennsäulen (1x 100 Å und 2x 3000 Å) des Typs PSS *NOVEMA Max*). Kalibriert wurde die Anlage mit einem Polyacrylamid-Standardsatz von der Firma PSS. Die Proben wurden mit einer Konzentration von 3 mg/mL angesetzt und zuvor durch einen 0.2 µm PTFE-Spritzenvorsatzfilter filtriert.

Massenspektrometrie

Die ESI-MS-Messungen wurden an einem Gerät der Firma *Waters Alliance* bei 160 °C und einer Spannung von 70 eV durchgeführt. Als Referenzsubstanz diente hierbei Perfluorokerosen. Den m/z-Werten der Molekülonen bzw. der angegebenen ausgewählten Fragmente liegen jeweils die Massenzahlen der Isotope mit der größten natürlichen Häufigkeit zugrunde.

ATR-FT-IR-Spektroskopie

Durchgeführt wurden die Messungen an einem ATR-FT-IR-Spektrometer des Typs *Tensor 27* der Firma *Bruker*. Der Messbereich reichte hierbei von 4000 cm⁻¹ bis 250 cm⁻¹, wobei die Banden in reziproken Wellenlängen in cm⁻¹ angegeben wurden. Die Spektren wurden mit der Software *Opus* ausgewertet. Die FT-IR Spektren wurden mit einem Gerät der Firma *Bruker* des Typs *Tensor 27* aufgenommen und mit dem Programm *Opus* ausgewertet.

Transmissionselektronenmikroskopie

Die TEM-Messungen wurden von Frau Monika Meuris und Herrn Volker Brandt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tiller an dem Gerät *CM200* der Firma *Philips* ausgestattet mit der Kamera *Orius SC200* der Firma *Gatan* durchgeführt. Es wurden Polyplexmizellen mit einem N/P-Verhältnis von 8 und 100 vermessen. Diese wurden in einem Verhältnis von 1:10

mit Wasser verdünnt. 20 µL einer Probe wurden als Lösung auf einen Kupfergrid aufgetragen und die Lösung wurde mit einem Filterpapier nach kurzer Zeit getrocknet. Als Kontrastierung wurde Uranylacetat verwendet.

Dynamische Lichtstreuung

Die DLS- sowie Zetapotential-Messungen erfolgten mit dem Gerät *Zetasizer Nano-ZS* der Firma *Malvern* im Arbeitskreis von Herrn Prof. Rehage oder mit dem Gerät *Zetasizer Nano-S* der Firma *Malvern* im Arbeitskreis von Herrn Prof. Tiller. Durchgeführt wurden die Messungen mit einem HeNe-Laser ($\lambda = 632 \text{ nm}$). Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *Zetasizer 6.32* von *Malvern*.

Fluoreszenzspektroskopie und Photometrie

Photometrie- und Fluoreszenzintensitätsmessungen wurden an einem *infinite M1000* der Firma *Tecan* im Arbeitskreis von Herrn Prof. Rauh durchgeführt und mit der Software *Tecan i control* ausgewertet.

Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopieanalysen wurde mit dem Gerät *EVOS FL cell imaging System* (*life technologies*) mit einem 4x und 10x Objektiv im Arbeitskreis von Herrn Dr. Dehmelt durchgeführt. Die Bilder wurden mit der Software *ImageJ 1.51k* ausgewertet und bearbeitet.

Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der prozentualen Expression des fluoreszierenden eGFP in Zellen erfolgte mit der Durchflusszytometrie, die eine quantitative Analyse von Partikeln (Dichte,

Fluoreszenz, Größe) im Flüssigkeitsstrom ermöglicht. Die Messungen wurden mit dem Gerät *Cell Sorter SH800S* der Firma *Sony* im Arbeitskreis von Herrn Prof. Summerer durchgeführt. Es wurde hierbei ein Laser mit der Wellenlänge von 488 nm verwendet.

9 Literaturverzeichnis

- [1] M. Hallek, H. Buening, U. Hacker, M. Ried, Ch. Kurzeder, C.-M. Wendtner, *Der Internist* **2001**, 42, 1306.
- [2] T. Oswald, M.D. Avery, M. Colin, M.D. MacLeod, M.D. Maclyn McCarty, *J. Exp. Med.* **1944**, 79, 137.
- [3] F. Schlenk, S. Grund, D. Fischer, *Ther. Deliv.* **2013**, 1, 95.
- [4] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737.
- [5] S. L. Ginn, A. K. Amaya, I. E. Alexander, M. Edelstein, M. R. Abedi, *J. Gene Med.* **2018**, 5, 1-16.
- [6] E.-L. Winnacker, A. Haniel, *Gentechnik: Eingriffe am Menschen. Ein Eskalationsmodell zur ethischen Bewertung = Gene technology: interventions in humans*, 4. Aufl., Utz, München, **2002**.
- [7] B. Langer, K. Cichutek, *Pharm Unserer Zeit* **2011**, 3, 254.
- [8] R. Vile, S. J. Russell, *Gene Ther.* **1994**, 2, 88.
- [9] Kenji Kawabata, Yoshinobu Takakura, Mitsuru Hashida, *Pharm Res* **1995**, 12, 825.
- [10] H. Büning, *Pharm Unserer Zeit* **2011**, 3, 194.
- [11] D. Fischer, A. Fahr, *Pharm Unserer Zeit* **2011**, 3, 212.
- [12] A. Girod, M. Ried, C. Wobus, H. Lahm, K. Leike, J. Kleinschmidt, G. Deléage, M. Hallek, *Nat Med* **1999**, 9, 1052.
- [13] D. T. CURIEL, *Annals NY Acad Sci* **1999**, 1 ANTICANCER MO, 158.
- [14] C. E. Thomas, A. Ehrhardt, M. A. Kay, *Nat Rev Genet* **2003**, 5, 346.
- [15] M. A. Kay, J. C. Glorioso, L. Naldini, *Nat Med* **2001**, 1, 33.
- [16] T. Winckler, *Pharm Unserer Zeit* **2011**, 3, 202.

- [17] L. Kaestner, A. Scholz, P. Lipp, *Bioorg Med Chem Lett* **2015**, *6*, 1171.
- [18] D. Zhi, S. Zhang, B. Wang, Y. Zhao, B. Yang, S. Yu, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *4*, 563.
- [19] M. Neu, D. Fischer, T. Kissel, *J. Gene Med.* **2005**, *8*, 992.
- [20] L. Zhu, R. I. Mahato, *Expert Opin Drug Deliv* **2010**, *10*, 1209.
- [21] J. Nguyen, F. C. Szoka, *Acc Chem Res* **2012**, *7*, 1153.
- [22] K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, *Chem Soc Rev* **2012**, *7*, 2562.
- [23] C. H. Jones, C.-K. Chen, A. Ravikrishnan, S. Rane, B. A. Pfeifer, *Mol Pharm* **2013**, *11*, 4082.
- [24] R. I. Mahato, *Biomaterials for delivery and targeting of proteins and nucleic acids*, CRC Press, Boca Raton, **2005**.
- [25] Y. Takakura, M. Nishikawa, F. Yamashita, M. Hashida, *Eur J Pharm Sci* **2001**, *1*, 71.
- [26] S. Boeckle, E. Wagner, *AAPS J* **2006**, *4*, 731-42.
- [27] V. Budker, V. Trubetskoy, J. A. Wolff, *Biopolymers* **2006**, *6*, 646.
- [28] D. v. Schaffer, N. A. Fidelman, N. Dan, D. A. Lauffenburger, *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *5*, 598.
- [29] A. C. Rinkenauer, S. Schubert, A. Traeger, U. S. Schubert, *J. Mater. Chem. B* **2015**, *38*, 7477.
- [30] B. I. Cerda-Cristerna, H. Flores, A. Pozos-Guillén, E. Pérez, C. Sevrin, C. Grandfils, *J. Controlled Release* **2011**, *3*, 269.
- [31] A. Yousefi, M. Lauwers, R. Nemes, T. van Holten, N. Babae, M. Roest, G. Storm, R. Schiffelers, E. Mastrobattista, *Pharm Res* **2014**, *11*, 3127.

- [32] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U. S. Schubert, *Angew. Chem.* **2010**, *36*, 6430.
- [33] A. Aigner, D. Fischer, T. Merdan, C. Brus, T. Kissel, F. Czubayko, *Gene Ther.* **2002**, *24*, 1700.
- [34] D. Oupicky, M. Ogris, K. A. Howard, P. R. Dash, K. Ulbrich, L. W. Seymour, *Mol Ther.* **2002**, *4*, 463.
- [35] Z. Dai, T. Gjetting, M. A. Matthebjerg, C. Wu, T. L. Andresen, *Biomaterials* **2011**, *33*, 8626.
- [36] C. Clawson, L. Ton, S. Aryal, V. Fu, S. Esener, L. Zhang, *Langmuir* **2011**, *17*, 10556.
- [37] M. Bauer, C. Lautenschlaeger, K. Kempe, L. Tauhardt, U. S. Schubert, D. Fischer, *Macromol. Biosci.* **2012**, *7*, 986.
- [38] A. El-Sayed, H. Harashima, *Mol Ther.* **2013**, *6*, 1118.
- [39] L. Yin, Z. Song, K. H. Kim, N. Zheng, H. Tang, H. Lu, N. Gabrielson, J. Cheng, *Biomaterials* **2013**, *9*, 2340.
- [40] W. Li, Y. Liu, J. Du, K. Ren, Y. Wang, *Nanoscale* **2015**, *18*, 8476.
- [41] H.-z. Jia, X.-h. Luo, H. Cheng, J. Yang, C. Li, C.-W. Liu, J. Feng, X.-Z. Zhang, R.-X. Zhuo, *J. Mater. Chem.* **2012**, *45*, 24092.
- [42] B. Layek, M. K. Haldar, G. Sharma, L. Lipp, S. Mallik, J. Singh, *Mol Pharm* **2014**, *3*, 982.
- [43] F. Wang, K. Hu, Y. Cheng, *Acta Biomater.* **2016**, 94.
- [44] B. Zhang, S. Mallapragada, *Acta Biomater.* **2011**, *4*, 1570.
- [45] B. Zhang, S. Mallapragada, *Acta Biomater.* **2011**, *4*, 1580.
- [46] J.-P. Behr, *CHIMIA* **1997**, *51*, 34.

- [47] V. A. Bloomfield, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 334.
- [48] X. Liu, J. W. Yang, D. M. Lynn, *Biomacromolecules* **2008**, *7*, 2063.
- [49] Y.-b. Lim, S.-m. Kim, H. Suh, J.-s. Park, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *5*, 952.
- [50] C. Lin, Z. Zhong, M. C. Lok, X. Jiang, W. E. Hennink, J. Feijen, J. F. J. Engbersen, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *1*, 138.
- [51] S. Taranejoo, J. Liu, P. Verma, K. Hourigan, *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, *25*, 42096-42114.
- [52] O. Boussif, J.-P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1995**, *92*, 7297.
- [53] H. Yin, R. L. Kanasty, A. A. Eltoukhy, A. J. Vegas, J. R. Dorkin, D. G. Anderson, *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *8*, 541.
- [54] A. C. Hunter, S. M. Moghimi, *Biochim Biophys Acta* **2010**, *6-7*, 1203.
- [55] C.-H. Ahn, S. Y. Chae, Y. H. Bae, S. W. Kim, *J. Controlled Release* **2002**, *1-3*, 273.
- [56] N. D. Sonawane, F. C. Szoka, A. S. Verkman, *J. Biol. Chem.* **2003**, *45*, 44826.
- [57] W. T. Godbey, M. A. Barry, P. Saggau, K. K. Wu, A. G. Mikos, *J. Biomed. Mater. Res. B* **2000**, *3*, 321.
- [58] E. Wagner, *Adv Genet* **2014**, 231.
- [59] I. Martin, C. Dohmen, C. Mas-Moruno, C. Troiber, P. Kos, D. Schaffert, U. Lächelt, M. Teixidó, M. Günther, H. Kessler et al., *Org Biomol Chem* **2012**, *16*, 3258.
- [60] R. J. Christie, N. Nishiyama, K. Kataoka, *Endocrinology* **2010**, *2*, 466.
- [61] H. C. Chiou, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 5439.
- [62] M. Ogris, S. Brunner, S. Schüller, R. Kircheis, E. Wagner, *Gene Ther.* **1999**, *6*, 595.
- [63] A. M. Krieg, A.-K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky, D. M. Klinman, *Nature* **1995**, *374*, 546.

-
- [64] S. Katayose, K. Kataoka, *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 702.
- [65] K. Kataoka, *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87*, 160.
- [66] K. Y. Kwok, D. L. Mckenzie, D. L. Evers, K. G. Rice, *J. Pharm. Sci.* **1999**, *10*, 996.
- [67] K. Itaka, K. Yamauchi, A. Harada, K. Nakamura, H. Kawaguchi, K. Kataoka, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4495.
- [68] K. Itaka, A. Harada, K. Nakamura, H. Kawaguchi, K. Kataoka, *Biomacromolecules* **2002**, *4*, 841.
- [69] K. Kataoka, *Gene Ther.* **2002**, *9*, 407.
- [70] K. Miyata, Y. Kakizawa, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, T. Watanabe, M. Kohara, K. Kataoka, *J. Controlled Release* **2005**, *1-3*, 15.
- [71] M. Kursá, G. F. Walker, V. Roessler, M. Ogris, W. Roedl, R. Kircheis, E. Wagner, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *1*, 222.
- [72] L. Wyffels, T. Verbrugghen, B. D. Monnery, M. Glassner, S. Stroobants, R. Hoogenboom, S. Staelens, *J. Controlled Release* **2016**, 63.
- [73] J. S. Lee, D. H. Go, J. W. Bae, S. J. Lee, K. D. Park, *J. Controlled Release* **2007**, *2*, 204.
- [74] S.-I. Sugahara, M. Kajiki, H. Kuriyama, T.-R. Kobayashi, *J. Controlled Release* **2007**, *1*, 40.
- [75] K. A. Janes, P. Calvo, M. J. Alonso, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *1*, 83.
- [76] X. Xu, A. K. Jha, D. A. Harrington, M. C. Farach-Carson, X. Jia, *Soft Matter* **2012**, *12*, 3280.
- [77] O. Sedlacek, B. D. Monnery, S. K. Filippov, R. Hoogenboom, M. Hruby, *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *19*, 1648.

- [78] W. Seeliger, E. Aufderhaar, W. Diepers, R. Feinauer, R. Nehring, W. Thier, H. Hellmann, *Angew Chem Int Ed Engl* **1966**, *10*, 875.
- [79] T. Kagiya, S. Narisawa, T. Maeda, K. Fukui, *J. Polym. Sci. B Polym. Lett.* **1966**, *7*, 441.
- [80] T. G. Bassiri, A. Levy, M. Litt, *J. Polym. Sci. B Polym. Lett.* **1967**, *9*, 871.
- [81] S. Kobayashi, *Prog. Polym. Sci.* **1990**, *5*, 751.
- [82] F. Wiesbrock, R. Hoogenboom, M. A. M. Leenen, M. A. R. Meier, U. S. Schubert, *Macromolecules* **2005**, *12*, 5025.
- [83] K. Aoi, M. Okada, *Prog. Polym. Sci.* **1996**, *1*, 151.
- [84] P. Dubois, O. Coulembier, J. M. Raquez (Hrsg.) *Handbook of ring-opening polymerization*, Wiley-VCH, Weinheim, **2009**.
- [85] R. Hoogenboom, *Macromol. Chem. Phys.* **2007**, *1*, 18.
- [86] N. Adams, U. S. Schubert, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *15*, 1504.
- [87] P. Goddard, L. E. Hutchinson, J. Brown, L. J. Brookman, *J. Controlled Release* **1989**, *1*, 5.
- [88] S. Zalipsky, C. B. Hansen, J. M. Oaks, T. M. Allen, *J. Pharm. Sci.* **1996**, *2*, 133.
- [89] M. C. Woodle, C. M. Engbers, S. Zalipsky, *Bioconjugate Chem.* **1994**, *6*, 493.
- [90] T. X. Viegas, M. D. Bentley, J. M. Harris, Z. Fang, K. Yoon, B. Dizman, R. Weimer, A. Mero, G. Pasut, F. M. Veronese, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *5*, 976.
- [91] R. Konradi, B. Pidhatika, A. Mühlebach, M. Textor, *Langmuir* **2008**, *3*, 613.
- [92] B. Pidhatika, J. Möller, V. Vogel, R. Konradi, *CHIMIA* **2008**, *4*, 264.
- [93] *36th annual meeting & exposition of the Controlled Release Society 2009. Copenhagen, Denmark, 18 - 22 July 2009*, Curran, Red Hook, NY, **2009**.

- [94] B. Pidhatika, M. Rodenstein, Y. Chen, E. Rakhmatullina, A. Mühlebach, C. Acikgöz, M. Textor, R. Konradi, *Biointerphases* **2012**, *1*, 1.
- [95] C.-H. Wang, C.-H. Wang, G.-H. Hsiue, *J. Controlled Release* **2005**, *1*, 140.
- [96] R. Luxenhofer, Y. Han, A. Schulz, J. Tong, Z. He, A. V. Kabanov, R. Jordan, *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *19*, 1613.
- [97] J. H. Jeong, S. H. Song, D. W. Lim, H. Lee, T. G. Park, *J. Controlled Release* **2001**, *2-3*, 391.
- [98] G.-H. Hsiue, H.-Z. Chiang, C.-H. Wang, T.-M. Juang, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *3*, 781.
- [99] D. Hertz, M. N. Leiske, T. Wloka, A. Traeger, M. Hartlieb, M. M. Kessels, S. Schubert, B. Qualmann, U. S. Schubert, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2018**, *12*, 1210.
- [100] M. N. Leiske, F. H. Sobotta, F. Richter, S. Hoepfener, J. C. Brendel, A. Traeger, U. S. Schubert, *Biomacromolecules* **2018**, *3*, 748.
- [101] A. C. Rinkenauer, L. Tauhardt, F. Wendler, K. Kempe, M. Gottschaldt, A. Traeger, U. S. Schubert, *Macromol. Biosci.* **2015**, *3*, 414.
- [102] A.-K. Trüttschler, T. Bus, M. Sahn, A. Traeger, C. Weber, U. S. Schubert, *Biomacromolecules* **2018**, *7*, 2759.
- [103] S. Xiang, H. Tong, Q. Shi, J. C. Fernandes, T. Jin, K. Dai, X. Zhang, *J. Controlled Release* **2012**, *3*, 371.
- [104] D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, T. Kissel, *Biomaterials* **2003**, *7*, 1121.
- [105] C.-H. Wang, K.-R. Fan, G.-H. Hsiue, *Biomaterials* **2005**, *16*, 2803.
- [106] D. Fischer, T. Bieber, Y. Li, H.-P. Elsässer, T. Kissel, *Pharm Res* **1999**, *8*, 1273.

- [107] K. Tappertzhofen, S. Beck, E. Montermann, D. Huesmann, M. Barz, K. Koynov, M. Bros, R. Zentel, *Macromol. Biosci.* **2016**, *1*, 106.
- [108] C. Zhu, M. Zheng, F. Meng, F. M. Mickler, N. Ruthardt, X. Zhu, Z. Zhong, *Biomacromolecules* **2012**, *3*, 769.
- [109] S. Takae, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Itaka, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, *J Am Chem Soc* **2008**, *18*, 6001.
- [110] M. Kumagai, S. Shimoda, R. Wakabayashi, Y. Kunisawa, T. Ishii, K. Osada, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, K. Nakano, *J. Controlled Release* **2012**, *3*, 542.
- [111] L. Brülisauer, M. A. Gauthier, J.-C. Leroux, *J. Controlled Release* **2014**, *195*, 147.
- [112] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, *J. Controlled Release* **2000**, *1-2*, 271.
- [113] H. Maeda, Y. Matsumura, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **1989**, *3*, 193.
- [114] R. Haag, F. Kratz, *Angew. Chem.* **2006**, *8*, 1218.
- [115] K. Greish, J. Fang, T. Inutsuka, A. Nagamitsu, H. Maeda, *Clin Pharmacokinet* **2003**, *13*, 1089.
- [116] H. Maeda, T. Sawa, T. Konno, *J. Controlled Release* **2001**, *1-3*, 47.
- [117] S. Mukherjee, R. N. Ghosh, F. R. Maxfield, *Physiol Rev* **1997**, *3*, 759.
- [118] T. Abel, F. Kreppel, M. Ogris, H. Büning, *Pharm Unserer Zeit* **2011**, *3*, 225.
- [119] R. Kircheis, E. Ostermann, M. F. Wolschek, C. Lichtenberger, C. Magin-Lachmann, L. Wightman, M. Kurasa, E. Wagner, *Cancer Gene Ther.* **2002**, *8*, 673.
- [120] M. Han, Y. Bae, N. Nishiyama, K. Miyata, M. Oba, K. Kataoka, *J. Controlled Release* **2007**, *1-2*, 38.
- [121] N. Kanayama, S. Fukushima, N. Nishiyama, K. Itaka, W.-D. Jang, K. Miyata, Y. Yamasaki, U.-i. Chung, K. Kataoka, *ChemMedChem* **2006**, *4*, 439.

- [122] K. Miyata, M. Oba, M. Nakanishi, S. Fukushima, Y. Yamasaki, H. Koyama, N. Nishiyama, K. Kataoka, *J Am Chem Soc* **2008**, *48*, 16287.
- [123] K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *1*, 113.
- [124] F.-W. Huang, J. Feng, J. Nie, S.-X. Cheng, X.-Z. Zhang, R.-X. Zhuo, *Macromol. Biosci.* **2009**, *12*, 1176.
- [125] L. Chen, H. Tian, J. Chen, X. Chen, Y. Huang, X. Jing, *J. Gene Med.* **2010**, *1*, 64.
- [126] K. Wong, G. Sun, X. Zhang, H. Dai, Y. Liu, C. He, K. W. Leong, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *1*, 152.
- [127] U. Lungwitz, M. Breunig, T. Blunk, A. Göpferich, *Eur J Pharm Biopharm* **2005**, *2*, 247.
- [128] T. Bus, C. Englert, M. Reifarth, P. Borchers, M. Hartlieb, A. Vollrath, S. Hoepfener, A. Traeger, U. S. Schubert, *J. Mater. Chem. B* **2017**, *6*, 1258.
- [129] M. E. Favretto, A. Krieg, S. Schubert, U. S. Schubert, R. Brock, *J. Controlled Release* **2015**, *1*.
- [130] K. Tappertzhofen, F. Weiser, E. Montermann, A. Reske-Kunz, M. Bros, R. Zentel, *Macromol. Biosci.* **2015**, *8*, 1159.
- [131] D. Wakebayashi, N. Nishiyama, K. Itaka, K. Miyata, Y. Yamasaki, A. Harada, H. Koyama, Y. Nagasaki, K. Kataoka, *Biomacromolecules* **2004**, *6*, 2128.
- [132] S. Osawa, K. Osada, S. Hiki, A. Dirisala, T. Ishii, K. Kataoka, *Biomacromolecules* **2016**, *1*, 354.
- [133] R. Lehner, K. Liu, X. Wang, P. Hunziker, *Biomacromolecules* **2017**, *8*, 2654.
- [134] D. Witzigmann, D. Wu, S. H. Schenk, V. Balasubramanian, W. Meier, J. Huwyler, *ACS Appl Mater Interfaces* **2015**, *19*, 10446.

- [135] H. Bludau, A. E. Czapar, A. S. Pitek, S. Shukla, R. Jordan, N. F. Steinmetz, *Eur Polym J* **2017**, 679.
- [136] J. Ulbricht, R. Jordan, R. Luxenhofer, *Biomaterials* **2014**, *17*, 4848.
- [137] Y. Olszowy, *Masterarbeit*, Dortmund, **2018**.
- [138] C. D'Andrea, D. Pezzoli, C. Malloggi, A. Candeo, G. Capelli, A. Bassi, A. Volonterio, P. Taroni, G. Candiani, *Photochem Photobiol Sci* **2014**, *12*, 1680.
- [139] B. Santos-Carballal, M. J. Swamy, B. M. Moerschbacher, F. M. Goycoolea, *J Fluoresc* **2016**, *1*, 37.
- [140] Y. Zhu, G.-P. Tang, F.-J. Xu, *ACS Appl Mater Interfaces* **2013**, *5*, 1840.
- [141] K. A. Curtis, D. Miller, P. Millard, S. Basu, F. Horkay, P. L. Chandran, *PLoS ONE* **2016**, *9*, e0158147.
- [142] T. Stylianopoulos, E.-A. Economides, J. W. Baish, D. Fukumura, R. K. Jain, *Ann Biomed Eng* **2015**, *9*, 2291.
- [143] V. Knorr, M. Ogris, E. Wagner, *Pharm Res* **2008**, *12*, 2937.
- [144] H. Petersen, P. M. Fechner, A. L. Martin, K. Kunath, S. Stolnik, C. J. Roberts, D. Fischer, M. C. Davies, T. Kissel, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *4*, 845.
- [145] G. F. Walker, C. Fella, J. Pelisek, J. Fahrmeir, S. Boeckle, M. Ogris, E. Wagner, *Mol Ther* **2005**, *3*, 418.
- [146] V. Knorr, L. Allmendinger, G. F. Walker, F. F. Paintner, E. Wagner, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *4*, 1218.
- [147] Y. Nie, M. Günther, Z. Gu, E. Wagner, *Biomaterials* **2011**, *3*, 858.
- [148] B. Brissault, A. Kichler, C. Leborgne, O. Danos, H. Cheradame, J. Gau, L. Auvray, C. Guis, *Biomacromolecules* **2006**, *10*, 2863.
- [149] S. W. Kim, *J. Controlled Release* **2002**, *79*, 271.

-
- [150] G. Saito, J. A. Swanson, K.-D. Lee, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 199.
- [151] R. Mandel, H. J. Ryser, F. Ghani, M. Wu, D. Peak, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1993**, *90*, 4112.
- [152] A. Meister, M. E. Anderson, *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, *52*, 711.
- [153] D. James Morr , D. M. Morr , *Free Radical Research* **2012**, *8*, 795.
- [154] E. P. Feener, W.-C. Shen, H. J. Ryser, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 18780.
- [155] W. Sun, P. B. Davis, *J. Controlled Release* **2010**, *1*, 118.
- [156] D. Oupick , A. L. Parker, L. W. Seymour, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *1*, 8.
- [157] V. M. Gaspar, P. Baril, E. C. Costa, D. de Melo-Diogo, F. Foucher, J. A. Queiroz, F. Sousa, C. Pichon, I. J. Correia, *J. Controlled Release* **2015**, 175.
- [158] X.-J. Cai, H.-Q. Dong, W.-J. Xia, H.-Y. Wen, X.-Q. Li, J.-H. Yu, Y.-Y. Li, D.-L. Shi, *J. Mater. Chem.* **2011**, *38*, 14639.
- [159] X. Cai, C. Dong, H. Dong, G. Wang, G. M. Pauletti, X. Pan, H. Wen, I. Mehl, Y. Li, D. Shi, *Biomacromolecules* **2012**, *4*, 1024.
- [160] J. K. Armstrong, G. Hempel, S. Koling, L. S. Chan, T. Fisher, H. J. Meiselman, G. Garratty, *Cancer* **2007**, *1*, 103.
- [161] F. C. Gaertner, R. Luxenhofer, B. Blechert, R. Jordan, M. Essler, *J. Controlled Release* **2007**, *3*, 291.
- [162] A. Bendele, *Toxicol. Sci.* **1998**, *42*, 152.
- [163] A. Baumann, D. Tuerck, S. Prabhu, L. Dickmann, J. Sims, *Drug Discov Today* **2014**, *10*, 1623.
- [164] D. G. Rudmann, J. T. Alston, J. C. Hanson, S. Heidel, *Toxicol Pathol* **2013**, *7*, 970.
- [165] Z. Liu, Z. Zhang, C. Zhou, Y. Jiao, *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *9*, 1144.

- [166] L. Wightman, R. Kircheis, V. Rössler, S. Carotta, R. Ruzicka, M. Kursa, E. Wagner, *J. Gene Med.* **2001**, *4*, 362.
- [167] F. M. Mickler, Y. Vachutinsky, M. Oba, K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, C. Bräuchle, N. Ruthardt, *J. Controlled Release* **2011**, *3*, 364.
- [168] M. Oba, K. Aoyagi, K. Miyata, Y. Matsumoto, K. Itaka, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, *Mol Pharm* **2008**, *6*, 1080.
- [169] K. Temming, R. M. Schiffelers, G. Molema, R. J. Kok, *Drug Resist Updat* **2005**, *6*, 381.
- [170] R. Mahato, W. Tai, K. Cheng, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *8*, 659.
- [171] S. Jaracz, J. Chen, L. V. Kuznetsova, I. Ojima, *Bioorg Med Chem* **2005**, *17*, 5043.
- [172] L. Bildstein, C. Dubernet, P. Couvreur, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *1-2*, 3.
- [173] G. Russell-Jones, K. McTavish, J. McEwan, J. Rice, D. Nowotnik, *J Inorg Biochem* **2004**, *10*, 1625.
- [174] S. Collina, *Med chem* **2014**, *1*.
- [175] L. Gibiansky, E. Gibiansky, *J Pharmacokinet Pharmacodyn* **2014**, *1*, 35.
- [176] T. Lammers, F. Kiessling, W. E. Hennink, G. Storm, *J. Controlled Release* **2012**, *2*, 175.
- [177] L. M. Bareford, B. R. Avaritt, H. Ghandehari, A. Nan, P. W. Swaan, *Pharm Res* **2013**, *7*, 1799.
- [178] A. Nan, H. Ghandehari, C. Hebert, H. Siavash, N. Nikitakis, M. Reynolds, J. J. Sauk, *J Drug Target* **2005**, *3*, 189.
- [179] M. Licciardi, E. F. Craparo, G. Giammona, S. P. Armes, Y. Tang, A. L. Lewis, *Macromol. Biosci.* **2008**, *7*, 615.

-
- [180] G. Cavallaro, L. Maniscalco, M. Campisi, D. Schillaci, G. Giammona, *Eur J Pharm Biopharm* **2007**, *2*, 182.
- [181] Z. S. Akdemir, H. Akçakaya, M. V. Kahraman, T. Ceyhan, N. Kayaman-Apohan, A. Güngör, *Macromol. Biosci.* **2008**, *9*, 852.
- [182] S. Chen, X. Zhao, J. Chen, J. Chen, L. Kuznetsova, S. S. Wong, I. Ojima, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *5*, 979.
- [183] J.-F. Shi, P. Wu, Z.-H. Jiang, X.-Y. Wei, *Eur J Med Chem* **2014**, 219.
- [184] A. D. Vadlapudi, R. K. Vadlapatla, D. Pal, A. K. Mitra, *AAPS J* **2012**, *4*, 832.
- [185] S. Luo, V. S. Kansara, X. Zhu, N. K. Mandava, D. Pal, A. K. Mitra, *Mol Pharm* **2006**, *3*, 329.
- [186] M. Lee, J. Jeong, D. Kim, *Biomacromolecules* **2015**, *1*, 136.
- [187] W. Zhu, Z. Song, P. Wei, N. Meng, F. Teng, F. Yang, N. Liu, R. Feng, *J Colloid Interface Sci* **2015**, 1.
- [188] J. Wang, F. Wang, F. Li, W. Zhang, Y. Shen, D. Zhou, S. Guo, *J Mater Chem B* **2016**, *17*, 2954.
- [189] A. Taheri, R. Dinarvand, F. S. Nouri, M. R. Khorramizadeh, A. T. Borougeni, P. Mansoori, F. Atyabi, *Int J Nanomedicine* **2011**, 1863.
- [190] W. Yang, M. Wang, L. Ma, H. Li, Le Huang, *Carbohydr Polym* **2014**, 720.
- [191] T. Minko, P. V. Paranjpe, B. Qiu, A. Lalloo, R. Won, S. Stein, P. J. Sinko, *Cancer Chemother Pharmacol* **2002**, *2*, 143.
- [192] C. Cheng, H. Wei, B.-X. Shi, H. Cheng, C. Li, Z.-W. Gu, S.-X. Cheng, X.-Z. Zhang, R.-X. Zhuo, *Biomaterials* **2008**, *4*, 497.
- [193] V. K. Yellepeddi, A. Kumar, S. Palakurthi, *Anticancer Res.* **2009**, *29*, 2933.

- [194] K. Na, B. Lee, K.-H. Park, E.-K. Shin, Y.-B. Lee, H.-K. Choi, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, *2*, 165.
- [195] M. P. Xiong, M. L. Forrest, A. L. Karls, G. S. Kwon, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *3*, 746.
- [196] H. Lee, T. H. Kim, T. G. Park, *J. Controll. Rel.* **2002**, *83*, 109.
- [197] L. Severa, L. Adriaenssens, J. Vávra, D. Šaman, I. Císařová, P. Fiedler, F. Teplý, *Tetrahedron* **2010**, *19*, 3537.
- [198] V. Breker, H. Sak, G. Baracchi-Krause, N. Krause, *Tetrahedron Lett.* **2015**, *23*, 3390.
- [199] V. Breker, *Dissertation*, Dortmund, **2013**.
- [200] X. Wang, L. Liu, Y. Luo, H. Zhao, *Langmuir* **2009**, *2*, 744.
- [201] D.-Z. Chen, C.-X. Jing, J.-Y. Cai, J.-B. Wu, S. Wang, J.-L. Yin, X.-N. Li, L. Li, X.-J. Hao, *J Nat Prod* **2016**, *1*, 180.
- [202] P. B. Tchounwou, C. Newsome, J. Williams, K. Glass, *Met Ion Biol Med* **2008**, *10*, 285.
- [203] M. Oba, S. Fukushima, N. Kanayama, K. Aoyagi, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Kataoka, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *5*, 1415.
- [204] K. D. Park, P. Morieux, C. Salomé, S. W. Cotten, O. Reamtong, C. Eyers, S. J. Gaskell, J. P. Stables, R. Liu, H. Kohn, *J Med Chem* **2009**, *21*, 6897.
- [205] J. Jin, D. Wu, P. Sun, L. Liu, H. Zhao, *Macromolecules* **2011**, *7*, 2016.
- [206] W. T. Godbey, K. K. Wu, A. G. Mikos, *J. Controlled Release* **1999**, *2-3*, 149.
- [207] Fraunhofer IGB, "Biologische Beurteilung von Medizinprodukten – prüfungen auf in-vitro Zytotoxizität nach DIN ISO 10993-5", zu finden unter www.igb.fraunhofer.de.

10 Anhang

10.1 Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Erläuterungen

Im Text bezeichnen hochgestellte arabische Ziffern in eckigen Klammern Literaturhinweise. Folgende Abkürzungen wurden im Text und in den Formelzeichnungen verwendet:

Abkürzungsverzeichnis

abs.	absoluiert, für trockene Lösungsmittel
ACN	Acetonitril
b	Block
BLA-NCA	β -Benzyl-L-asparaginsäure- <i>N</i> -carboxyanhydrid
cmc	engl.: critical micelle concentration (Mizellbildungskonzentration)
CROP	engl.: cationic ring opening polymerization (kationisch ringöffnende Polymerisation)
Cu	Kupfer
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DET	Diethylentriamin
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylendiamin
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMEM	Dulbeccos's Modified Eagle Medium
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOX	Doxorubicin
DTT	Dithiothreitol
EDA	Ethylendiamin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	engl.: enhanced green fluorescence protein
EMA	Europäische Arzneimittelagentur
EPR	engl.: enhanced permeability and retention (erhöhte Permeabilität und Retention)
et al.	et altera
FBS	fetal bovine serum
FDA	engl.: food and drug administration (Behörde der Vereinigten Staaten für Lebens- und Arzneimittel)
FT-IR	Fouriertransformation-Infrarot
GFP	engl.: green fluorescence protein
GPC	Gelpermeationschromatographie
GSH	Glutathion
HEK	engl.: human embryonic kidney
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ICP	Induziert gekoppeltes Plasma
MeCN	Acetonitril
MS	Massenspektroskopie

MWCO	engl.: molecular weight cut off
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
NCA	α -Aminosäure- <i>N</i> -carboxyanhydrid
NMR	engl.: nuclear magnetic resonance (Kernmagnetresonanz)
No.	Nummer
N/P	Stickstoff zu Phosphor Verhältnis
OES	Optische Emissionsspektroskopie
OTf	Triflat
P	Poly
PAsp	Poly(asparaginsäure)
PBLA	Poly(β -Benzyl-L-asparaginsäure)
pDNA	Plasmid-Desoxyribonukleinsäure
PEI	Poly(ethylenimin)
PEG	Poly(ethylenglycol)
pen-strep	Penicilin-Streptavidin
PEtOx	Poly(-2-ethyl-2-oxazolin)
pK_s	Dekadisch-logarithmische Säurekonstante
POx	Poly(-2-oxazolin)
ppm	engl.: parts per million
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
si-RNA	small interfering Ribonukleinsäure

TEA	Triethylenamin
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
theor.	theoretisch
Wdh.	Wiederholungseinheiten

Symbolverzeichnis

c	Konzentration
°C	Grad Celsius
δ	chemische Verschiebung
d_h	hydrodynamischer Durchmesser
\bar{D}	Polydispersitätsindex
eq.	Äquivalent
g	Gramm
h	Stunde
λ	Wellenlänge
Hz	Hertz
M	Molar
min	Minute
mM	Mili-Molar
M_N	zahlengemittelte Molmasse
nm	Nanometer
t	Zeit
T	Temperatur

wt% Gewichtsprozent

μ micro

10.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Prinzip der Gentherapie gegliedert in <i>in vivo</i> Methode (A) und <i>ex vivo</i> Methode (B). ^[10]	- 4 -
Abbildung 2 Schematische Darstellung der DNA-Kondensation durch elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Polykation zur Bildung einer Polyplexmizelle (PM). ^[22] ...	- 8 -
Abbildung 3 Schematische Darstellung der fünf Hauptherausforderungen für eine erfolgreiche Gentransfektion: (A) Bildung eines stabilen Komplexes, (B) Hämkompatibilität, (C) Zellaufnahme, (D) endosomaler Austritt und (E) Eintritt in den Zellkern. ^[3]	- 9 -
Abbildung 4 Prinzip des Protonen-Schwamm-Effektes von pH-sensitiven Polymeren im Endosom. ^[46]	- 14 -
Abbildung 5 Lösungsansätze zur Modifikation nicht-viraler kationischer Vektoren für einen erfolgreichen Gentransfer. ^[29]	- 16 -
Abbildung 6 Gegenüberstellung der Strukturformel von Poly(ethylenglycol) (PEG) und Poly(2-oxazolin) (POx).....	- 19 -
Abbildung 7 Schematische Darstellung von Polyplex (oben) vs. Polyplexmizelle (unten). ^[29]	- 22 -
Abbildung 8 Schematische Darstellung des EPR-Effektes. ^[114]	- 26 -
Abbildung 9 Endozytotische Wege für die zelluläre Aufnahme von Nano- und Makromolekülen. ^[114]	- 27 -
Abbildung 10 Polymerstrukturen von P[Asp(DET)] und linearem PEI.	- 29 -
Abbildung 11 Protonierte Struktur von Polyplexmizellen aus P[Asp(DET)] in Abhängigkeit der pH-Änderung in der zellulären Umgebung. ^[22]	- 30 -
Abbildung 12 Zielstruktur der biokompatiblen Blockkationere.....	- 37 -

Abbildung 13 Schematische Darstellung der Polyplexmizelle aus dem Blockkatiomer $\text{PMOx}_n\text{-}b\text{-P[Asp(DET)]}_m$	- 38 -
Abbildung 14 (A) $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von PE1 in CDCl_3 ; (B) GPC-Chromatogramme und Polydispersitätsindices von PE1-PE3	- 41 -
Abbildung 15 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Blockcopolymers $\text{PMOx}_{82}\text{-}b\text{-PBLA}_{24}$ (PP4) in DMSO-d_6	- 44 -
Abbildung 16 (A) IR-Spektren des Makroinitiators PE3 (blau) und des Blockcopolymers PP3 (rot); (B) GPC-Chromatogramme des Makroinitiators PE3 (blau) und des Blockcopolymers PP4 (rot).	- 45 -
Abbildung 17 (A) $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Blockkatiomers P4 in D_2O ; (B) IR-Spektren des Blockcopolymers PP2 (blau) und des Blockkatiomers P2 (rot).	- 47 -
Abbildung 18 (A) Gelelektrophorese der Polyplexmizellen aus P1/peGFP (links) und P1/pCherry (rechts) jeweils in der Konzentration $200\text{ ng}/\mu\text{L}$; (B) SYBR Green Ausschluss-Assay mit P1/peGFP -Nanokomplexen in der Konzentration $200\text{ ng}/\mu\text{L}$	- 51 -
Abbildung 19 DLS-Messungen zur Untersuchungen der (A) Langzeitstabilität (HEPES-Puffer (pH 7.4) und (B) Stabilität der Polyplexmizellen P3/peGFP in Kochsalz-Lösungen (0.05 M und 0.15 M NaCl).	- 55 -
Abbildung 20 TEM-Aufnahmen der Polyplexmizellen P3/peGFP mit $\text{N/P} = 8$. Die Aufnahmen wurden von Frau Monika Meuris im Arbeitskreis von Prof. J. Tiller angefertigt.	- 56 -
Abbildung 21 (A) Hydrodynamischer Durchmesser der P2/pDNA -Komplexe in Abhängigkeit des N/P -Verhältnisses; (B) Hydrodynamischer Durchmesser der Polyplexmizellen P2-P4/pDNA in Abhängigkeit des N/P -Verhältnisses.	- 57 -
Abbildung 22 Messungen des Zetapotentials der Polyplexe in Abhängigkeit der N/P -Verhältnisse.	- 58 -

Abbildung 23 Zellviabilität der HEK293 Zellen nach Inkubation mit (A) P3 und (B) P3/pDNA-Komplexen bestimmt mithilfe des MTT-Assays.	- 60 -
Abbildung 24 Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen der transfizierten HEK293 Zellen mit den Polyplexmizellen aus den Blockkatiomeren P2-P4 mit den N/P-Verhältnissen 20-300 nach 48 h Inkubation.	- 62 -
Abbildung 25 (A) Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen und (B) relative Fluoreszenzintensitäten der GFP-positiven Zellen transfiziert mit P3/pDNA-Komplexen in serumfreien DMEM und mit DMEM mit 10% FBS.	- 64 -
Abbildung 26 Zusammenfassende Übersicht der erfolgreich synthetisierten Blockkatiomere P1-P4 und ihre analytischen Daten.	- 65 -
Abbildung 27 Zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse mit den Polyplexmizellen aus den Blockkatiomeren P1-P4	- 66 -
Abbildung 28 Zielstruktur der reduktiv-spaltbaren Blockkatiomere.	- 78 -
Abbildung 29 Schematische Darstellung der Polyplexmizelle mit einer reduktiv-spaltbaren PEtOx-Hülle.	- 79 -
Abbildung 30 (A) $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des Homopolymers PEtOx ₄₁ -SS-NH ₂ (PE2S); (B) GPC-Chromatogramme der Homopolymere PEtOx-SS-NH ₂ (PE1S (in rot), PE2S (in blau)).	- 82 -
Abbildung 31 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Blockcopolymers PEtOx ₄₁ -SS-PBLA ₃₀ (PP2S) in dmsd ₆	- 84 -
Abbildung 32 (A) IR-Spektren des Makroinitiators PE1S (blau) und des Blockcopolymers PP1S (rot); (B) GPC-Chromatogramme des Makroinitiators PE1S (blau) und des Blockcopolymers PP1S (rot).	- 85 -
Abbildung 33 (A) $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Blockkatiomers P1S in D ₂ O; (B) IR-Spektren des Blockcopolymers PP2S (blau) und Blockkatiomers P2S (rot).	- 88 -

-
- Abbildung 34** (A) Gelelektrophorese der Polyplexmizellen aus **P1S** (links oben), **P2S** (links unten), **P1** (rechts oben) und **P2/pDNA** (rechts unten)..... - 93 -
- Abbildung 35** SYBR Green Ausschluss-Assay mit den Polyplexmizellen aus den reduktiv-spaltbaren Blockkationeren **P1S** (blau) und **P2S** (rot) und den Referenzpolymeren **P1** (hellblau) und **P2** (magenta)..... - 94 -
- Abbildung 36** Ermittlung der Langzeitstabilität mithilfe des SYBR Green Ausschluss-Assays der Polyplexmizellen aus den reduktiv-spaltbaren Blockkationeren **P1S** (oben links) und **P2S** (oben rechts) und deren Referenzpolymeren **P1** (unten links) und **P2** (unten rechts) in einem Zeitraum von 28 Tagen. - 97 -
- Abbildung 37** DLS-Messungen zur Untersuchungen der Langzeitstabilität der Polyplexmizellen aus den reduktiv-spaltbaren Blockkationeren **P1S** (blau) und **P2S** (rot) und den Referenzpolymeren **P1** (hellblau) und **P2** (magenta) in den N/P-Verhältnissen von 8 (links) und 100 (rechts). - 98 -
- Abbildung 38** Langzeitstabilität der Polyplexmizellen mit einem N/P-Verhältnis von 8 und 100 in 50 mM (links) und 150 mM NaCl-Lösung (rechts). - 99 -
- Abbildung 39** TEM-Aufnahmen der Polyplexmizellen mit N/P = 8 und N/P = 100. Die Aufnahmen wurden angefertigt von Herrn Volker Brandt im Arbeitskreis von Prof. J. Tiller. - 102 -
- Abbildung 40** Hydrodynamischer Durchmesser der Polymer/pDNA-Komplexe in Abhängigkeit des N/P-Verhältnisses. - 103 -
- Abbildung 41** Zetapotential der Polyplexmizellen in Abhängigkeit des N/P-Verhältnisses. - 105 -
- Abbildung 42** Hydrodynamischer Durchmesser der Polyplexmizellen nach Zugabe der DTT-Lösungen in Abhängigkeit der Inkubationszeit. - 108 -

Abbildung 43 Hydrodynamischer Durchmesser der Polyplexmizellen in wässrig saurer Puffer-Lösung mit pH = 5. - 111 -

Abbildung 44 Schematische Darstellung der Größenänderung von Polyplexmizellen in pH = 5.^[100] PEtOx-Polymer ist in blau und der kationische P[Asp(DET)]-Block ist in rot dargestellt. - 112 -

Abbildung 45 Heparin-Assay der Polyplexmizellen mit N/P = 8 detektiert mit Gelelektrophorese (links) und Fluoreszenzintensität (rechts). - 114 -

Abbildung 46 Heparin-Assay der Polyplexmizellen mit N/P = 100 detektiert mit Gelelektrophorese (links) und Fluoreszenzintensität (rechts). - 115 -

Abbildung 47 Zellviabilität der HEK293 Zellen nach Inkubation mit den Blockkationeren (links) und Polymer/pDNA-Komplexen (rechts) bestimmt mithilfe eines CCK-Zellviabilität-Assays. - 116 -

Abbildung 48 Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen der transfizierten HEK293 Zellen mit Polyplexmizellen in den N/P-Verhältnissen 20-300 nach 48 h Inkubationszeit. - 118 -

Abbildung 49 Transfektionseffizienz der Polyplexmizellen analysiert *via* Durchflusszytometrie. - 119 -

Abbildung 50 Synthetisierte, reduktiv-spaltbare Blockkationere **P1S** und **P2S** und ihre analytischen Daten. - 120 -

Abbildung 51 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse mit **P1S**/pDNA- und **P2S**/pDNA-Komplexen. - 121 -

Abbildung 52 Zielstruktur des mit Biotin-funktionalisierten Blockkationers. - 134 -

Abbildung 53 Schematische Darstellung der Polyplexmizelle mit Biotin-Einheiten auf der PEtOx-Schale für den aktiven Transport. - 135 -

Abbildung 54 Synthese des Triflatinitiators Pent-4-ynyltrifluormethansulfonsäure.- 139 -

- Abbildung 55** Synthese des Biotin-Azid-Derivats aus 3-Azidopropylamin und Biotin.- 139 -
-
- Abbildung 56** (A)¹H- und (B)¹³C-NMR-Spektren von 3-Azidopropylamin in CDCl₃. ... - 140 -
- Abbildung 57** ¹H-NMR Spektren des Biotin-NHS- (blau) und Biotin-Azid-Derivats (grün) in DMSO-d₆. - 141 -
- Abbildung 58** FT-IR-Spektren des Biotin-NHS-(blau) und Biotin-Azids-Derivats (rot).- 142 -
-
- Abbildung 59** Synthese der PEtOx_n-Homopolymere (**PE1**, **PE1B**) mit endständiger Alkin-Funktion und primärer Amin-Gruppe..... - 143 -
- Abbildung 60** (A) ¹H-NMR-Spektrum (in CDCl₃) und (B) GPC-Chromatogramm des Alkin-funktionalisierten Homopolymers PEtOx₃₅-NH₂ (**PE1A**)..... - 144 -
- Abbildung 61** Synthese der Blockcopolymere PEtOx_n-*b*-PBLA_m (**PP1A**, **PP1B**) mit einer endständigen Alkin-Funktion und **PE1A** bzw. **PE1B** als Makroinitiatoren. - 145 -
- Abbildung 62** (A) ¹H-NMR-Spektrum und (B) GPC-Chromatogramm des Blockcopolymers **PP1A**..... - 146 -
- Abbildung 63** Kupfer-katalysierte Click-Reaktion am Blockcopolymer **PP1A** und **PP1B** zur polymeranalogen Einführung der Biotin-Einheit..... - 148 -
- Abbildung 64** ¹H-NMR-Spektrum des Biotin-modifizierten Blockcopolymers PEtOx₃₅-*b*-PBLA₂₀ (**PP1.1A**) in DMSO-d₆. - 149 -
- Abbildung 65** (A) IR-Spektren des Biotin-Azid-Derivats (blau) und des Biotin-modifizierten Blockcopolymers **PP1.1.A** (rot); (B) GPC-Chromatogramme des Blockcopolymers **PP1A** (schwarz) und des Biotin-modifizierten Blockcopolymers **PP1.1A** (rot). - 150 -
- Abbildung 66** ¹H-NMR-Spektrum des Biotin-modifizierten Blockkationomers **P1A** in D₂O. . - 151 -

Abbildung 67 Vergleich der IR-Spektren des Biotin-modifizierten Blockcopolymers **P1.1A** (blau) und des Biotin-modifizierten Blockkationomers **P1A** (rot). - 152 -

Abbildung 68 (A) Gelelektrophorese und (B) Fluoreszenzspektroskopie des SYBR-Green Ausschluss-Assays der nativen und komplexierten pDNA aus Biotin-PEtOx₃₅-*b*-PAsp(DET)₂₀ (**P1**) und PEtOx₄₄-*b*-PAsp(DET)₃₁ (**P2**) mit steigendem N/P-Verhältnis. - 156 -

Abbildung 69 (A) Fluoreszenzspektroskopie des SYBR-Green Ausschluss-Assays und (B) DLS-Messungen der Polyplexmizellen aus **P1** und **P2** zur Ermittlung der Langzeitstabilität in HEPES-Puffer (10 mM, pH 7.4)..... - 158 -

Abbildung 70 DLS-Messungen des hydrodynamischen Durchmessers der Polyplexmizellen in 50 mM (links) und 150 mM wässriger NaCl-Lösungen zur Untersuchung der Stabilität gegen Salz-induzierte Aggregation..... - 160 -

Abbildung 71 TEM-Analyse der Polyplexmizellen aus **P1** und **P2** mit einem N/P-Verhältnis von 100. Die Aufnahmen wurden angefertigt von Herrn Volker Brandt im Arbeitskreis von Prof. J. Tiller..... - 161 -

Abbildung 72 DLS-Messungen des (A) hydrodynamischen Durchmessers (d_h) und des (B) Zetapotentials der Polyplexmizellen aus **P1** und **P2** mit zunehmenden N/P-Verhältnisses. - 162 -

Abbildung 73 DLS-Messungen zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers (d_h) der Polyplexmizellen aus **P1** und **P2** in Puffer-Lösungen mit pH 5 und pH 7.4. . - 165 -

Abbildung 74 Untersuchung der Freisetzung der DNA aus den Polyplexmizellen mit N/P = 8 und N/P = 100 in einer Austauschreaktion mit Heparin mittels Gelelektrophorese. - 166 -

Abbildung 75 Untersuchung der Freisetzung der DNA aus den Polyplexmizellen mit N/P = 8 und N/P = 100 in einer Austauschreaktion mit Heparin mittels Fluoreszenzintensitätsmessungen..... - 167 -

Abbildung 76 Zellviabilität-Assay in HEK293 Zellen mit (A) dem Biotin-funktionalisierten Blockkatiomer P1 und dem Referenzpolymer P2 und (B) den Polyplexmizellen aus P1 und P2	- 168 -
Abbildung 77 Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen der mit P1 /peGFP- und P2 /peGFP-Komplexen transfizierten HEK293 Zellen nach 48 h Inkubationszeit.....	- 170 -
Abbildung 78 Durchflusszytometrie-Messungen der transfizierten HEK293 Zellen mit P1 /peGFP- und P2 /peGFP-Komplexen nach 48 h Inkubationszeit.....	- 171 -
Abbildung 79 Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen der transfizierten HEK293 Zellen mit Polyplexmizellen aus P1 und P2 in serumfreien und serumhaltigen DMEM-Zellmedium nach 48 h Inkubationszeit.....	- 172 -
Abbildung 80 Relative Fluoreszenzintensitäten der GFP-positiven Zellen mit P1 /pDNA und P2 /pDNA-Komplexen nach 48 h Inkubation in serumfreien und serumhaltigen DMEM-Medium.	- 173 -
Abbildung 81 Synthetisierten Biotin-funktionalisierten Blockkatiomere P1A und P1B und ihre analytischen Daten.....	- 174 -
Abbildung 82 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse mit Biotin-funktionalisierten Polyplexmizellen.	- 175 -
Abbildung 83 Zusammenfassende Übersicht der im Kapitel 4 erfolgreich synthetisierten Blockkatiomere P1-P4 und ihre analytischen Daten.....	- 190 -
Abbildung 84 Schematische Darstellung der synthetisierten Blockkatiomere mit einer Biotin-Einheit (links) und einem reduktiv spaltbaren Disulfid-Linker (rechts) zur Steigerung der Gentransfereffizienz.....	- 192 -
Abbildung 85 Schematische Darstellung der Strukturen der gebildeten Polyplexmizellen.	- 193 -

Abbildung 86 Vergleich der Komplexierungskraft von Biotin-PEtOx₃₅-*b*-P[Asp(DET)]₂₂ (**P1**), PEtOx₄₁-SS-P[Asp(DET)]₃₀ (**P2S**) und PEtOx₄₄-*b*-P[Asp(DET)]₃₁ (**P2**)..... - 194 -

Abbildung 87 DLS-Messungen des hydrodynamischen Durchmessers (oben) und TEM-Analysen (unten) der Polyplexmizellen aus Biotin-PEtOx₃₅-*b*-P[Asp(DET)]₂₂ (**P1**), PEtOx₄₁-SS-P[Asp(DET)]₃₀ (**P2S**) und PEtOx₄₄-*b*-P[Asp(DET)]₃₁ (**P2**)..... - 195 -

Abbildung 88 DLS-Messungen des hydrodynamischen Durchmessers der Polyplexmizellen aus Biotin-PEtOx₃₅-*b*-P[Asp(DET)]₂₂ (**P1**), PEtOx₄₁-SS-P[Asp(DET)]₃₀ (**P2S**) und PEtOx₄₄-*b*-P[Asp(DET)]₃₁ (**P2**) in 150 mM wässriger NaCl-Lösung (links) und in Puffer-Lösung mit pH 5 und pH 7.4 (rechts). - 197 -

Abbildung 89 Verhalten der DET-Seitenkette in 150 mM wässriger NaCl-Lösung (links) und in Puffer-Lösung mit pH = 5 (rechts).^[141] - 198 -

Abbildung 90 Bestimmung des (A) Zetapotentials, der (B) Zellviabilität und der (C) Transfektionseffizienz der Polyplexmizellen. - 199 -

10.3 Schemataverzeichnis

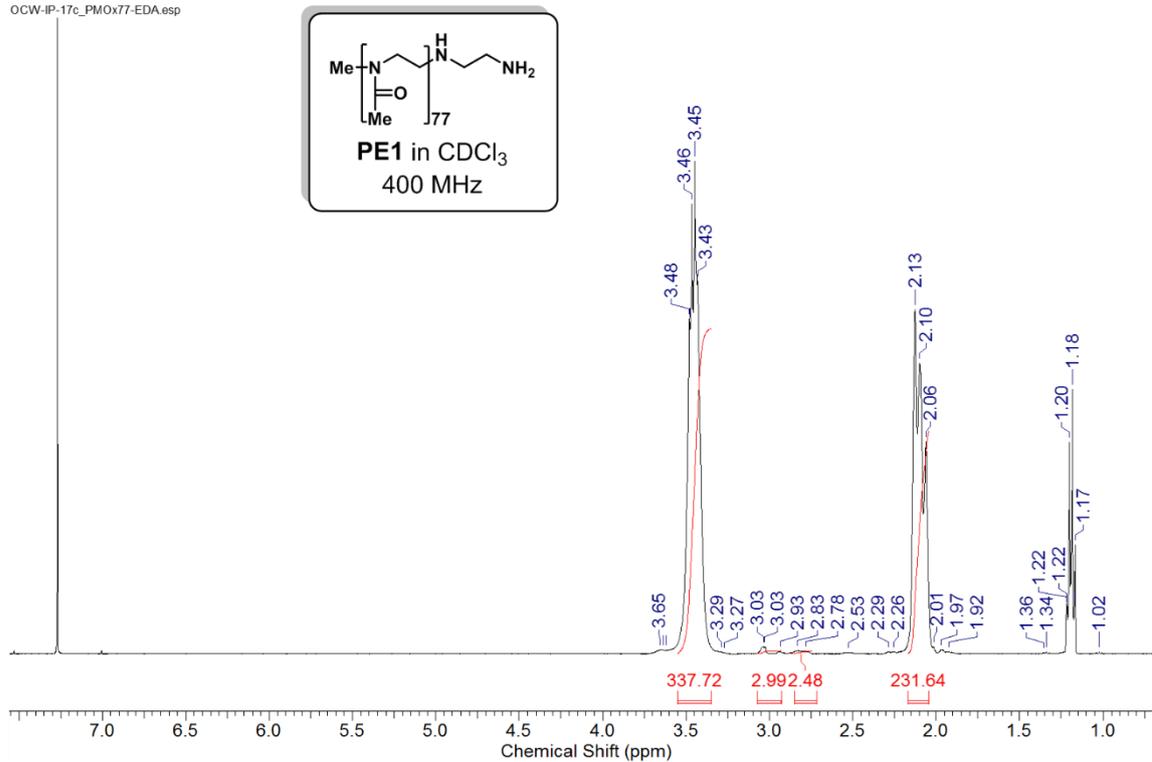
- Schema 1** Schematische Darstellung der Zielsetzung die Gentransfereffizienz zu verbessern ohne die Zytotoxizität zu erhöhen..... - 33 -
- Schema 2** Schematische Darstellung der einzelnen Untersuchungen der Polyplexmizellen nach den bekannten biologischen Barrieren (**A-E**) für nicht-virale Genvektoren..... - 34 -
- Schema 3** Syntheschema zur Darstellung der Blockkatiomere $\text{PMOx}_n\text{-}b\text{-P[Asp(DET)]}_m$ (**P1-P4**). - 40 -
- Schema 4** Synthese der reaktiv-spaltbaren $\text{PEtOx}_n\text{-SS-P[Asp(DET)]}_m$ Blockkatiomere (**P1S, P2S**) und der Referenzpolymere $\text{PEtOx}_n\text{-}b\text{-P[Asp(DET)]}_m$ (**P1, P2**). - 80 -
- Schema 5** Schematische Darstellung der Biotin-modifizierten Blockkatiomere **P1A, P1B**.- 137 -

10.4 Tabellenverzeichnis

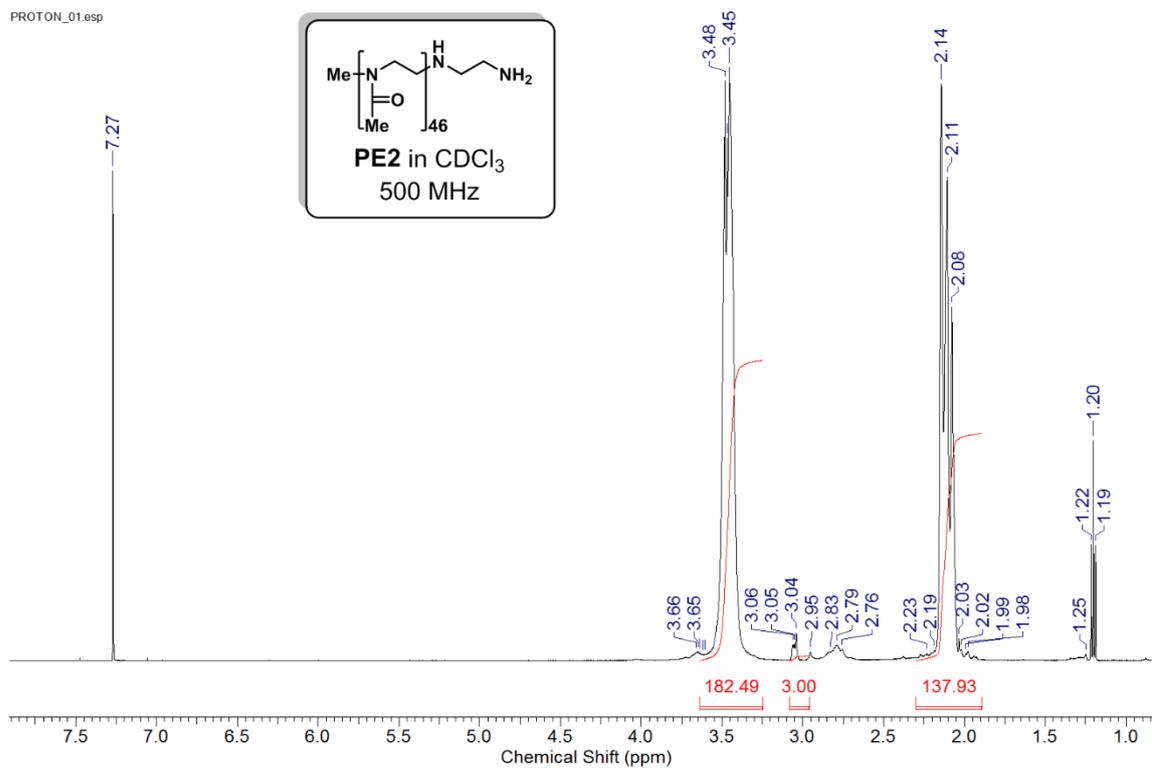
Tabelle 1 Eigenschaften der drei wichtigsten Vektoren in Gentherapiestudien. ^[1,7]	- 6 -
Tabelle 2 Analytischen Daten der Homopolymere PMOx _n PE1-PE3	- 42 -
Tabelle 3 Analytische Daten der Blockcopolymeren PMOx _n - <i>b</i> -PBLA _m PP1-PP4	- 45 -
Tabelle 4 Analytischen Daten der Blockkatiomere PMOx _n - <i>b</i> -P[Asp(DET)] _m P1-P4	- 48 -
Tabelle 5 Analytischen Daten der Homopolymere PEtOx _n -SS-NH ₂ (PE1S, PE2S) und der Referenzpolymere PEtOx _n -NH ₂ (PE1, PE2).	- 82 -
Tabelle 6 Analytische Daten der Blockcopolymeren PEtOx _n -SS-PBLA _m (PP1S, PP2S) und der Referenzpolymere PEtOx _n - <i>b</i> -PBLA _m (PP1, PP2).....	- 85 -
Tabelle 7 Analytische Daten der Blockkatiomere PEtOx _n -SS-P[Asp(DET)] _m (P1S, P2S) und Referenzpolymere PEtOx _n - <i>b</i> -P[Asp(DET)] _m (P1, P2).	- 89 -
Tabelle 8 Analytische Daten der Alkin-funktionalisierten Homopolymere PEtOx _n -NH ₂ (PE1A, PE1B).	- 144 -
Tabelle 9 Analytische Daten der Alkin-funktionalisierten Blockcopolymeren PEtOx _n - <i>b</i> -PBLA _m (PP1A, PP1B).....	- 146 -
Tabelle 10 Analytische Daten der Biotin-modifizierten Blockcopolymeren PP1.1A und PP1.1B	- 150 -
Tabelle 11 Analytische Daten der Biotin-modifizierten Blockkatiomere PEtOx _n - <i>b</i> -P[Asp(DET)] _m (P1A, P1B) und des Referenzpolymers P2	- 152 -
Tabelle 12 Zytotoxizitätsskala für <i>in vitro</i> Zytotoxizitätsprüfung in Anlehnung an die DIN EN ISO 10993-5. ^[207]	- 200 -

10.5 NMR-Spektren

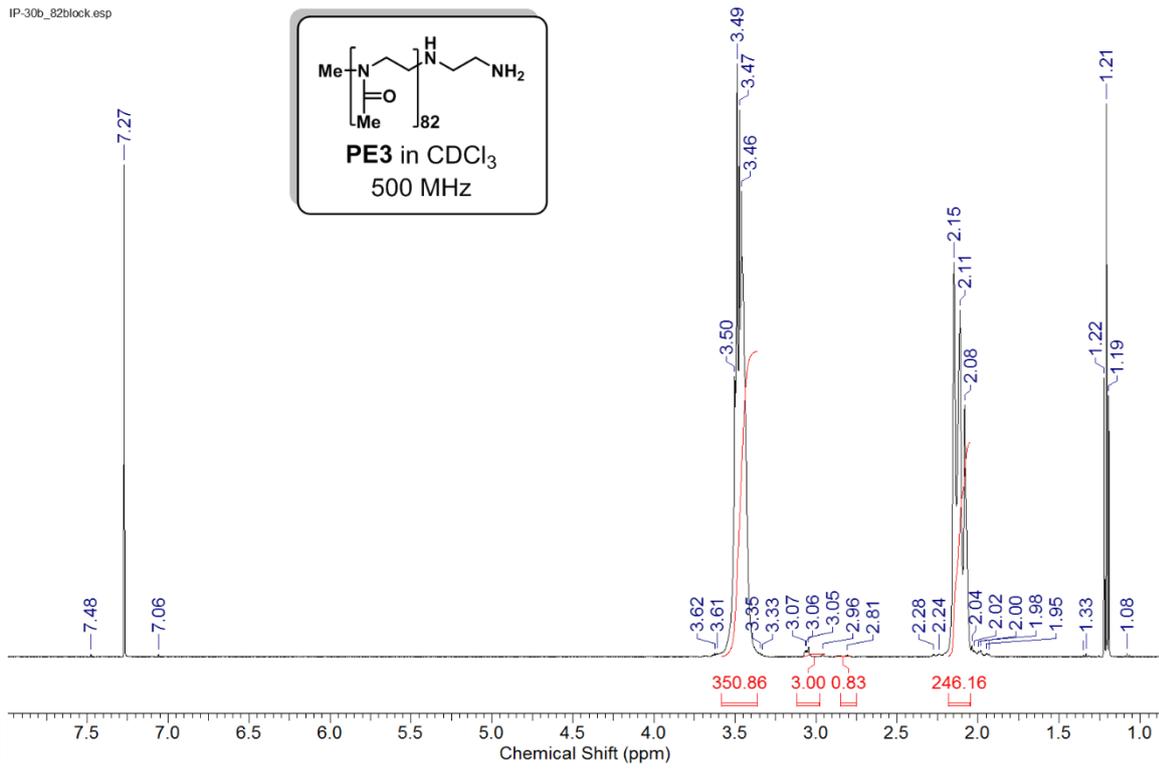
OCW-IP-17c_PMOx77-EDA.esp



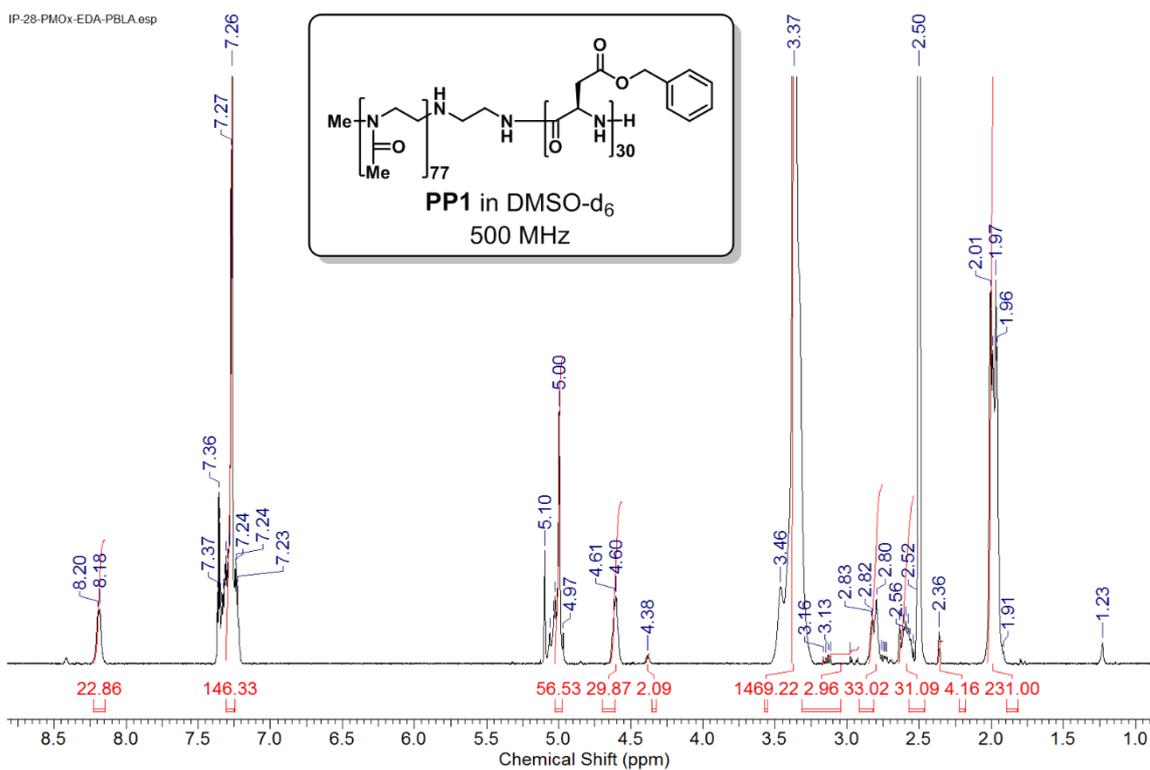
PROTON_01.esp



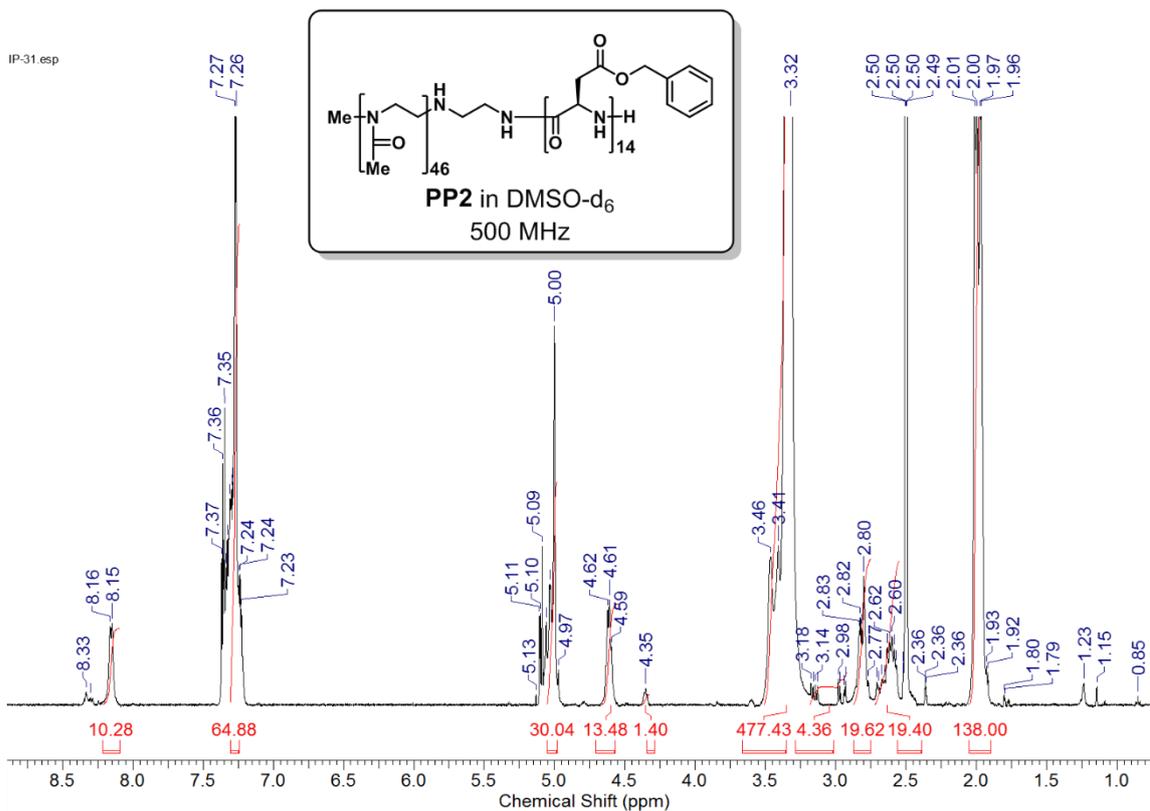
IP-30b_82block.esp

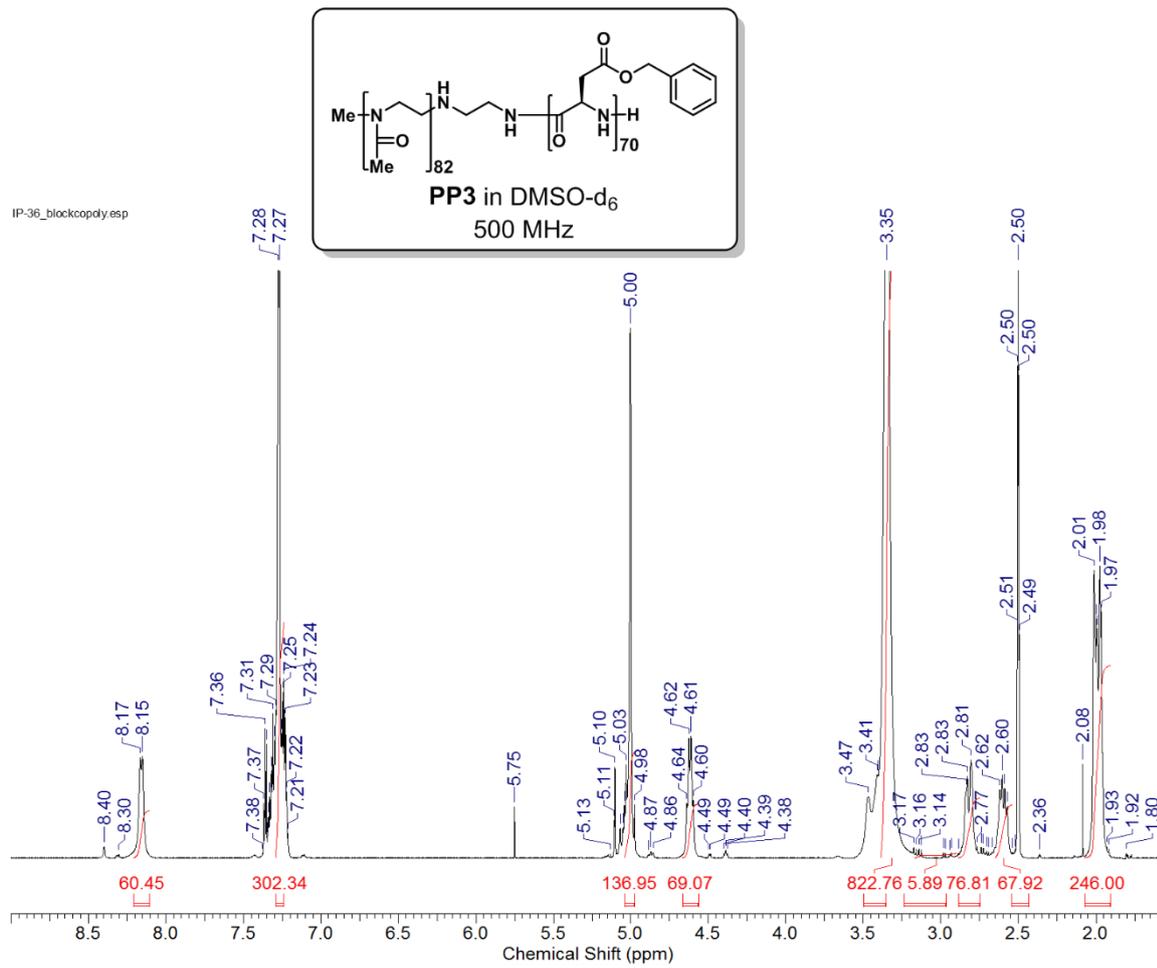


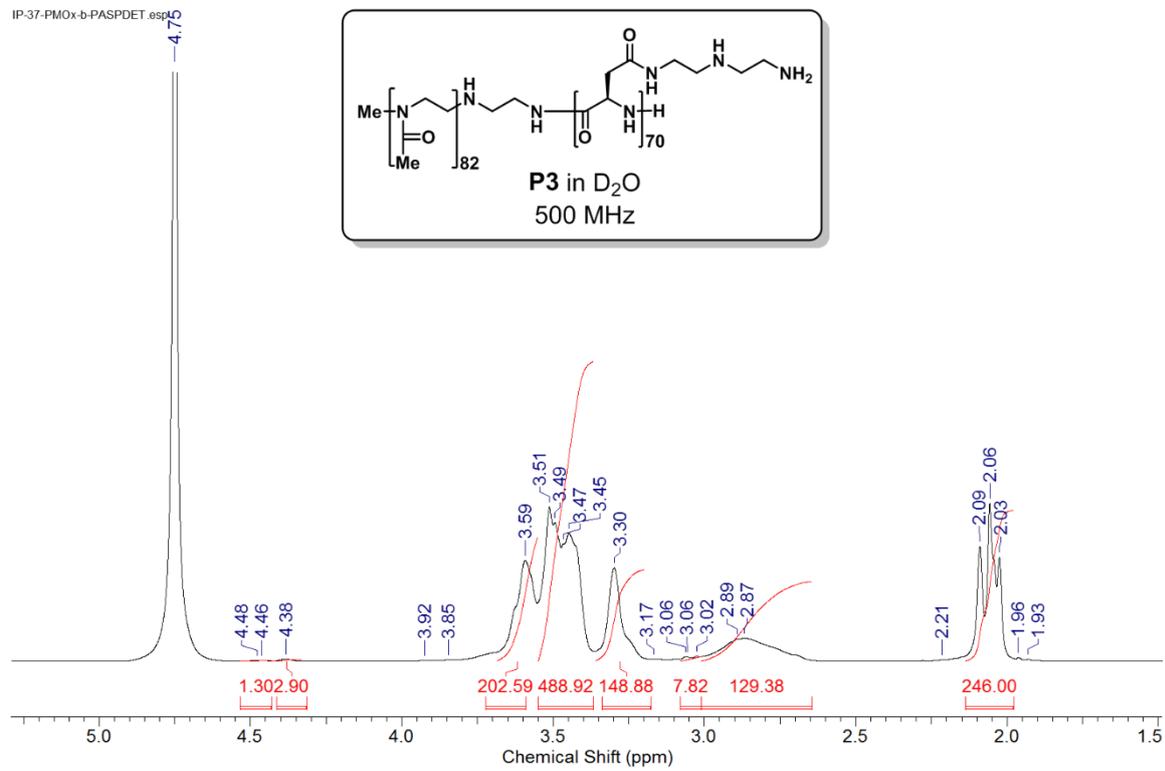
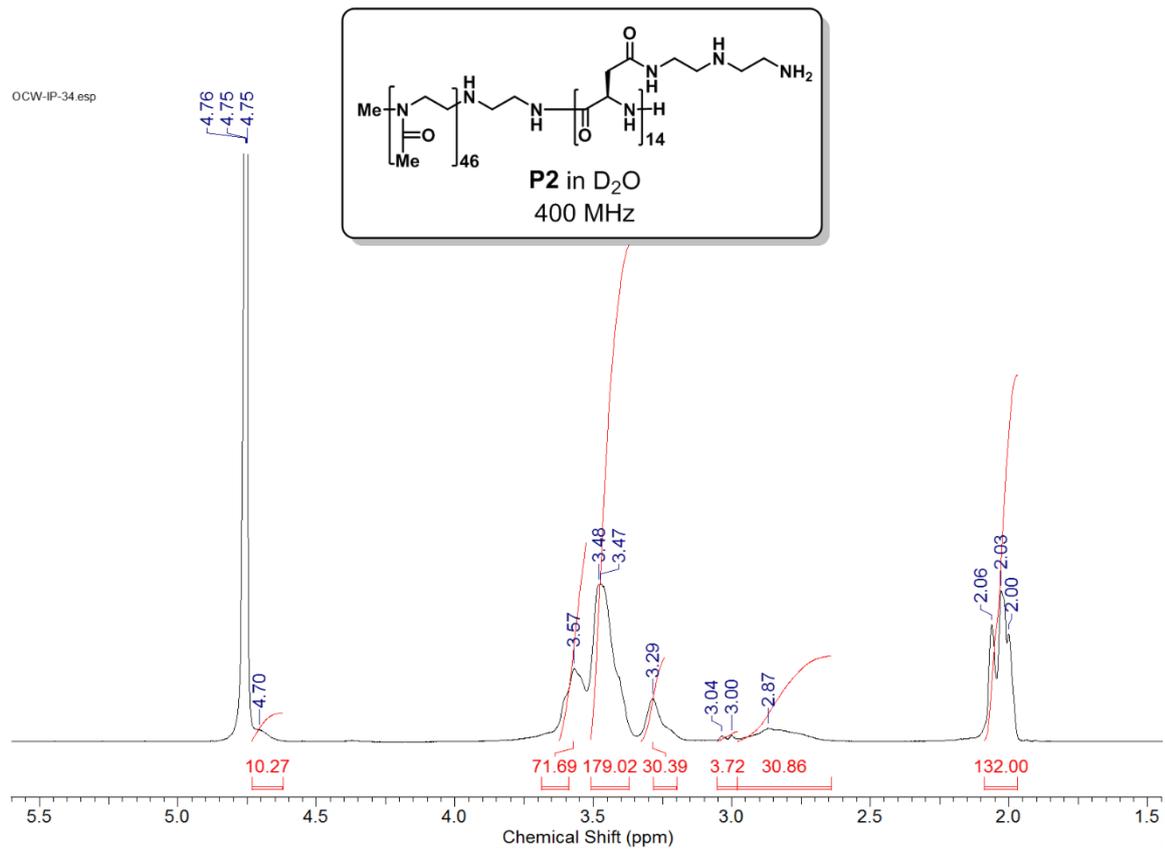
IP-28-PMOx-EDA-PBLA.esp



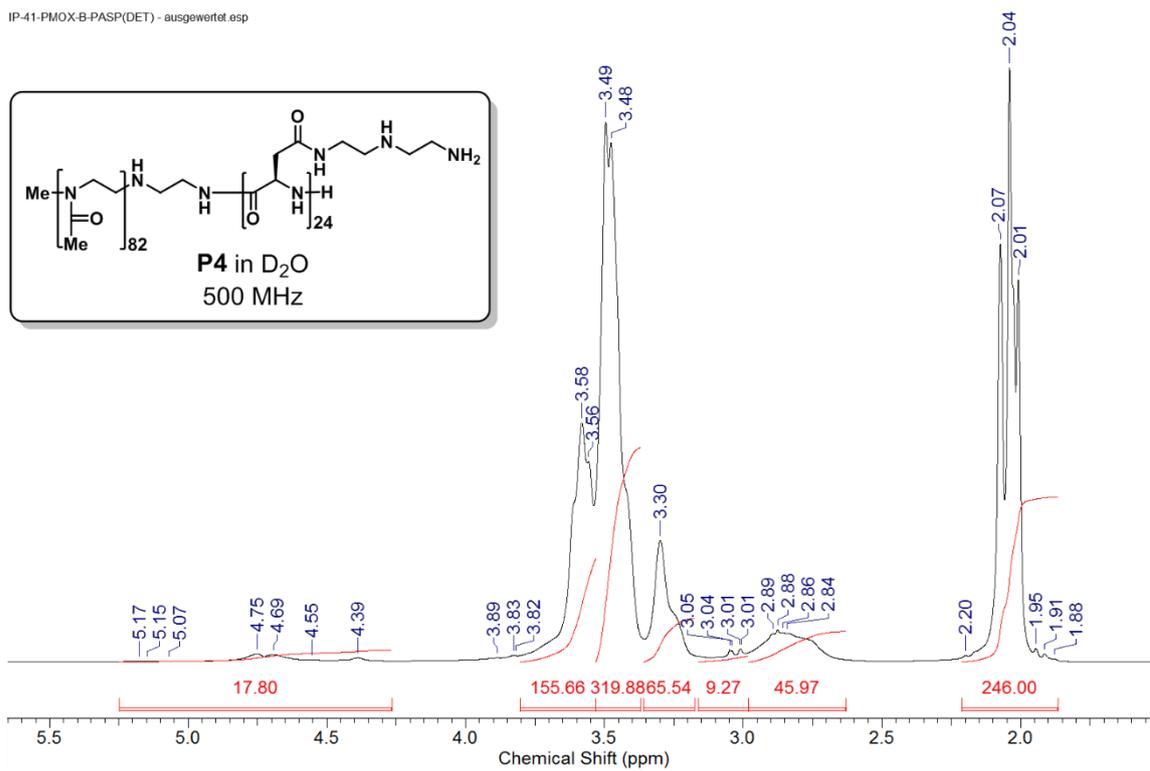
IP-31.esp



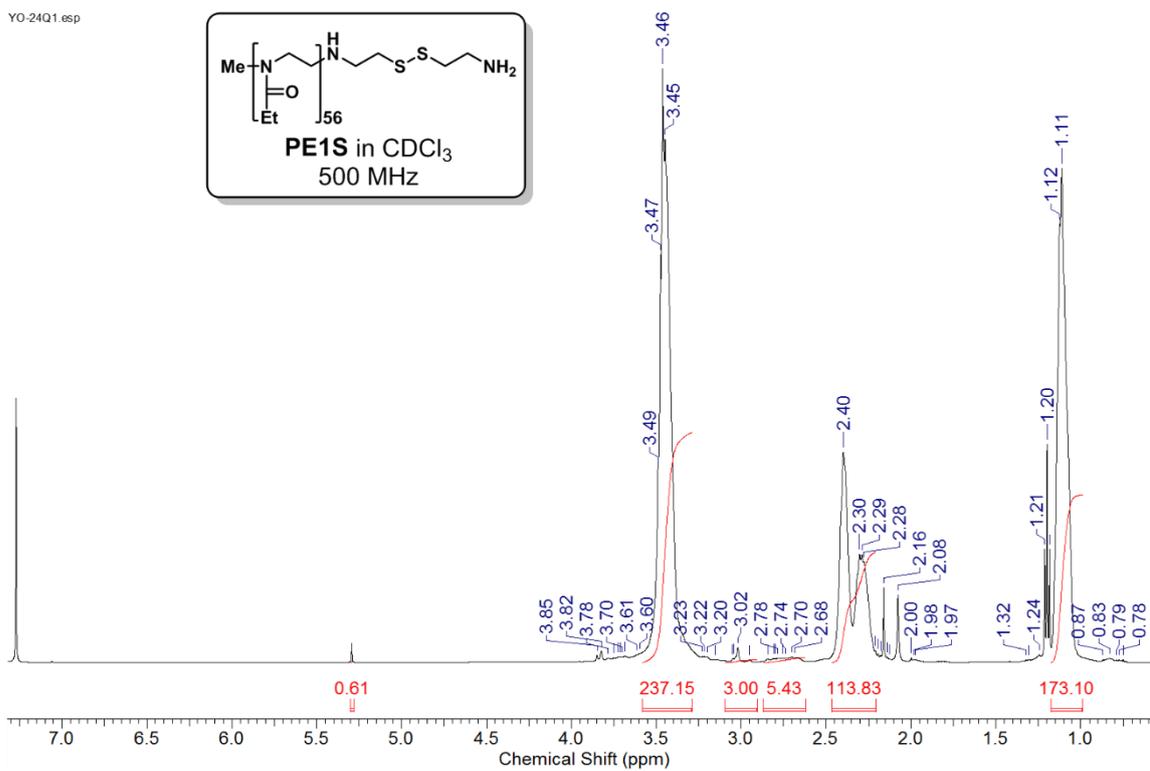


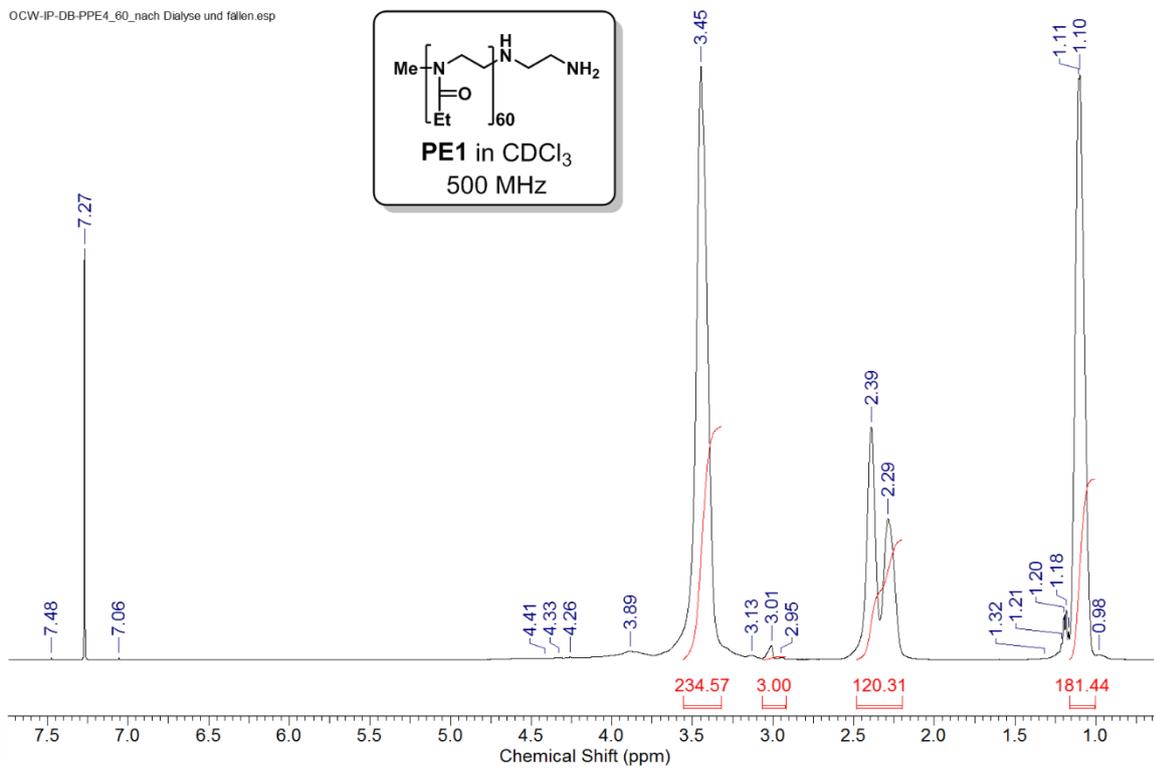
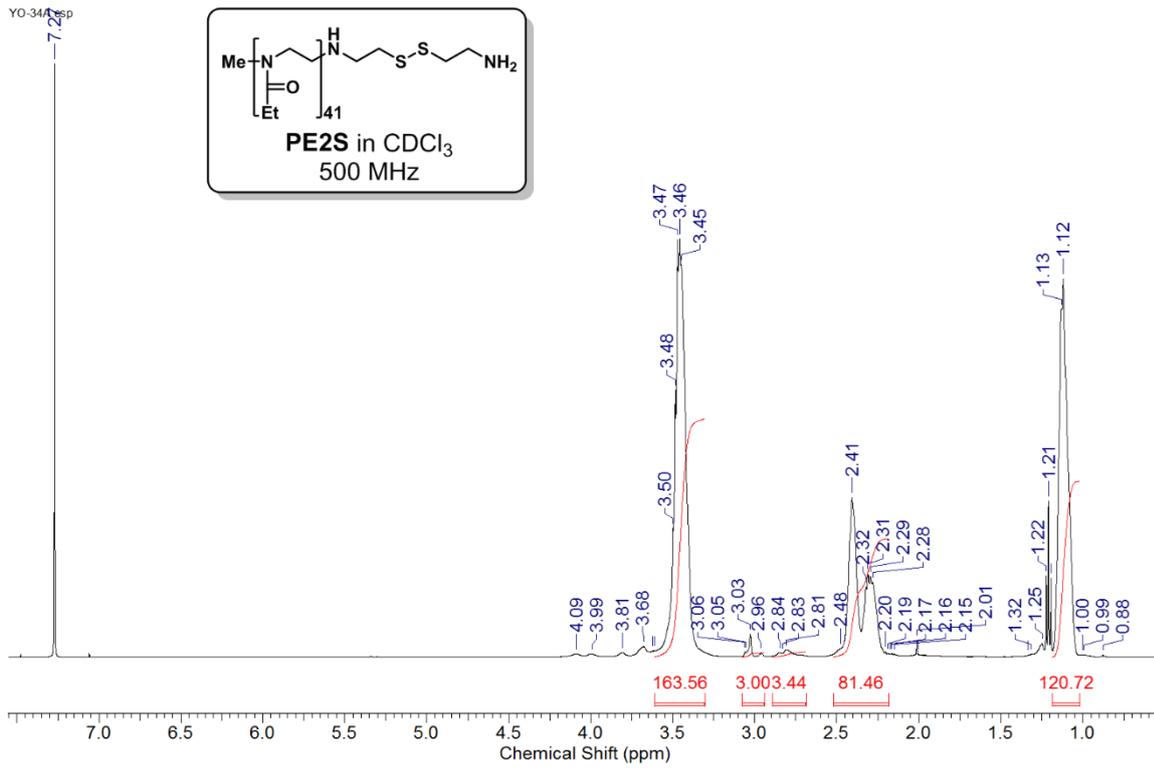


IP-41-PMOX-B-PASP(DET) - ausgewertet.esp

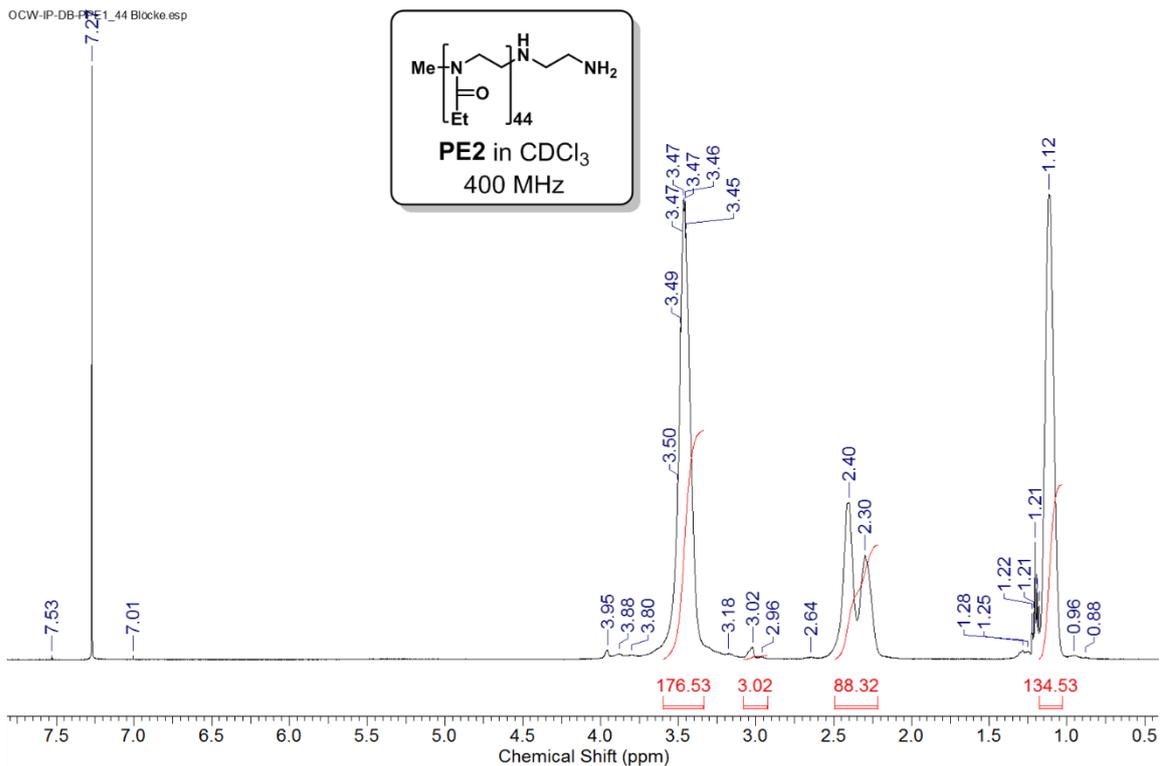


YO-24Q1.esp

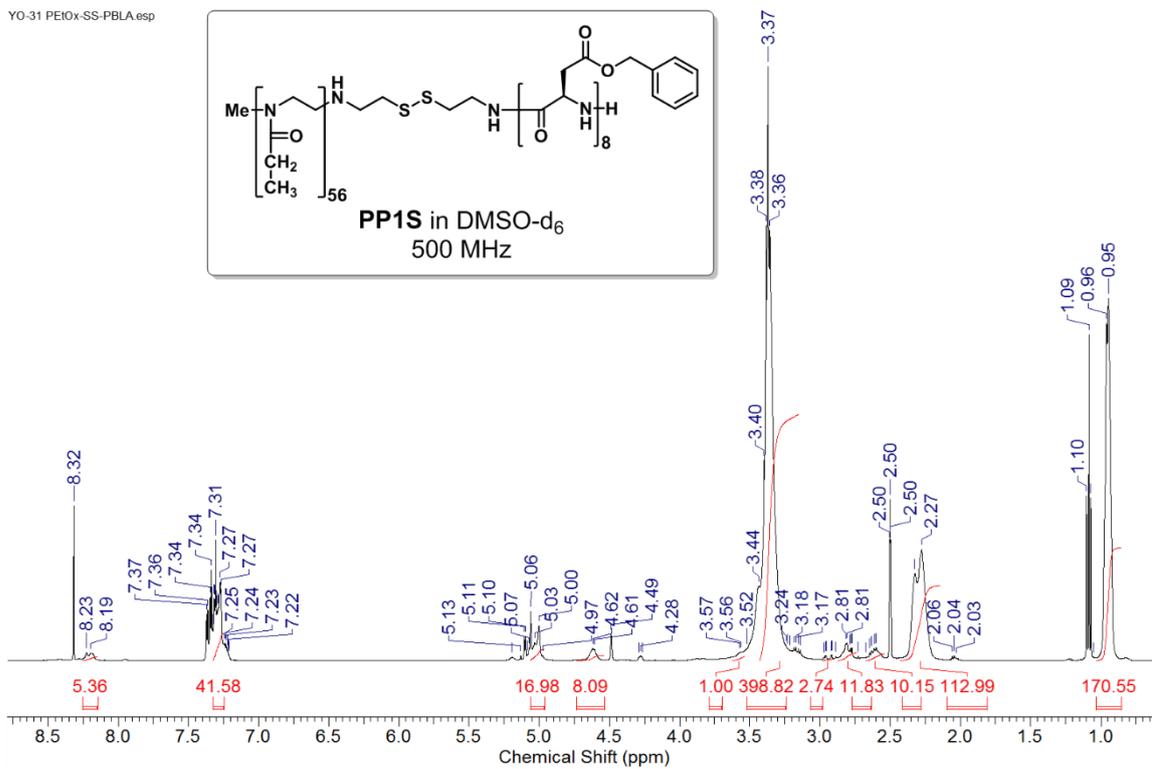




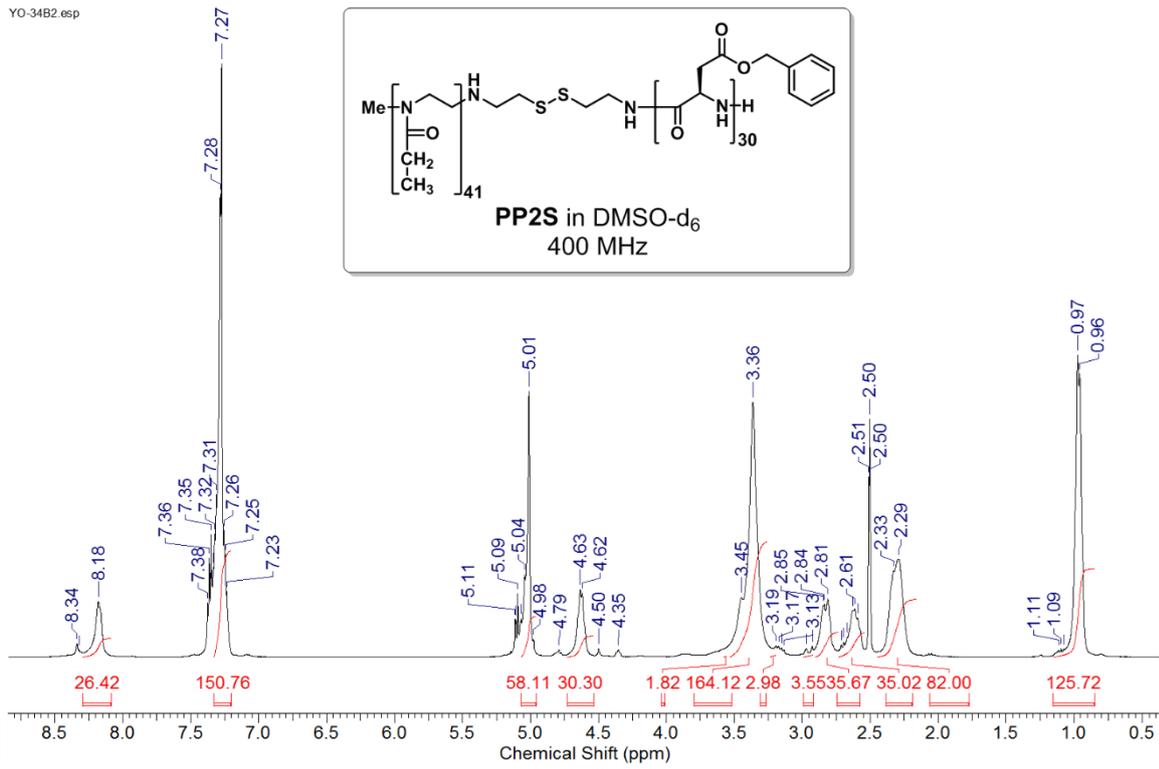
OCW-IP-DB-PE1_44 Blocke.esp



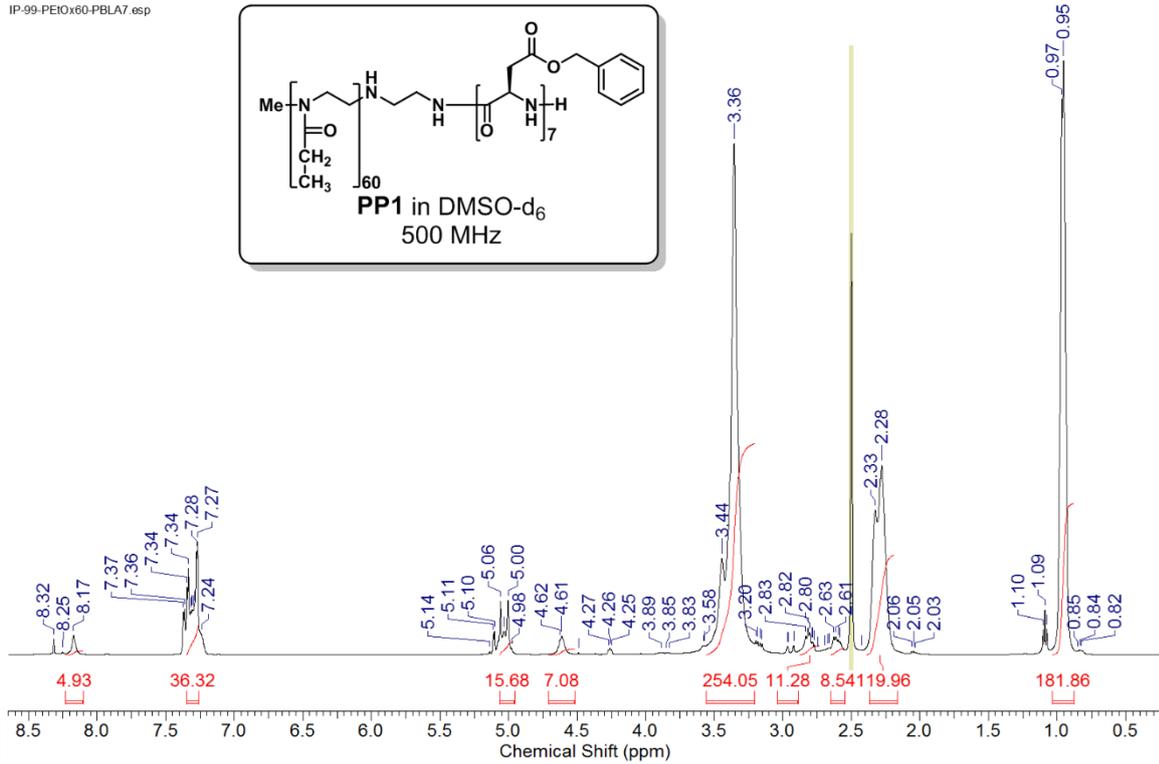
YO-31 PEIOx-SS-PBLA.esp



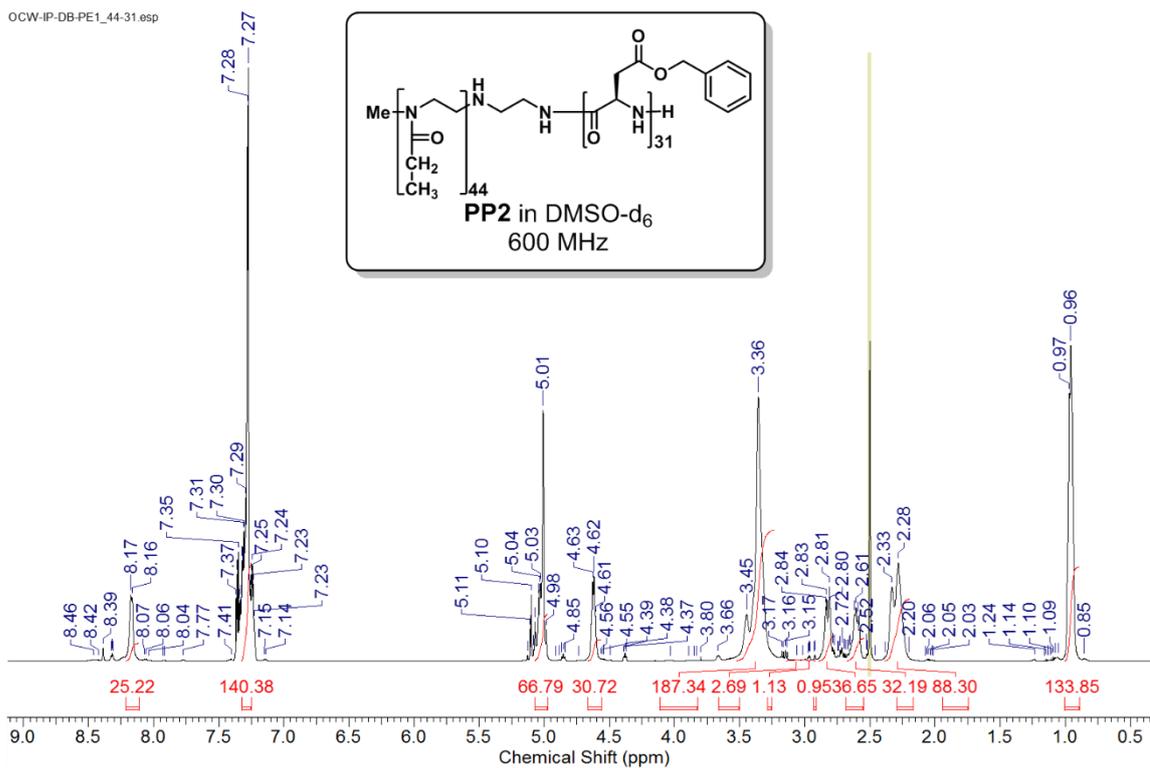
YO-34B2.esp

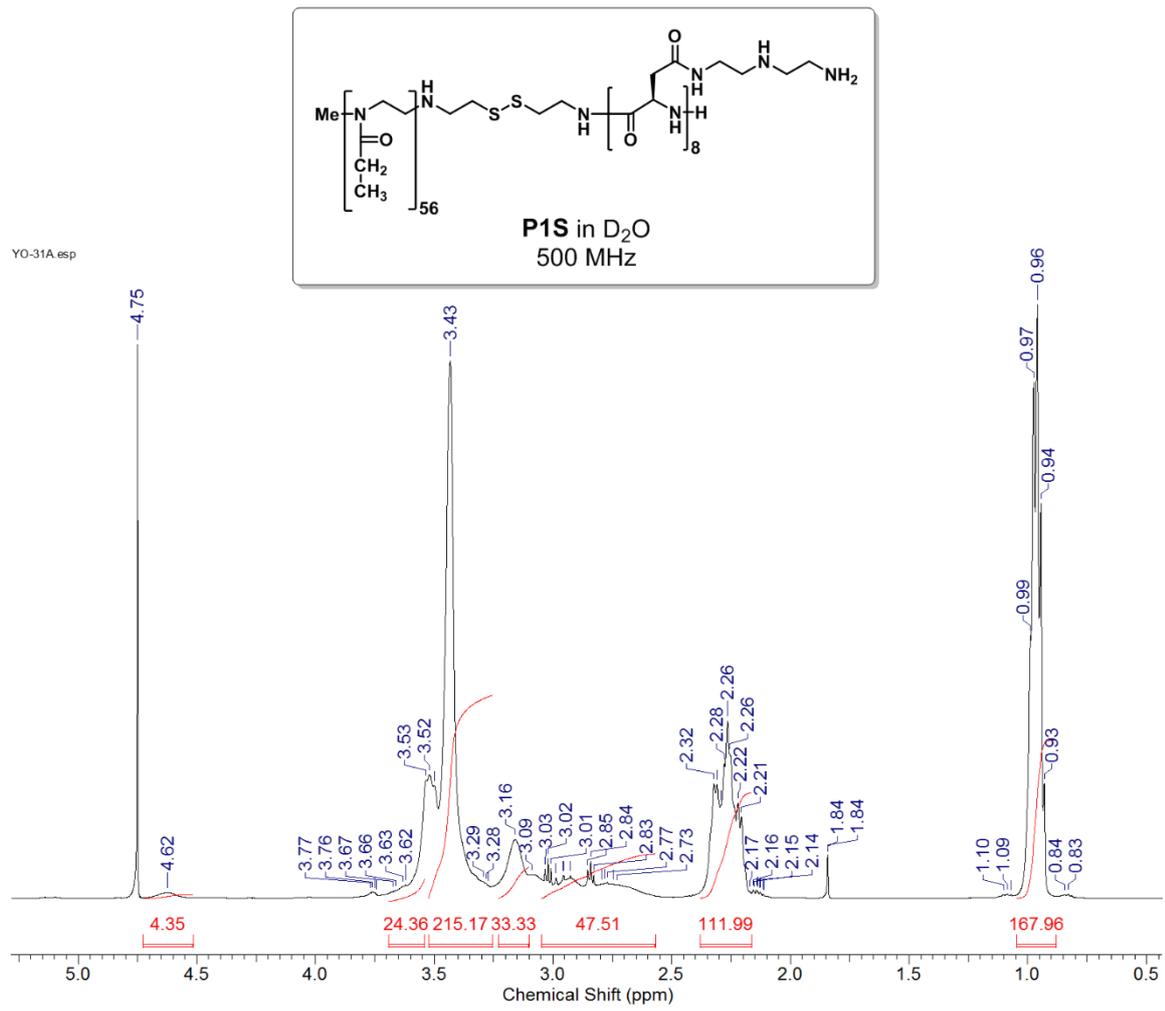


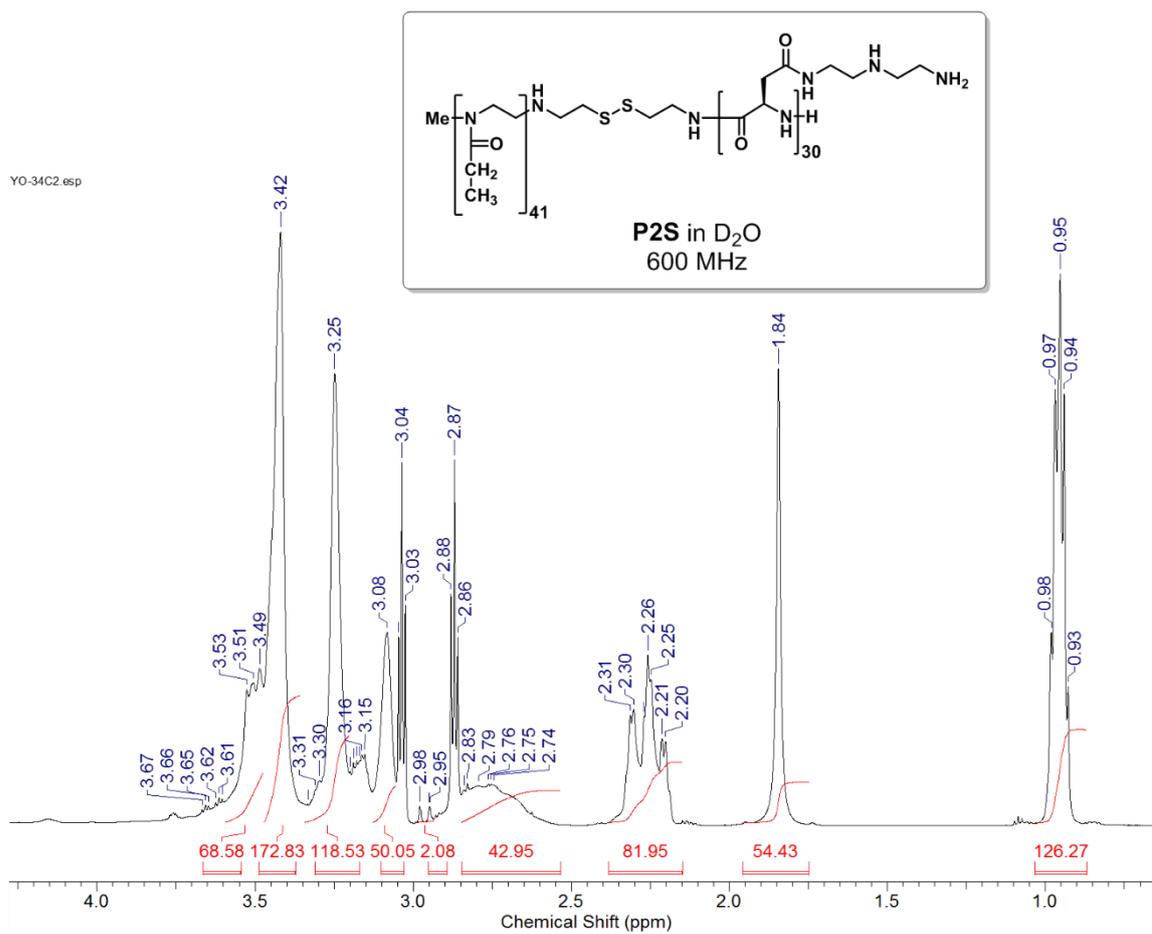
IP-99-PEIOx60-PBLA7.esp



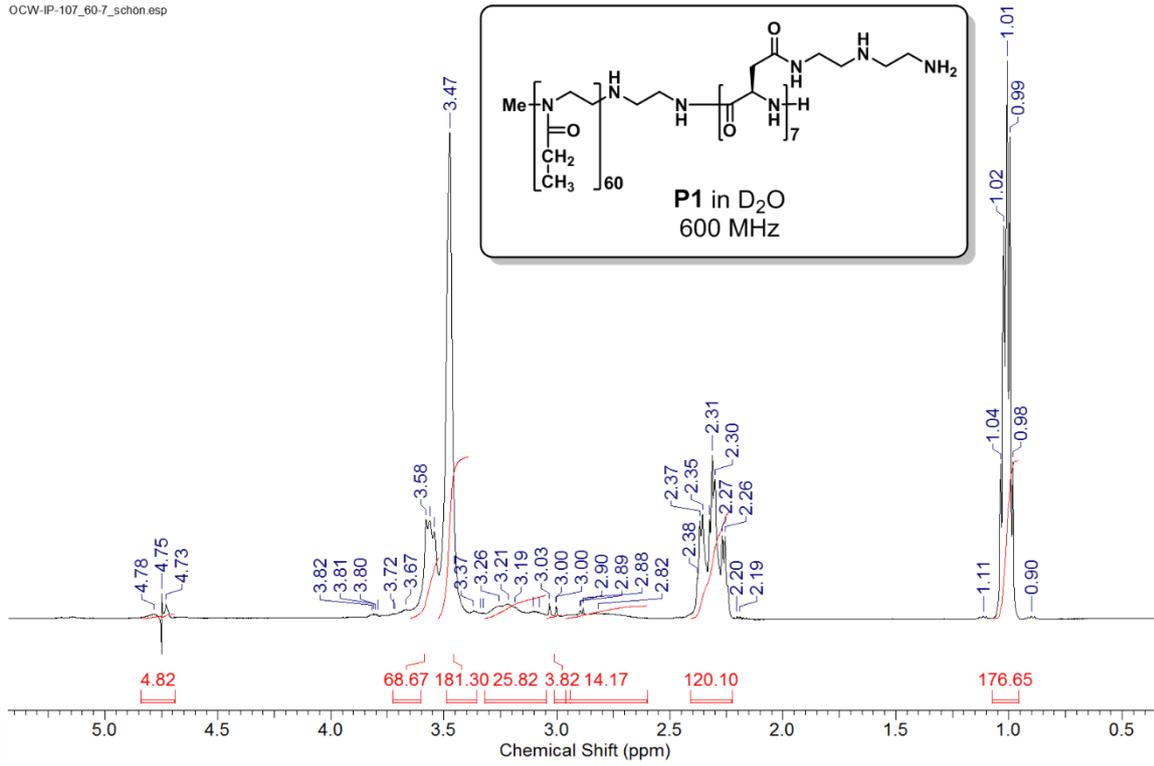
OCW-IP-DB-PE1_44-31.esp



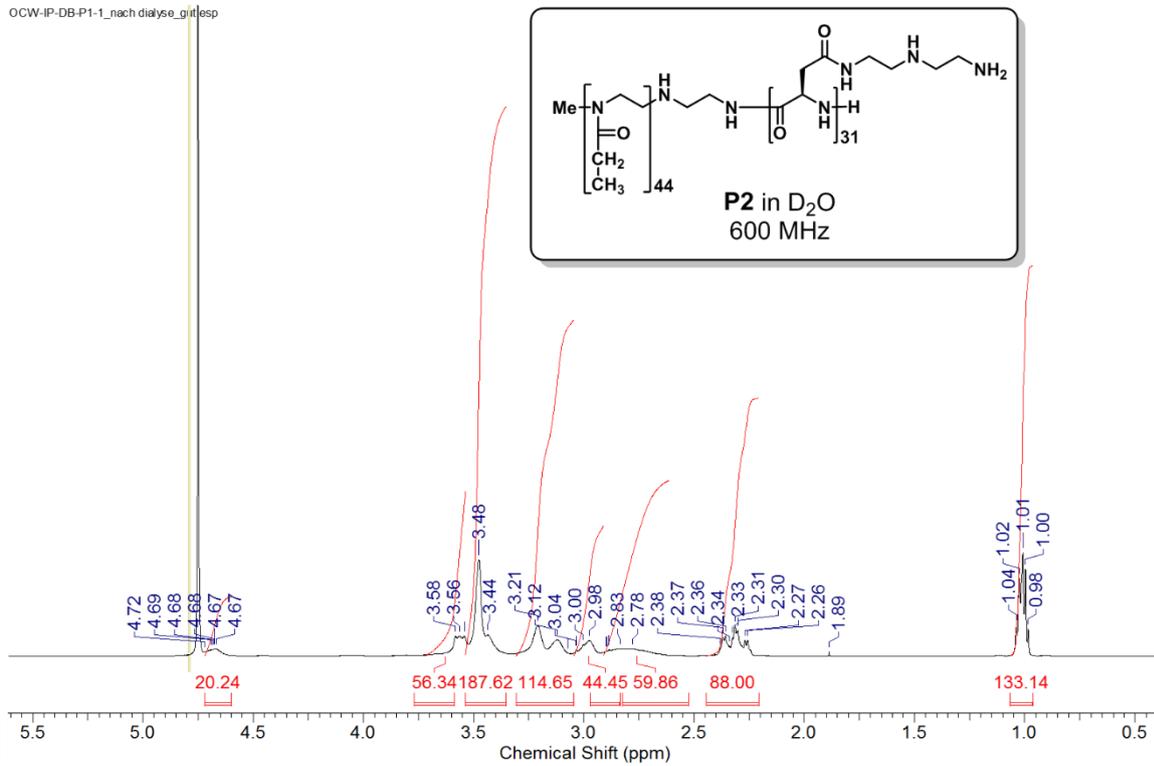




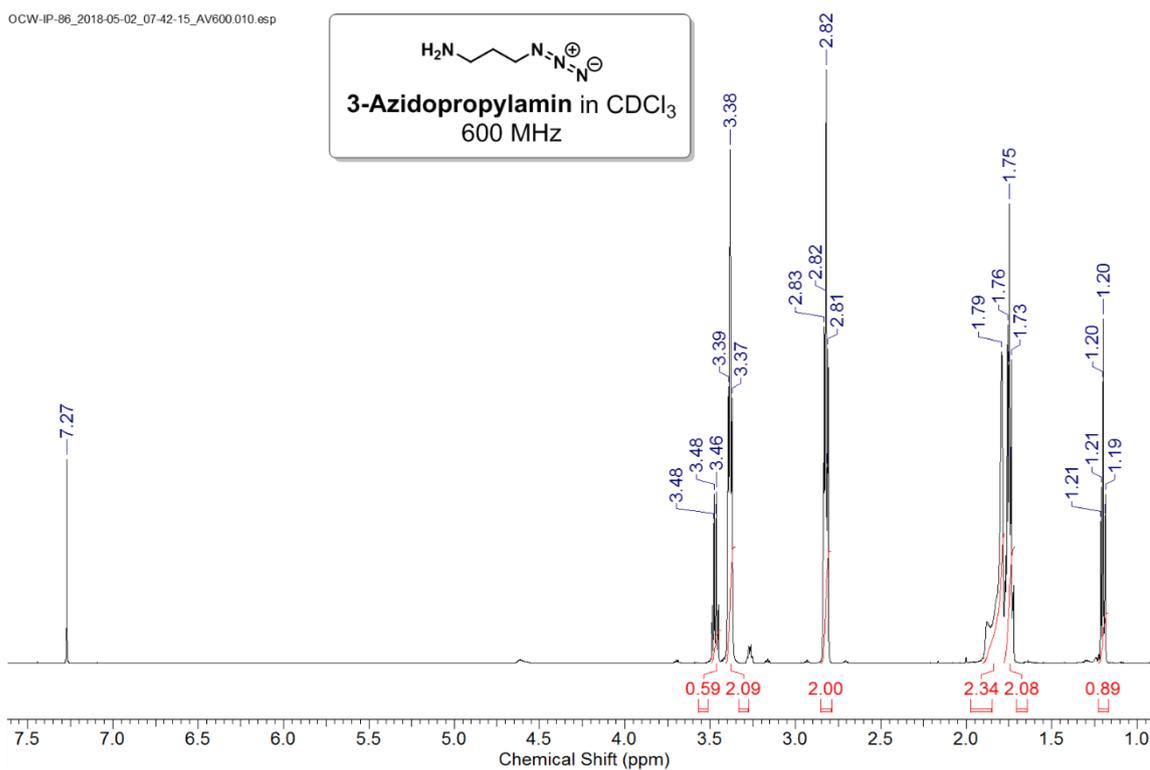
OCW-IP-107_60-7_schön.esp



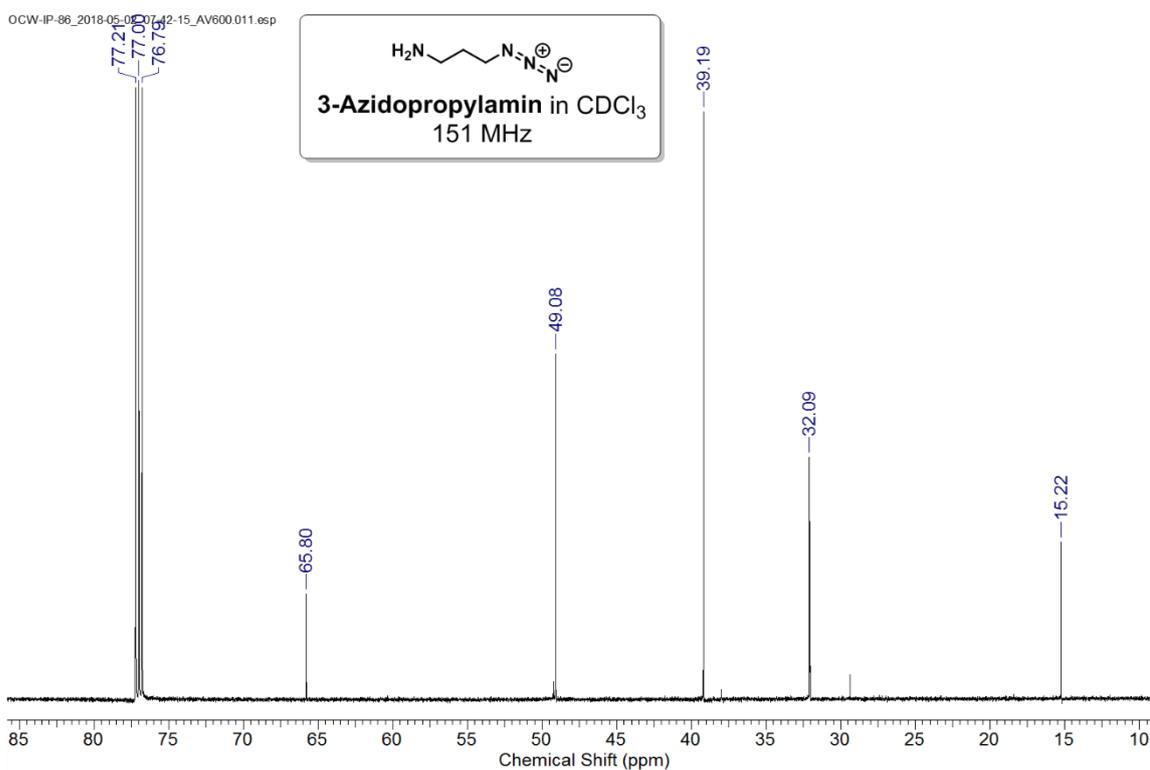
OCW-IP-DB-P1-1_nech dialyse_gürtl.esp



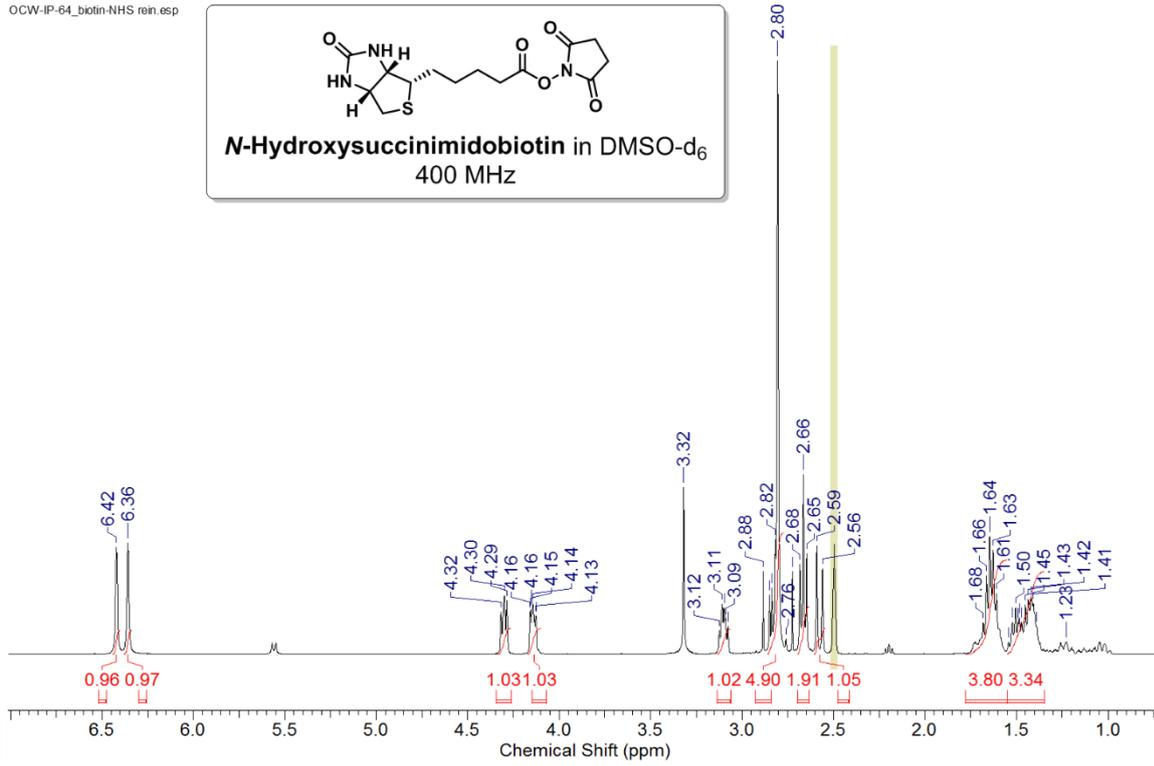
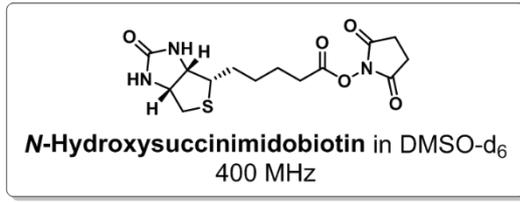
OCW-IP-86_2018-05-02_07-42-15_AV600.010.esp



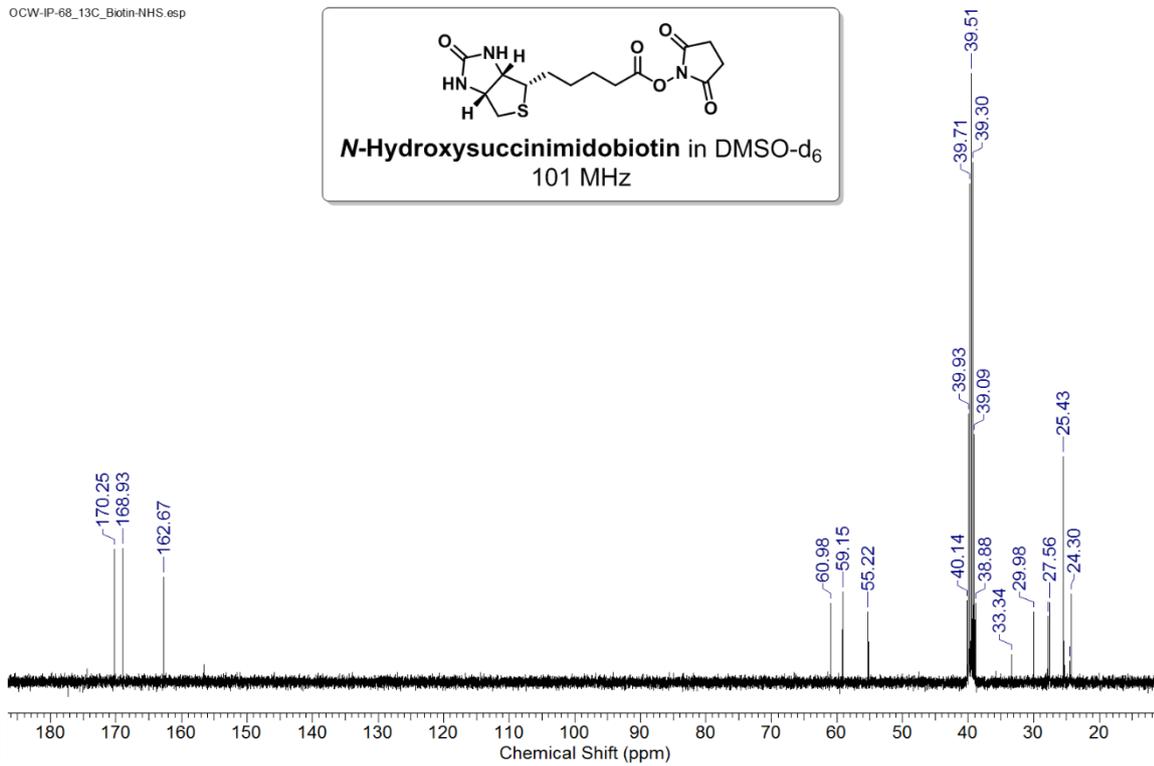
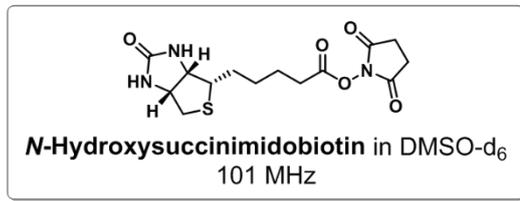
OCW-IP-86_2018-05-02_07-42-15_AV600.011.esp



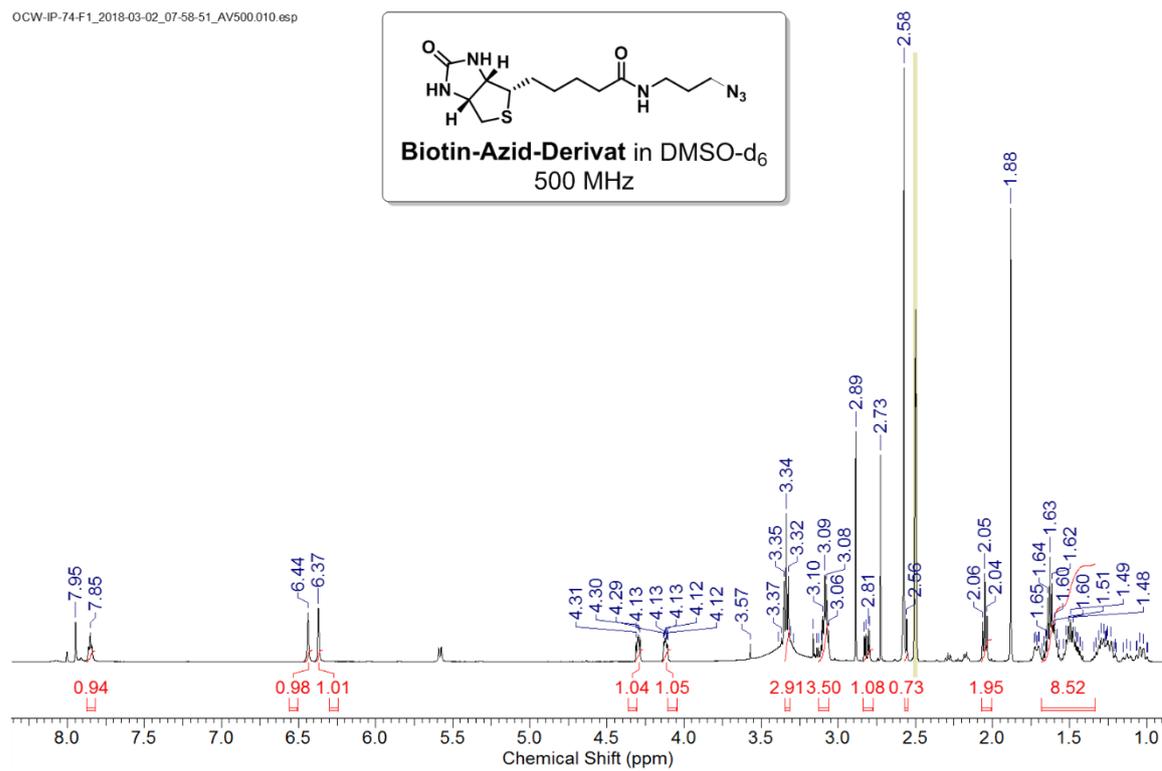
OCW-IP-64_biotin-NHS rein.esp



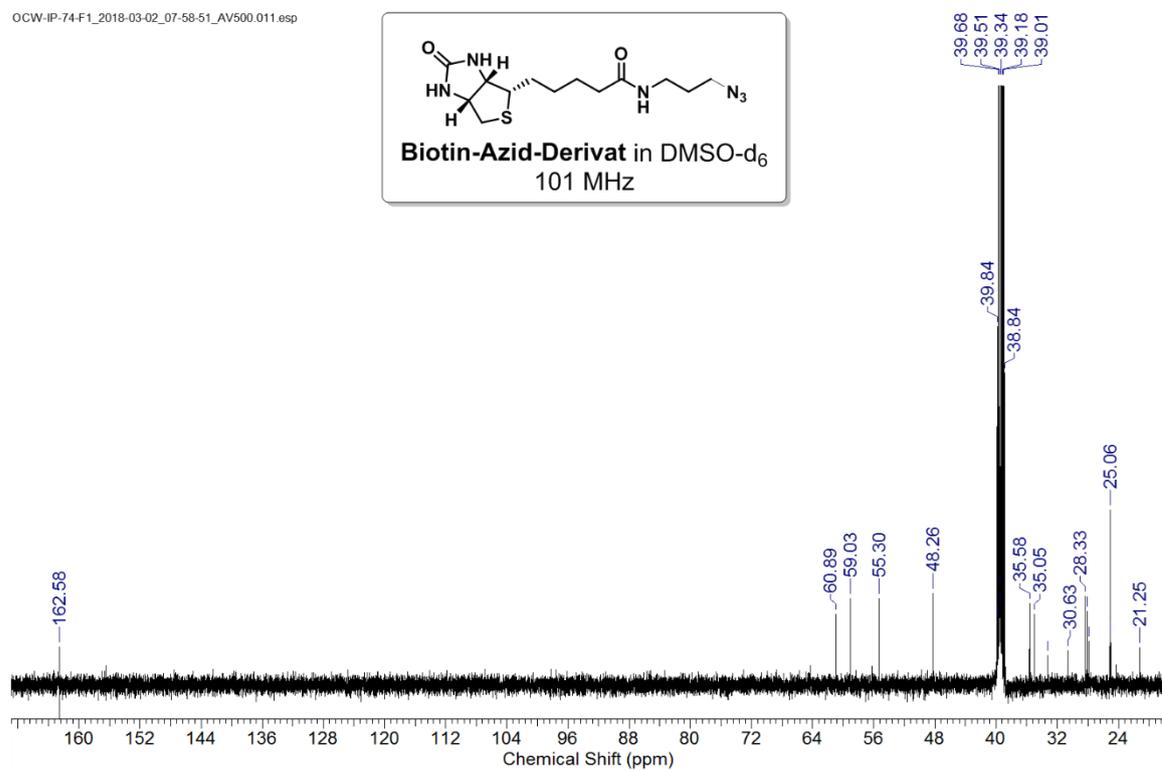
OCW-IP-68_13C_Biotin-NHS.esp

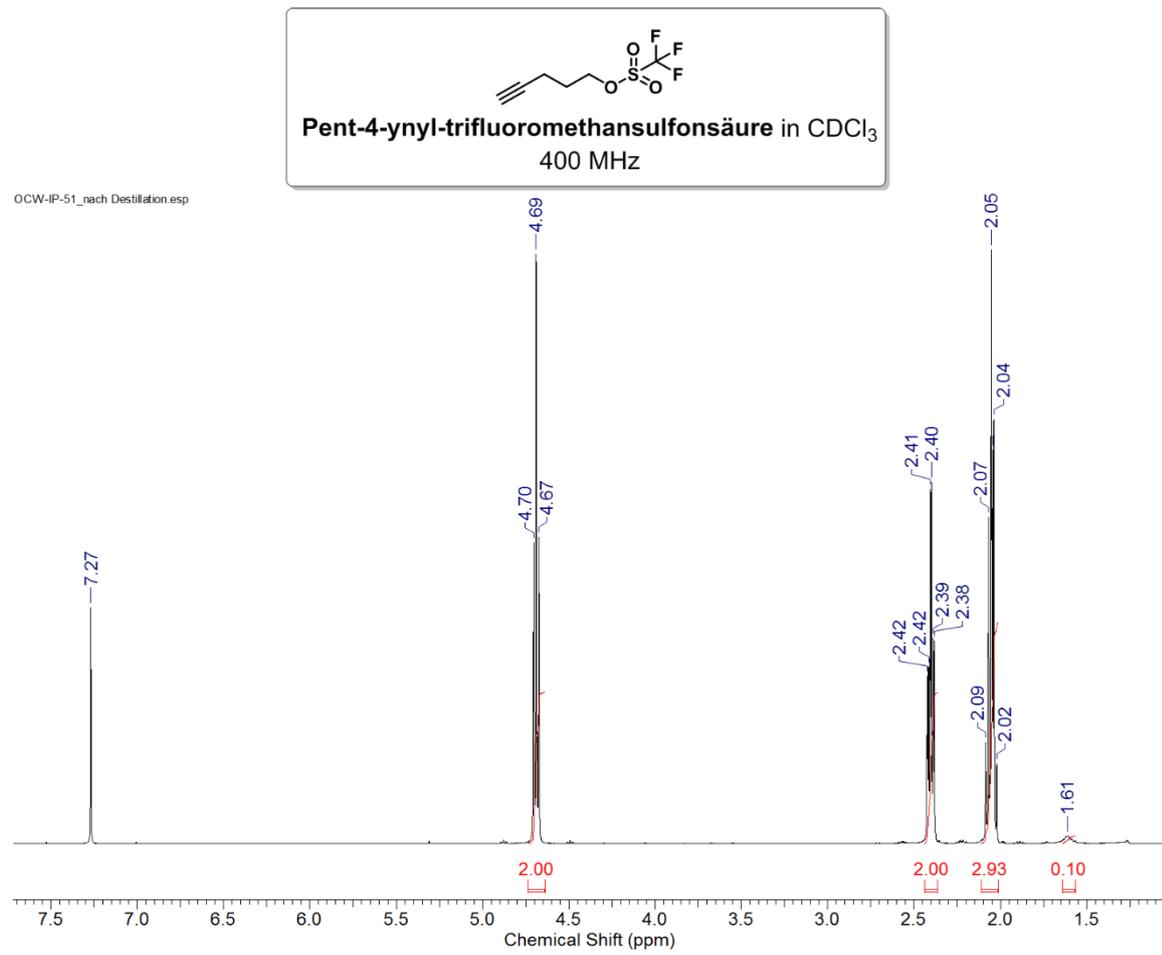


OCW-IP-74F1_2018-03-02_07-58-51_AV500.010.esp

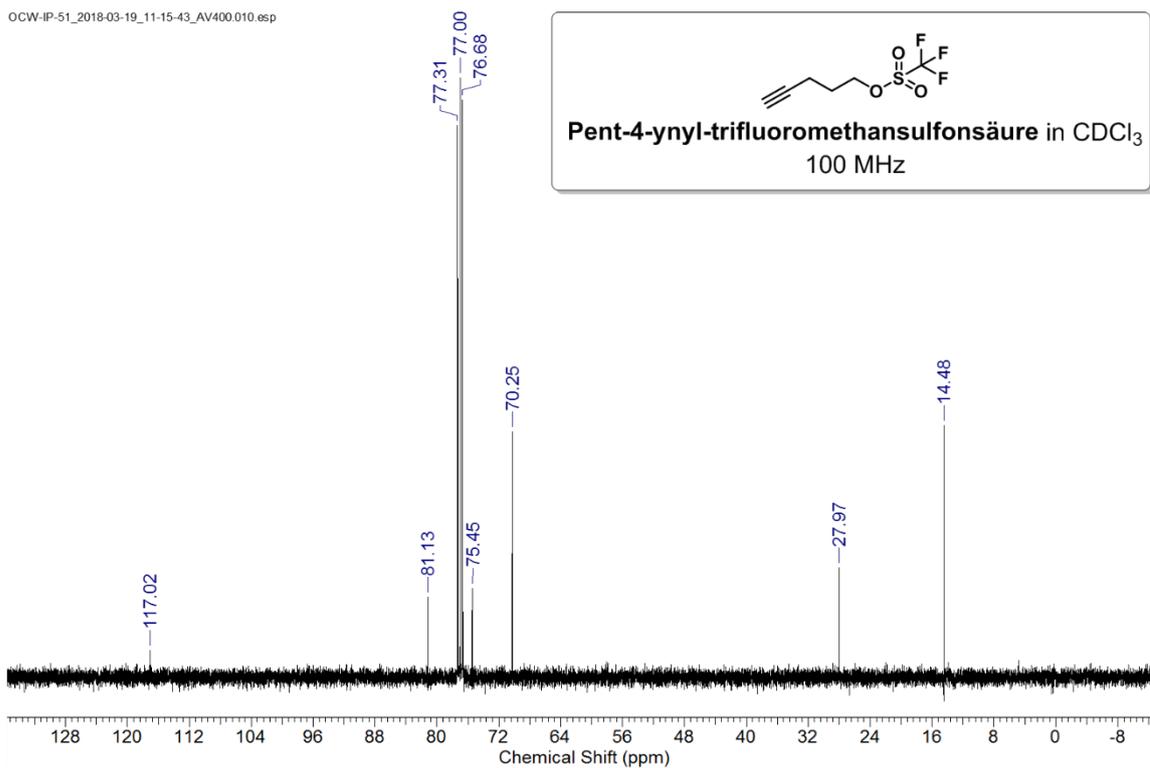


OCW-IP-74F1_2018-03-02_07-58-51_AV500.011.esp

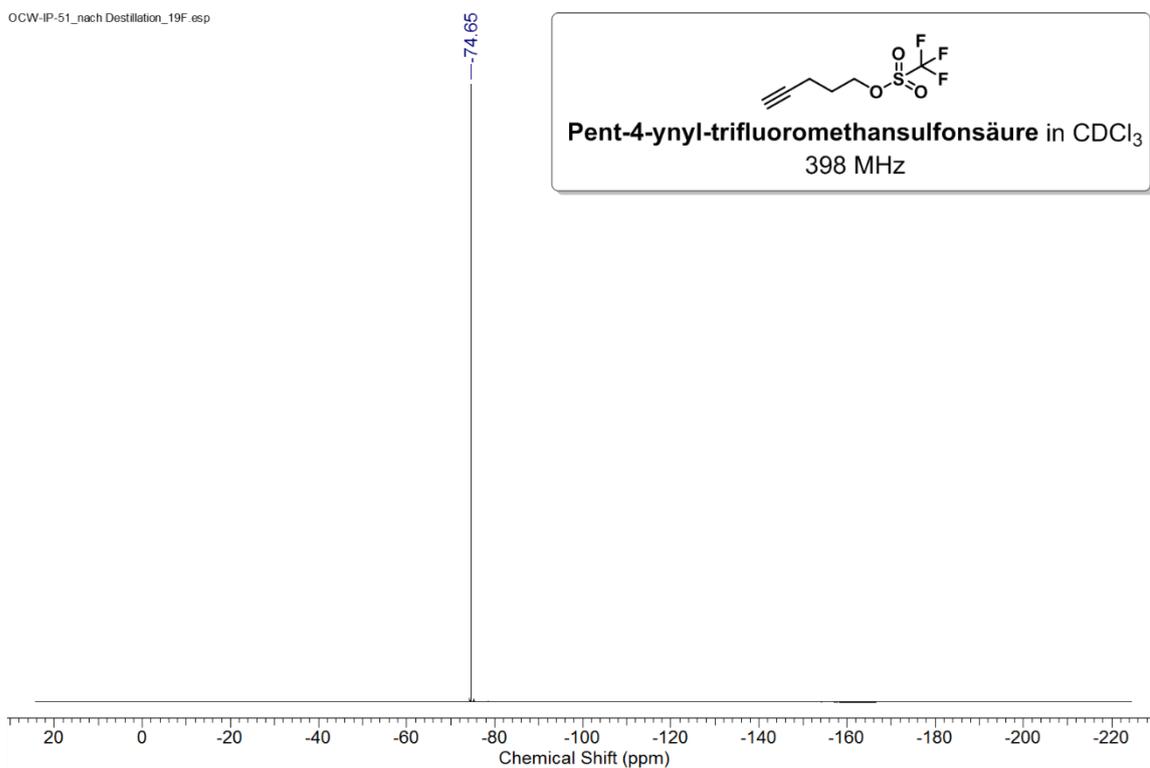




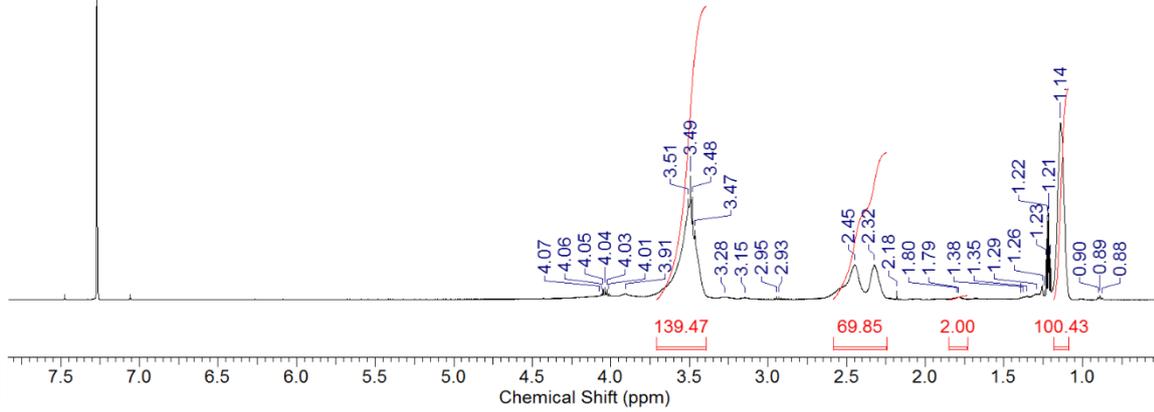
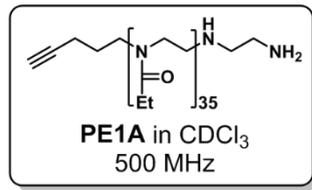
OCW-IP-51_2018-03-19_11-15-43_AV400.010.esp



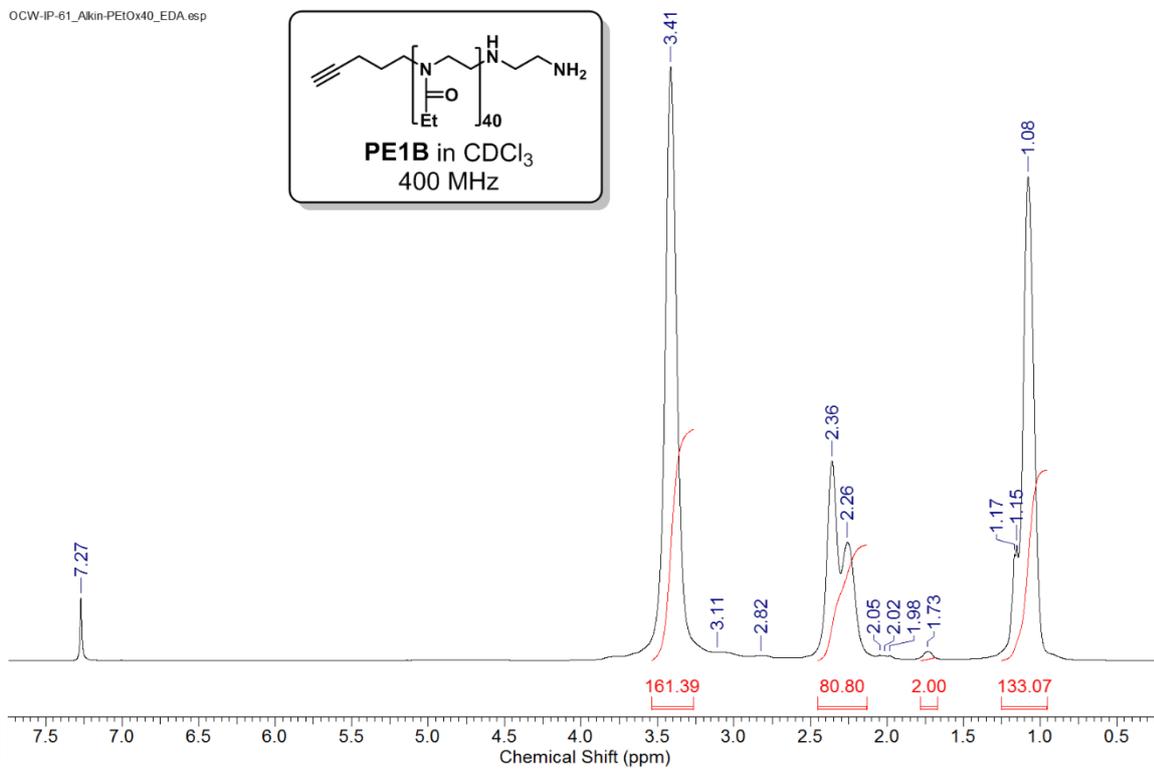
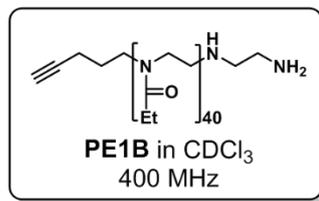
OCW-IP-51_nach Destillation_19F.esp



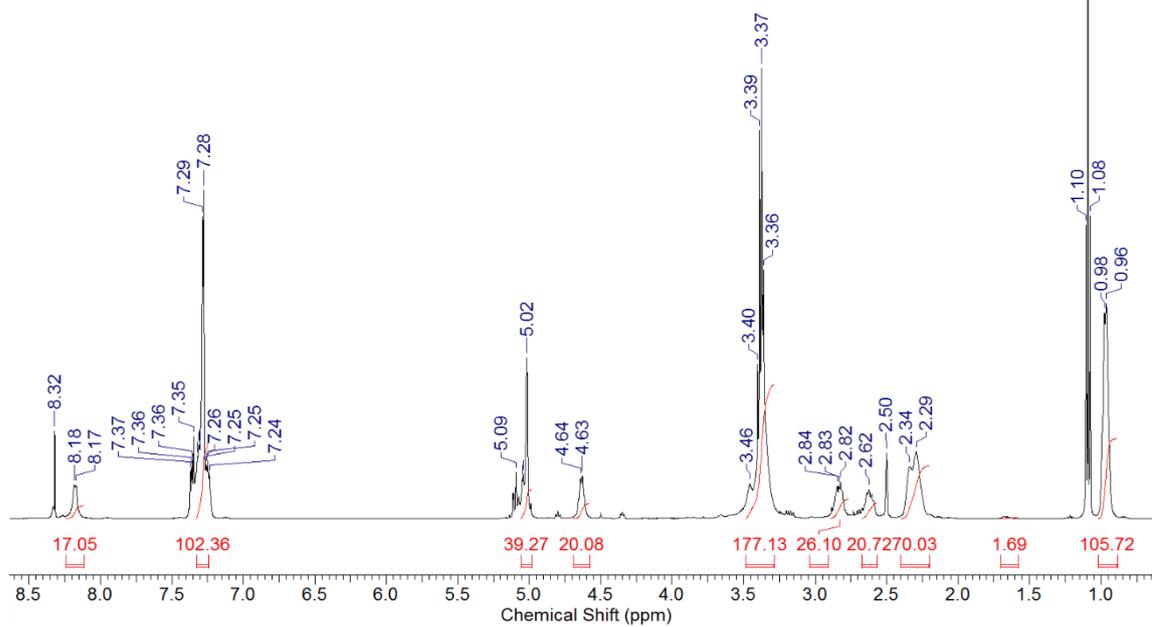
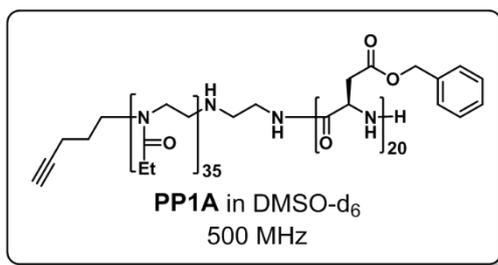
OCW-IP-57-3_Alkin-PEIOx35-EDA nach Lyo und fallen.esp

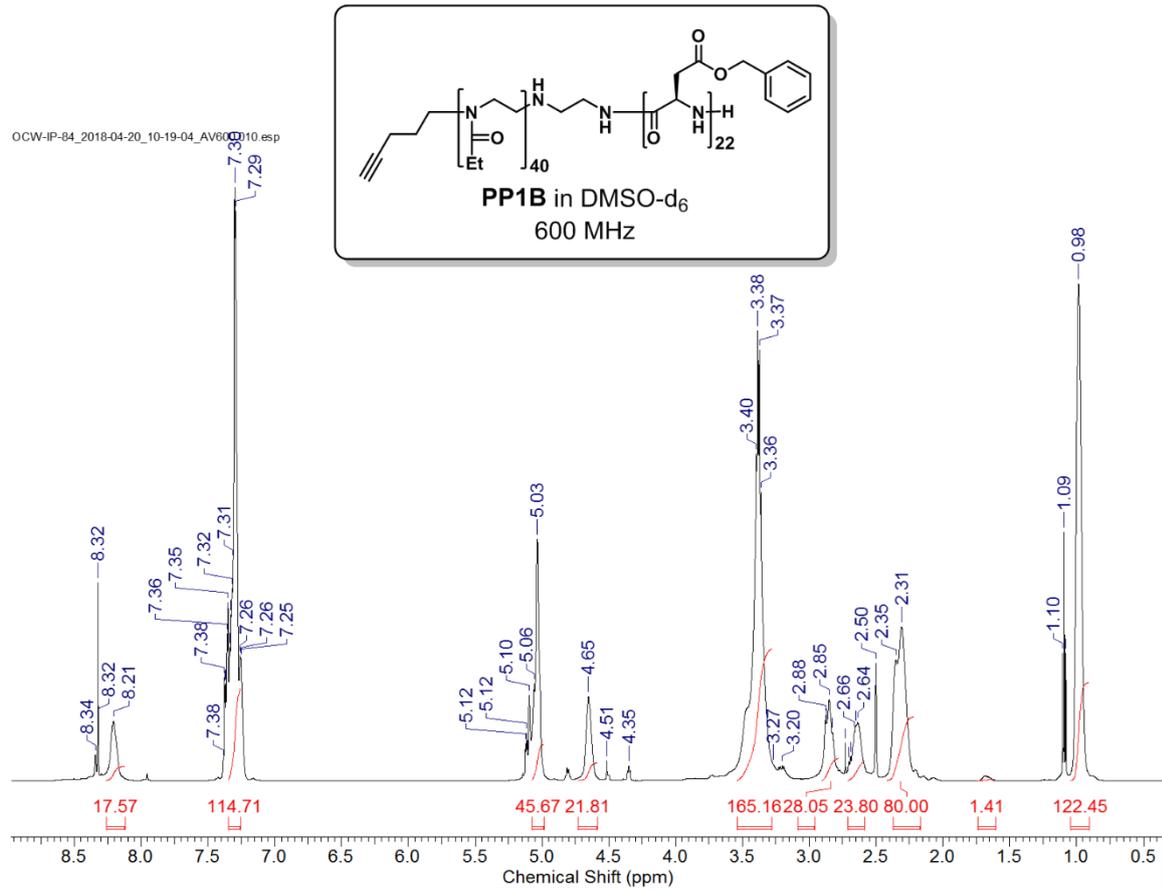


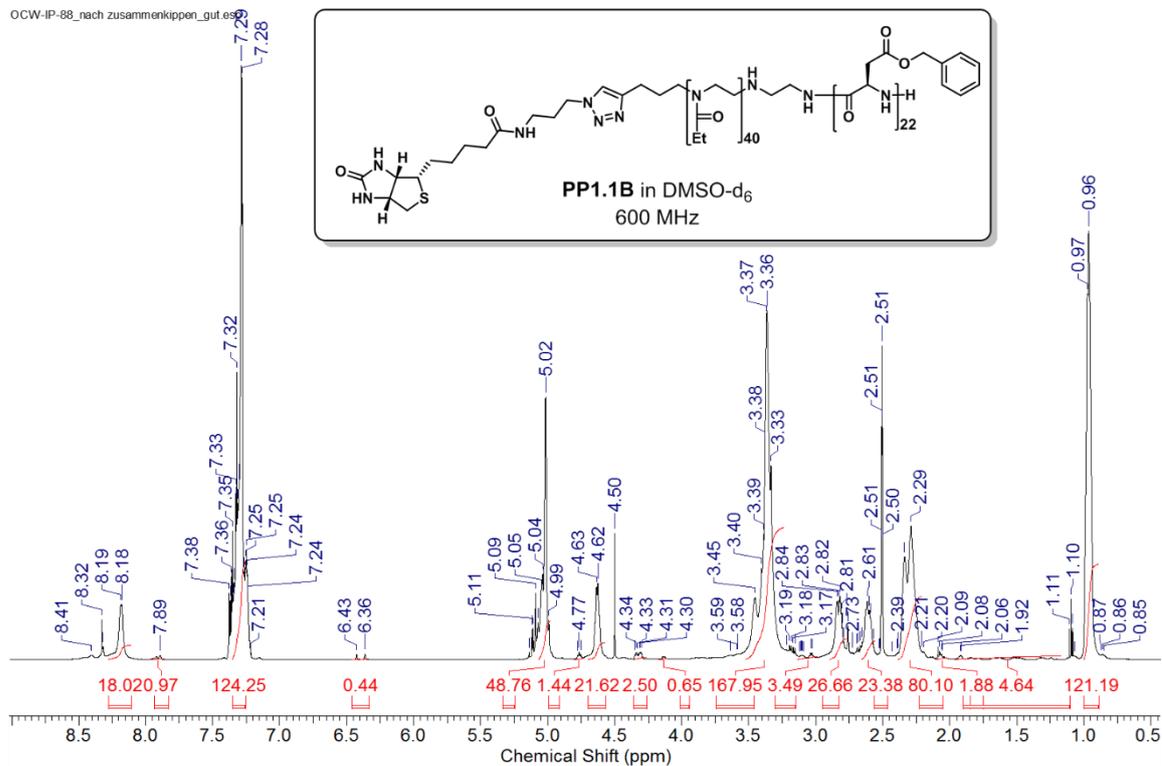
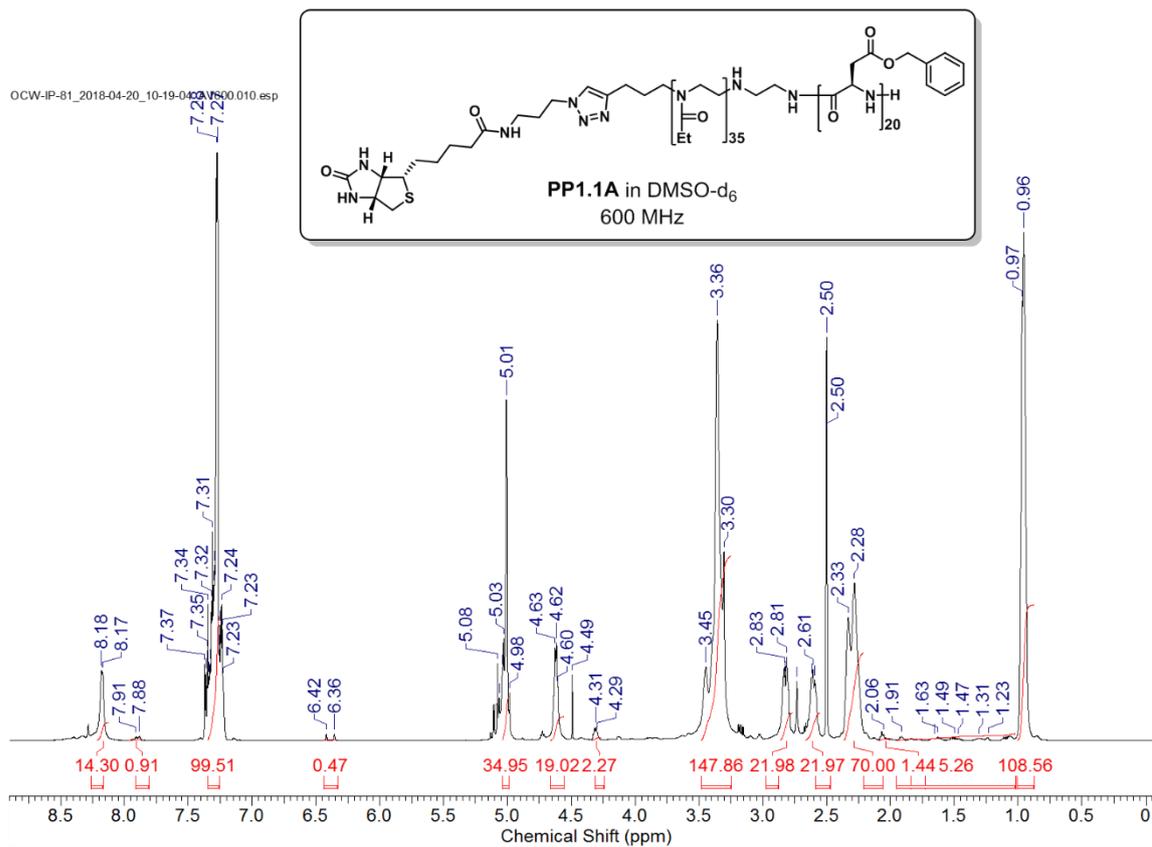
OCW-IP-61_Alkin-PEIOx40_EDA.esp

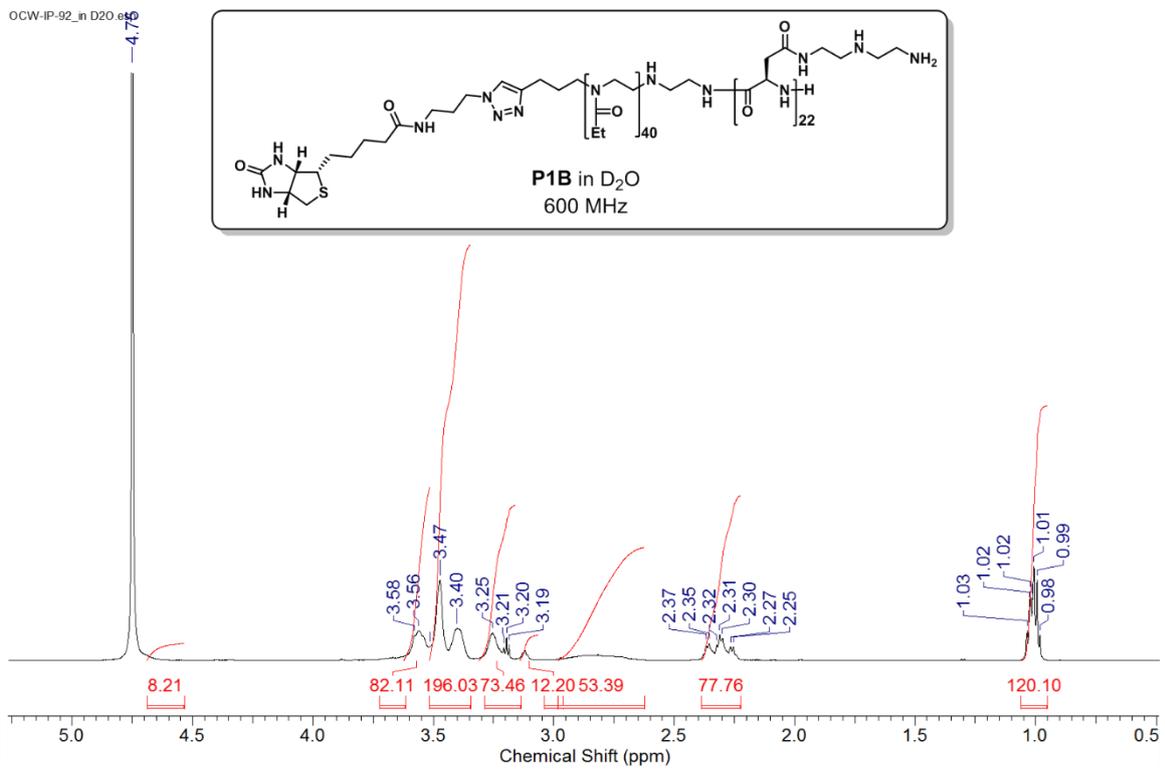
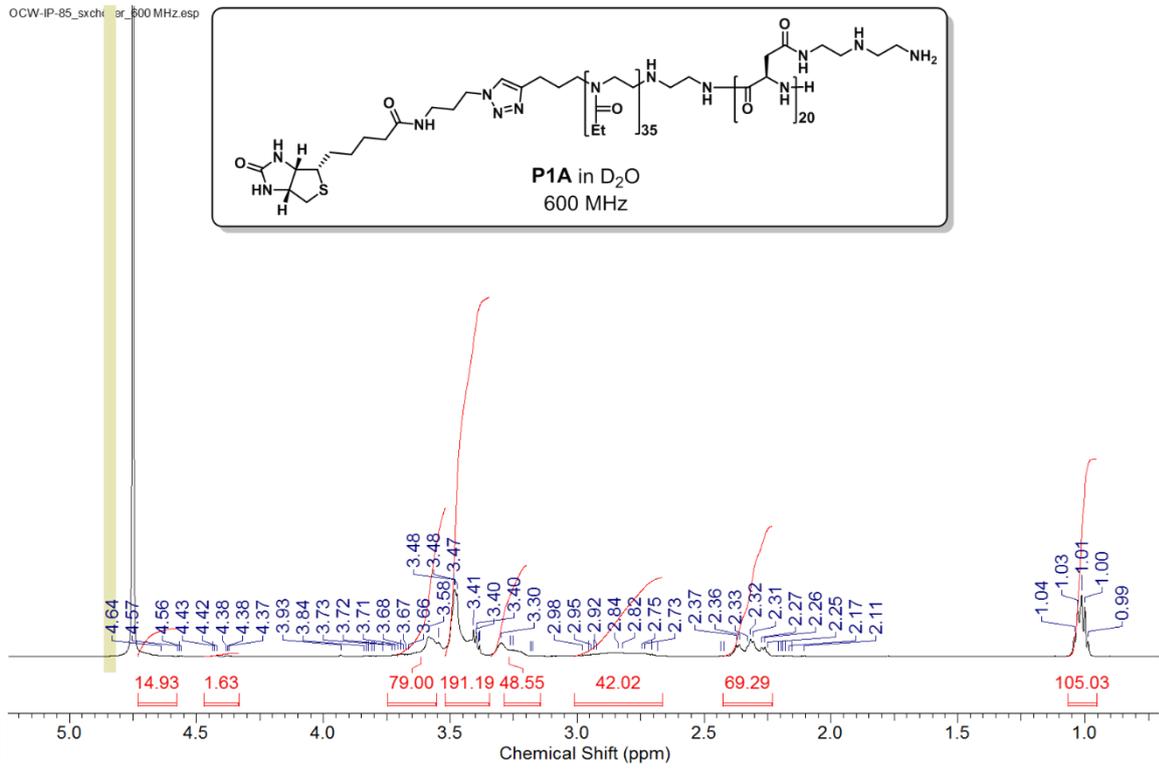


IP-62 esp









10.6 Eidesstaatliche Versicherung (Affidavit)

Pretzer, Irene

Name, Vorname
(Surname, first name)

129064

Matrikel-Nr.
(Enrolment number)

Belehrung:

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden, § 63 Abs. 5 Hochschulgesetz NRW.

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

Wer vorsätzlich eine falsche Versicherung an Eides statt abgibt, kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft werden, § 156 StGB. Die fahrlässige Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe bestraft werden, § 161 StGB.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

Official notification:

Any person who intentionally breaches any regulation of university examination regulations relating to deception in examination performance is acting improperly. This offence can be punished with a fine of up to EUR 50,000.00. The competent administrative authority for the pursuit and prosecution of offences of this type is the chancellor of the TU Dortmund University. In the case of multiple or other serious attempts at deception, the candidate can also be unenrolled, Section 63, paragraph 5 of the Universities Act of North Rhine-Westphalia.

The submission of a false affidavit is punishable.

Any person who intentionally submits a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to three years or a fine, Section 156 of the Criminal Code. The negligent submission of a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to one year or a fine, Section 161 of the Criminal Code.

I have taken note of the above official notification.

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)

Titel der Dissertation:
(Title of the thesis):

**Synthese und Charakterisierung von Polyplexmizellen basierend auf
biokompatiblen Blockkationeren für eine effiziente Gentransfektion**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Die Arbeit hat in gegenwärtiger oder in einer anderen Fassung weder der TU Dortmund noch einer anderen Hochschule im Zusammenhang mit einer staatlichen oder akademischen Prüfung vorgelegen.

I hereby swear that I have completed the present dissertation independently and without inadmissible external support. I have not used any sources or tools other than those indicated and have identified literal and analogous quotations.

The thesis in its current version or another version has not been presented to the TU Dortmund University or another university in connection with a state or academic examination.*

*Please be aware that solely the German version of the affidavit ("Eidesstattliche Versicherung") for the PhD thesis is the official and legally binding version.

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)