

**Kationische Lipide für den Gentransfer – Synthese und
Charakterisierung neuer Lipide auf Malonamidbasis
sowie Beiträge zur Untersuchung des Aggregationsverhaltens im
wässrigen Milieu**

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
– Biowissenschaften –
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

vorgelegt von

Herrn Dipl. Pharm. Christian Wölk
geb. am 20. Mai 1984 in Wolmirstedt

Gutachter:

1. Prof. Dr. habil. Bodo Dobner
2. Prof. Dr. habil. Gerald Brezesinski
3. Prof. Dr. Udo Bakowsky

Halle (Saale), Juni 2014

verteidigt am 21.11.2014

Der Fortgang der wissenschaftlichen Entwicklung ist im Endeffekt eine ständige Flucht vor dem Staunen.

Albert Einstein

Für meine Eltern!

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Symbolverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Gentherapie.....	1
1.2 Lipofektion und Lipidassoziate	3
1.3 Zielstellung der Arbeit.....	12
2 Synthetisch-präparative Arbeiten.....	13
2.1 Synthesekonzept	13
2.2 Nomenklatur der Malonsäurediamide der 2. Generation	15
2.3 Amidsynthesen	17
2.4 Schutzgruppen für Amine.....	19
2.5 Synthese der Vorstufen.....	21
2.5.1 Synthese nicht-kommerziell erhältlicher Alkylamine	21
2.5.1.1 Synthese von Oleylamin (rein)	21
2.5.1.2 Synthese von (10 <i>R,S</i>)-10-Methylhexadecylamin	23
2.5.2 Synthese der Alkylmalonsäuremonoethylester	24
2.5.3 Synthese der ϵ -BOC-geschützten <i>N</i> -Alkyllysynamide.....	26
2.5.4 Synthese des Rückgrats der Malonamide der 2. Generation	28
2.6 Synthese der Lipide mit Tris(2-aminoethyl)amin-Baustein – Lipide vom Tris(2-aminoethyl)amin-Typ	30
2.7 Synthese der Lipide mit Ethylendiamin-Baustein – Lipide vom Ethylendiamin-Typ ...	34
2.8 Stereochemie der Malonamide der 2. Generation	36
2.9 NMR-Untersuchungen der Malonsäurediamide der 2. Generation	38
2.10 Synthese von Malonsäurediamiden der 1. Generation für gezielte Fragestellungen ...	41
2.10.1 Synthese der Malonsäurediamide der 1. Generation mit unterschiedlicher Alkyltettenreinheit	42
2.10.2 Synthese von Galactose-Derivaten der Malonsäurediamide der 1. Generation	44
2.10.2.1 Einführung – Targetierung mittels Erkennungsstrukturen	44
2.10.2.2 Synthese der β -D-Galactoside	45
2.10.2.3 Synthese der TRIS-Derivate	47
2.10.2.4 Synthese der Polyethylenglycol-haltigen Linkerstrukturen	48
2.10.2.5 Synthese der Glycolipide.....	51
3 Physiko-chemische Charakterisierungen	55
3.1 Vorbemerkung	55
3.2 Methoden	55

3.2.1 Differential Scanning Calorimetry (DSC)	55
3.2.2 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)	56
3.2.3 Dynamische Lichtstreuung (DLS)	57
3.2.4 Zetapotential (ζ -Potential).....	58
3.2.5 RÖNTGEN-Untersuchungen – Streuung an teilgeordneten Strukturen.....	59
3.3 Untersuchungen des Aggregationsverhaltens von wässrigen Dispersionen der Malonsäurediamide der 2. Generation	60
3.3.1 DSC-Untersuchungen der Lipide mit den Alkylkettenkombinationen OO, TO, HO, TT und HT.....	60
3.3.2 DSC-Untersuchungen der Lipide mit drei Tetradecylketten – die DiTT-Reihe.....	68
3.3.3 Erste Betrachtungen des Aggregationsverhaltens von Lipiden mit reinen Oleylketten, sowie der Ersatz von Doppelbindungen durch Methylverzweigungen – Alkylkettentyp-RTO und -THM, sowie Lipid XV und XVp.....	71
3.4 Untersuchungen zum Aggregationsverhalten der Lipide vom Kopfgruppentyp-VI	76
3.4.1 Lipide vom Kopfgruppentyp-VI – Mizellbildner	76
3.4.2 Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) bei pH 7,3.....	79
3.4.3 Untersuchungen des DNA-Komplexierungsverhaltens des Lipids TO-VI.....	81
3.4.3.1 ITC-Experimente	82
3.4.3.2 Zetapotential- und DLS-Messungen	89
3.4.3.3 Untersuchung der DNA-Komplexierung mittels DSC	91
3.4.3.4 RÖNTGEN-Untersuchungen von TO-VI-Dispersionen in An- und Abwesenheit von DNA	93
3.4.3.5 Abschließende Diskussion zur Komplexierung von DNA durch TO-VI.....	96
4 Transfektionseffizienz im Zellkultursystem – ausgewählte Ergebnisse.....	99
4.1 Einführung	99
4.2 Transfektionseffizienz von TO-VI.....	100
4.3 Transfektionseffizienz ausgewählter Lipidformulierungen mit weiteren Lipiden der TO-Reihe.....	101
5 Zusammenfassung und Ausblick.....	104
6 Experimenteller Teil	107
6.1 Verwendete Chemikalien	107
6.2 Physiko-chemische Methoden	108
6.2.1 Dispersionsmedien	108
6.2.2 Probenpräparation	109
6.2.3 Differential Scanning Calorimetry (DSC)	109
6.2.4 ITC-Experimente	110
6.2.5 DLS-Messungen	110
6.2.6 ζ -Potential-Messungen	111
6.2.7 TEM und cryo-TEM	111
6.2.8 SAXS-Messungen.....	112
6.2.9 CMC-Bestimmungsmethoden.....	112
6.3 Analysenmethoden und Reinigungsverfahren	113

6.3.1 Chromatographische Methoden.....	113
6.3.2 Schmelzpunktbestimmung	115
6.3.3 Elementaranalyse (EA).....	115
6.3.4 Massenspektrometrie (MS)	115
6.3.5 NMR-Spektroskopie.....	116
6.4 Synthese und analytische Charakterisierung der Verbindungen	117
6.4.1 Synthese der Vorstufen.....	117
6.4.1.1 Synthese der Alkylamine.....	117
6.4.1.2 Synthese der alkylierten Malonsäurediethylester	119
6.4.1.3 Synthese der alkylierten Malonsäuremonoethylester durch Monoverseifung.....	119
6.4.1.4 Synthese der BOC-Fmoc-geschützten Lysinalkylamide.....	120
6.4.1.5 Fmoc-Schutzgruppenspaltung – Synthese der ϵ -BOC-geschützten Lysinalkylamide	122
6.4.2 Synthese der Malonsäurediamide (2. Generation)	123
6.4.2.1 Allgemeine Synthesevorschriften.....	123
6.4.2.2 Synthese des Lipidrückgrats über Amidknüpfung	124
6.4.2.3 Verseifung der Ethylester in Anwesenheit einer BOC-Schutzgruppe.....	126
6.4.2.4 Kupplung der Carbonsäure mit Tris(2-aminoethyl)amin	128
6.4.2.5 Synthese der Lipide des Kopfgruppentyps-IV	131
6.4.2.6 Synthese der BOC-geschützten Verbindungen 9a,c-f,h.....	133
6.4.2.7 Synthese der Lipide des Kopfgruppentyps-VI	134
6.4.2.8 Synthese des BOC-geschützten Verbindungen 10a,c-f.....	136
6.4.2.9 Synthese der Lipide des Kopfgruppentyps-VIII.....	137
6.4.2.10 Kupplung der Carbonsäure mit Ethylendiamin.....	138
6.4.2.11 Synthese der Lipide des Kopfgruppentyps-X.....	140
6.4.2.12 Synthese der BOC-geschützten Lipide 13a,c-f.....	142
6.4.2.13 Synthese der Lipide des Kopfgruppentyps-XII.....	143
6.4.2.14 Synthese der BOC-geschützten Lipide 14a-g.....	144
6.4.2.15 Synthese der Lipide des Kopfgruppentyps-XIV	146
6.4.3 Synthese der Lipide XV und XVp.....	148
6.4.4 Synthese der glycosylierten Lipide	150
6.4.4.1 Synthese von 2-Azidoethanol.....	150
6.4.4.2 Synthese der Galactosederivate mit Acetylschutzgruppe – Glycosylierung ..	150
6.4.4.3 Synthese der Linkerbausteine	151
6.4.4.4 Synthese der Lipidvorstufen für die Glycolipidsynthese	153
6.4.4.5 Synthese der Glycolipide XVI und XVII – Spaltung der Acetatschutzgruppe	155
Literatur	157
Anhang.....	i

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Ac	Acetat
Abb.	Abbildung
Abb. S-	Abbildung im Anhang (Supplement)
ADA-SCID	schwerer kombinierter Immundefekt infolge eines Adenosindeaminasemangels (engl.: adenosine desaminase-severe combined immunodeficiency)
AHHP	2-Amino-3-hexadecyloxy-2-(hexadecyloxymethyl)propan-1-ol
Akt.	Aktivität
ASGP-R	Asialoglycoproteinrezeptor
a.u.	beliebige Einheit (engl.: arbitrary unit)
AUC	Fläche unter der Kurve (engl.: area under the curve)
BCA	Bicinchoninsäure (engl.: bicinchoninic acid)
BOC	<i>tert.</i> -Butoxycarbonyl
BOC-Lys(BOC)-OSu	N_{α},N_{ϵ} -Di-BOC-L-lysin-hydroxysuccinimidester
BOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat
BuOH	<i>n</i> -Butanol
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CDI	N,N' -Carbonyldiimidazol
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration (engl.: critical micelle concentration)
CMT	kritische Mizellbildungstemperatur (engl.: critical micelle temperature)
COSY	korrelierte Spektroskopie (engl: correlation spectroscopy)
d	Duplett (NMR)
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DC-Chol	3 β -[N -(N',N' -Dimethylaminoethan)carbamoyl]cholesterolhydrochlorid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DLS	dynamische Lichtstreuung (engl.: dynamic light scattering)
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	N,N -Dimethylformamid
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DMPE	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
DM-TAP	1,2-Dimyristoyl-3-trimethylammoniumpropanchlorid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOSPA	2,3-Dioleoyloxy- N -[2-(spermincarboxamido)ethyl]- N,N -dimethyl-1-propanaminium pentafluoroacetat
DOTAP	1,2-Dioleoyloxy-3-trimethylammoniumpropanchlorid
DOTMA	N -[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]- N,N,N -trimethylammoniumchlorid

DPH	1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien
DSC	Differential Scanning Calorimetry (engl.)
dsDNA	Doppelstrang-DNA (engl.: double-strand DNA)
dsDNA ₂₀₀₀	Doppelstrang-DNA mit 2000 Basenpaaren (engl.: double-strand DNA)
EA	Elementaranalyse
ECF	Ethylchloroformiat
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> '-ethylcarbodiimid Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEDQ	2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur (engl.: European Medicines Agency)
ESI-MS	Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie
Et	Ethyl
EtAc	Ethylacetat
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
FBS	fetales Kälberserum (engl.: fetal bovine serum)
Fmoc	(Fluoren-9-yl)methoxycarbonyl
Fmoc-Lys(BOC)-OH	<i>N</i> _ε -BOC- <i>N</i> _α -Fmoc-L-lysin
Fp	Schmelzpunkt
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie
ges.	gesättigt
GC-MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
GIXD	RÖNTGEN-Beugung unter streifendem Einfall (engl.: grazing incidence X-ray diffraction)
Gl.	Gleichung
HBTU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HLB	Hydrophile-Lipophile-Balance
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (engl.: high performance liquid chromatography)
HR-MS	hochauflösende Massenspektrometrie (engl.: high resolution mass spectrometry)
<i>IEP</i>	Isoelektrischer Punkt
IRRAS	Infrarot Reflexion-Absorption Spektroskopie (engl.: infrared reflection-absorption spectroscopy)
ITC	isotherme Titrationskalorimetrie (engl.: isothermal titration calorimetry)
Kap.	Kapitel
LUV	große unilamellare Vesikel (engl.: large unilamellar vesicles)
m	Multipllett (NMR)
MeOH	Methanol

MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MLV	multilamellare Vesikel (engl.: multilamellar vesicles)
MM-R	Makrophagen-Mannose-Rezeptor
MPPC	1-Myristoyl-2-palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
MOPC	1-Myristoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
MS	Massenspektrometrie
MsCl	Methansulfonsäurechlorid
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
M6P/IGF-II	Mannose-6-phosphat/Insulin-like-Growthfactor-II-Rezeptor
n.b.	nicht bestimmt
NGR	Asparagin-Glycin-Arginin
NMR	Kernspinresonanz (engl.: nuclear magnetic resonance)
NOE	Kern-OVERHAUSER-Effekt (engl.: nuclear-OVERHAUSER-effect)
N/P	Verhältnis von primären Aminogruppen zu Phosphateinheiten von Polynukleotiden
Nuk	Nukleotid
OMPC	1-Oleoyl-2-myristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
ONPG	<i>o</i> -Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
OPPC	1-Oleoyl-2-palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
OPPE	1-Oleoyl-2-palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
PC	Phosphatidylcholin
PCS	Photonen Korrelationspektroskopie (engl.: photon correlation spectroscopy)
pDNA	Plasmid-DNA
PMPC	1-Palmitoyl-2-myristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
POPE	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
Py	Pyridin
PyBOP [®]	Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
R _f	Retentionsfaktor
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RP	Umkehrphase (engl.: reversed phase)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR)
S	Scherebene
SAXS	Kleinwinkel-RÖNTGEN-Streuung (engl.: small-angle X-ray scattering)
siRNA	kleine interferierende Ribonukleinsäure (engl.: small interfering ribonucleic acid)
sLEX	sialyl Lewis x
SLN	feste Lipidnanopartikel (engl.: solid lipid nanoparticles)
ssDNA	Einzelstrang-DNA (engl.: single-stranded DNA)
sspDNA	Lachssamen-DNA (engl.: salmon sperm DNA)
SUV	kleine unilamellare Vesikel (engl.: small unilamellar vesicles)

t	Triplett (NMR)
Tab.	Tabelle
TBABr	Tetrabutylammoniumbromid
TBAI	Tetrabutylammoniumiodid
tech.	technische Reinheit
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran
TEA	Triethylamin
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEP	Titrationseindpunkt
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
Ts	Tosylat
TsCl	<i>p</i> -Toluolsulfonsäurechlorid
TsOH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
UV-Vis	ultraviolett-visuell
WAXS	Weitwinkel-RÖNTGEN-Streuung (engl.: wide-angle X-ray scattering)
XR	RÖNTGEN-Reflektivität (engl.: X-ray reflectivity)
X-SCID	X-chromosomal assoziierter schwerer kombinierter Immundefekt (engl.: X-linked severe combined immunodeficiency)

Symbolverzeichnis

<i>a</i>	Gitterkonstante (RÖNTGEN-Beugung)
<i>A</i>	Absorption
<i>A_{KG}</i>	Fläche der Lipidkopfgruppe
<i>äq</i>	Äquivalente
<i>c</i>	Konzentration
<i>C_p</i>	molare Wärmekapazität bei konstantem Druck
<i>d</i>	Netzebenenabstand
<i>d(DNA)</i>	Abstand zwischen parallel angeordneten DNA-Strängen in lamellaren Lipoplexen
<i>d(L_α^C)</i>	Wiederholabstand zwischen den Schichten (Lipiddoppelschicht + DNA-Gitter) in lamellaren Lipoplexen
<i>D</i>	Diffusionskoeffizient
<i>δ</i>	chemische Verschiebung (NMR)
<i>ε</i>	Dielektrizitätskonstante
<i>e</i>	Elementarladung (= 1,60219 · 10 ⁻¹⁹ C)
<i>E</i>	Elektrisches Feld
<i>η</i>	Viskosität
FI	Fluoreszenzintensität
<i>Φ</i>	Wärmestrom
<i>φ</i>	Diederwinkel

ΔG	Änderung der GIBBS-Energie
γ	Kohärenzfaktor (DLS)
ΔH	Änderung der Enthalpie
ΔH_1	Assoziationsenthalpie der Komplexbildung
ΔH_2	Dissoziationsenthalpie eines (de)protonierbaren Reaktionspartners
ΔH_{Komp}	Enthalpie, welche der Komplexbildung zuschreibbar ist
ΔH_{Tot}	Enthalpie des Gesamtkomplexbildungsprozesses inklusive Pufferdissoziation
ΔH_{Diss}	Pufferdissoziationsenthalpie
I	Intensität
I_S	Streuintensität (DLS)
J	Kopplungskonstante (NMR)
k_B	BOLTZMANN-Konstante ($= 1,830650 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$)
K	Bindungskonstante/Gleichgewichtskonstante
λ	Wellenlänge
λ_{ex}	Anregungswellenlänge
λ_{em}	Emissionswellenlänge
l_C	Länge der Alkylketten (<i>all-trans</i>)
m	Masse
μ_e	elektrophoretische Mobilität
n	Stoffmenge
θ	Streuwinkel (DLS)
θ_r	BRAGG-Winkel (RÖNTGEN-Beugung)
p	Anzahl der migrierenden Protonen
P	Packungsparameter
pK_a	negativ dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
pK_a^{app}	scheinbarer pK_a -Wert (apparent)
Ψ	Potential
Ψ_0	NERNST-Potential
Ψ_a	Potential der äußeren HELMHOLTZ-Schicht
Ψ_i	Potential der inneren HELMHOLTZ-Schicht
Ψ_S	STERN-Potential
q	Streuvektor (RÖNTGEN-Beugung und DLS)
q_{001}	lamellarer Reflex 1. Ordnung (RÖNTGEN-Beugung)
q_{002}	lamellarer Reflex 2. Ordnung (RÖNTGEN-Beugung)
q_{DNA}	Reflex 1. Ordnung vom zweidimensionalen DNA-Gitter (RÖNTGEN-Beugung)
Q	Wärmemenge
ρ	Ladungsdichte
r	Radius
R	universelle Gaskonstante ($= 8,314472 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten
s	reziproker Netzebenenabstand

ΔS	Änderung der Entropie
t	Zeit
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
T	Temperatur
$T_{0,5}$	Peakhalbwertsbreite
T_m	Hauptphasenumwandlungstemperatur
T_{off}	extrapolierte Endtemperatur
T_{on}	extrapolierte Anfangstemperatur
T_p	Vorphasenumwandlungstemperatur
T_{post}	Nachphasenumwandlungstemperatur
τ	Korrelationszeit (DLS)
V	Volumen
V_C	Alkylkettenvolumen
v	Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen im Elektrischen Feld
\emptyset	Durchmesser
x	Anzahl der Kohlenstoffatome in einer Alkylkette
y	Streuvektor (DLS)
z	Distanz

Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Vektorsysteme, welche in klinischen Studien mit genterapeutischem Hintergrund im Zeitraum von 1989-2013 zur Anwendung kamen.	2
Abb.2: Schematische Darstellung der Grundstruktur von Cytofektinen (oben links): lipophiles Grundgerüst (Blau), Linker (Rot) und kationische Kopfgruppe (Grün). Diese Regionen sind durch Übernahme der zugehörigen Farben auf drei klassische Vertreter der Cytofektine (DOTMA, DOSPA und DC-Chol) übertragen worden.	4
Abb.3: Schematischer Aufbau von Mizellen und Liposomen. Abbildungen nach BALAZS et al. ³⁴	5
Abb.4: DOPE und Cholesterol als klassische Helferlipide für Cytofektin formulierungen.	5
Abb.5: Zusammenhang zwischen Molekülform und Packungseigenschaften von Amphiphilen und daraus resultierende bevorzugte Aggregate. Abbildung modifiziert nach ISRAELACHVILI. ⁵¹	6
Abb.6: Schematischer Zusammenhang zwischen <i>P</i> , <i>HLB</i> , Lösungsmittel- und Lipideigenschaften und deren Auswirkung auf die Packungseigenschaften von Amphiphilen. Abbildung modifiziert nach ISRAELACHVILI. ⁴¹	7
Abb.7: Schematische Darstellung ausgewählter lyotroper Mesophasen (entnommen aus Arbeiten von WINTER und BALAZS et al.). ^{34,52,53}	8
Abb.8: Modelle für drei beschriebene Lipoplexstrukturtypen: lamellarer Lipoplex (A), hexagonaler Lipoplex (B) und invers-hexagonaler Lipoplex (C). Abbildung nach ZIDOVSKA et al. ⁵⁹	9
Abb.9: Von ZELPHATI und SZOKA postulierter Mechanismus für die Freisetzung von Polynukleotiden aus Lipoplexen nach XU et al. ⁷¹	10
Abb.10: Synthesestrategie der Malonamide der 1. und 2. Generation unter Verwendung des alkylierten Malonsäuremonoethylesters (blauer Kasten) als zentralen Baustein.	14
Abb.11: Strukturen der Malonamide der 2. Generation unter Angabe der Nomenklatur für den Kopfgruppentyp und den Abkürzungen für die Alkylkettenmuster.	15
Abb.12: a) Bezeichnungsbeispiel HT-X. Es ist ein Malonamid der 2. Generation mit der Kopfgruppenstruktur vom Typ-X und einer Lysin-gebundenen Tetradeckylkette sowie einer Malonsäure-gebundenen Hexadecylkette. b) Strukturen und Bezeichnungen der Malonsäurediamide der 2. Generation mit drei Alkylketten.	16
Abb.13: Häufig verwendete Vertreter verschiedener Gruppen von Aktivierungsreagenzien für Acylierungsreaktionen mit Carbonsäuren.	17
Abb.14: Reaktionsschemata der in dieser Arbeit verwendeten Amidsynthesereagenzien. Oben: PyBOP [®] und die bei der Verwendung <i>in-situ</i> entstehenden Acylierungsderivate (Phosphoniumintermediat A und Benzotriazolylester B). Unten: kommerziell erhältliches BOC-geschütztes Acylierungsreagenz von Lysin (BOC-Lys(BOC)-OSu).....	18
Abb.15: Auswahl wichtiger Amin-Schutzgruppen und deren üblichen zur Spaltung verwendeten Agenzien sowie die daraus resultierenden Produkte.	20
Abb.16: Auszüge aus NMR-Spektren welche die Signale der olefinischen Wasserstoff- und Kohlenstoffatome von Oleylamin mit unterschiedlichem Reinheitsgrad zeigen: ¹ H-NMR (a) und ¹³ C-NMR (b) von Oleylamin (rein) sowie ¹ H-NMR (c) und ¹³ C-NMR (d) von Oleylamin (tech.)	21
Abb.17: Synthesewege für die Darstellung von Oleylamin (rein).....	22
Abb.18: Syntheschema für die Darstellung von (10 <i>R,S</i>)-10-Methylhexadecanol.....	23

Abb. 19: Darstellung von (10 <i>R,S</i>)-10-Methylhexadecylamin aus dem Alkohol mit einem Alkylazid als Zwischenprodukt.	24
Abb. 20: Synthese der Alkylmalonsäuremonoethylester.	25
Abb. 21: Synthese der ϵ -BOC-geschützten <i>N</i> -Alkyllysinsamidderivate 4a-d.	26
Abb. 22: Syntheschema für die Amidkupplung zur Darstellung des Rückgrats der Malonamide der 2. Generation mit anschließender Esterverseifung.....	29
Abb. 23: Synthese der Lipide vom Tris(2-aminoethyl)amin-Typ (Kopfgruppentyp-IV, -VI und -VIII).	31
Abb. 24: Synthese der Lipide vom Ethylendiamin-Typ (Kopfgruppentyp-X, -XII und -XIV).	35
Abb. 25: Schematische Darstellung und Abbildung der original-DC des Extraktionsexperiments mit HT-X.	37
Abb. 26: Postulierter Mechanismus für die Racemisierung des Stereozentrums in α -Position der Malonsäurestruktur der Malonsäurediamide der 2. Generation über ein Enolintermediat.	38
Abb. 27: ^1H , ^1H -COSY- und die zugehörigen ^1H -NMR-Spektren für das Lipid OO-VIII gelöst in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$	38
Abb. 28: ^1H , ^{13}C -COSY- und die zugehörigen ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren in CDCl_3 für das Lipid OO-VIII.	40
Abb. 29: Ausschnitte aus den ^{13}C -NMR-Spektren von TO-X in verschiedenen Konzentrationen und Lösungsmitteln.	41
Abb. 30: Synthese des homologen Lipidpaars XV/XVp.	42
Abb. 31: Synthese der Galactoside 18 und 19 durch Umsetzung peracetylierter Galactose mit verschiedenen Alkoholkomponenten. Die Kupplung mit Propargylalkohol liefert das alkinfunktionalisierte Galactosid 18, die Umsetzung mit 2-Azidoethanol liefert das azidfunktionalisierte Galactosid 19.	45
Abb. 32: Sesselkonformation (obere Struktur) und NEWMAN-Projektion (untere Struktur) entlang der C2-C1-Achse für das β -Anomer und das α -Anomer der D-Galactose. Der Diederwinkel ϕ zwischen H1 und H2 ist blau gekennzeichnet. Das Diagramm zeigt die Abhängigkeit der vicinalen Kopplungskonstante 3J von ϕ (KARPLUS-Kurve). ¹⁹⁵	45
Abb. 33: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR Spektrum in CDCl_3 (500 MHz, 27 °C) und Strukturformel der Galactoside 18 (a) und 19 (b). Die Kopplungskonstanten, welche für H1 bestimmt wurden, entsprechen denen der β -Anomere: Galactosid 18 $^3J(\text{H1},\text{H2}) = 7,9\text{ Hz}$, Galactosid 19 $^3J(\text{H1},\text{H2}) = 8,0\text{ Hz}$	46
Abb. 34: Syntheschema für die Darstellung der substituierten TRIS-Derivate als Verzweigung für Clusterstrukturen.	47
Abb. 35: Synthese der beiden Linkerstrukturen 25b und 26 ausgehend von Tetraethylenglycol. Die Reaktionsbedingungen 1-6 sind in Tab.9 erläutert.	49
Abb. 36: Darstellung des Glycolipids XVI.	51
Abb. 37: Darstellung des Glycolipids XVII.	52
Abb. 38: Beispiel eines Wärmekapazitäts/Temperatur-Profiles als Ergebnis eines DSC-Experiments (DMPE 1 mg ml ⁻¹ in HEPES-Puffer) mit wichtigen Kenngrößen.....	56

Abb.39: a) Schematische Darstellung der Ionenverteilung in Abhängigkeit von der Entfernung zur Oberfläche eines Partikels in einem elektrolythaltigen Dispersionsmittel mit einwertigen Kationen und Anionen. b) Beispiel für drei mögliche Potentialverläufe (unterschiedliches ζ -Potential) ausgehend vom gleichen Oberflächenpotential ψ_0 des Partikels in verschiedenen Dispersionsmedien.....	59
Abb.40: DSC-Kurven der wässrigen Dispersionen der Lipide vom Alkylkettentyp-TT, -HT, -TO und -HO bei pH 10 ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$ in Carbonatpuffer). Linkes Diagramm: Lipide vom Ethylendiamin-Typ. Rechtes Diagramm: Lipide vom Tris(2-aminoethyl)amin-Typ.	61
Abb.41: DSC-Kurven der wässrigen Dispersionen der Lipide vom Alkylkettentyp-OO bei pH 10 ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$ in Carbonatpuffer).	66
Abb.42: DSC-Kurven der wässrigen Dispersionen der Lipide vom Alkylkettentyp-TO bei pH 5 ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$ in Acetatpuffer).....	68
Abb.43: DSC-Heizkurven der wässrigen Dispersion von DiTT-VI bei pH 10 ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$ in Carbonatpuffer).	69
Abb.44: Intensitätsgewichtete Größenverteilung einer Dispersion von DiTT-VI in Carbonatpuffer pH 10 ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$).....	69
Abb.45: Links: TEM-Aufnahme einer Dispersion von DiTT-IV ($c = 0,05 \text{ mg ml}^{-1}$ in HEPES-Puffer pH 7,3). Rechts: DSC-Heizkurven der wässrigen Dispersionen von DiTT-IV ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$) in Carbonatpuffer (pH 10), H ₂ O (pH ~8), HEPES-Puffer (pH 7,3) und Acetatpuffer (pH 5) im Vergleich zu einer TT-IV-Dispersion in Carbonatpuffer (pH 10).	70
Abb.46: Ergebnis einer nicht-linearen Kurvenanpassung (nach GAUß) für die DSC-Heizkurve einer Dispersion von DiTT-IV in HEPES-Puffer ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$).	71
Abb.47: Beispiele für natürlich vorkommende Methyl-verzweigte Fettsäuren oder Fettalkohole. Die dargestellten Fettsäureserien sind Vertreter aus Membranlipiden von Bakterien des Genus <i>Bacillus</i> . Phytanol kommt in Etherlipiden von Archaeobakterien vor. ^{274,275}	72
Abb.48: Abhängigkeit der Phasenübergangstemperatur von der Position der Methylverzweigung in den Alkylketten von verschiedenen 1,2-Diacyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholinen.	73
Abb.49: DSC-Heizkurven von verschiedenen homologen Malonamiden der 1. und 2. Generation mit speziellen Alkylkettenvariationen in Carbonatpuffer pH 10 ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$): a) Lipid XVp im Vergleich mit Lipid XV. b) THM-X und RTO-X im Vergleich zu TO-X. c) THM-IV und RTO-IV im Vergleich zu TO-IV. d) THM-XIV und RTO-XIV im Vergleich zu TO-XIV.....	74
Abb.50: a) Massen- und intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilungen als Ergebnis der DLS-Messungen von TO-VI-Dispersionen ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$) in Carbonatpuffer pH 10 und HEPES-Puffer pH 7,3. b) Cryo-TEM-Aufnahme einer TO-VI-Dispersion ($c = 2 \text{ mg ml}^{-1}$) in Carbonatpuffer pH 10.....	78
Abb.51: Bestimmung der CMC mit Hilfe der ITC (Methode A) am Beispiel des Lipids TO-VI. a) Wärmestrom/Zeit-Profil für die Titration einer Lipiddispersion ($c = 0,84 \text{ mM}$, HEPES-Puffer pH 7,3) in reinen HEPES-Puffer mit Titrationsinkrementen von 10 μl in Intervallen von 600 s. b) Molare Prozesswärmen der Demizellisation als Funktion der Lipidkonzentration in der Messzelle. Die rote sigmoidale Kurve wurde durch Kurvenanpassung nach BOLTZMANN aus den experimentellen Daten generiert ($R^2 = 0,9542$).....	79
Abb.52: Ermittlung der CMC mit Hilfe von Farbstoffeinschlussmethoden am Beispiel des Lipids TO-VI. Die dargestellten Ergebnisse sind die Mittelwerte aus drei Einzelmessungen. a) Ermittlung der CMC nach Methode B (Fluorescein). b) Ermittlung der CMC nach Methode C (DPH).....	80

Abb. 53: a) Wärmestrom/Zeit-Profil und b) Prozesswärmern normalisiert auf die Stoffmenge des injizierten TO-VI als Funktion von $n_{\text{TO-VI}}/n_{\text{Nuk}}$ in der Reaktionszelle für die TO-VI-zu-DNA-Titration ($c_{\text{sspDNA}} = 0,45 \text{ mM}_{\text{Nuk}}$, $c_{\text{TO-VI}} = 0,84 \text{ mM}$) in HEPES-Puffer pH 7,3. c) Wärmestrom/Zeit-Profil und d) Prozesswärmern normalisiert auf die Stoffmenge der injizierten DNA als Funktion von $n_{\text{Nuk}}/n_{\text{TO-VI}}$ in der Reaktionszelle für die DNA-zu-TO-VI-Titration ($c_{\text{TO-VI}} = 0,26 \text{ mM}$, $c_{\text{sspDNA}} = 4,85 \text{ mM}_{\text{Nuk}}$) in HEPES-Puffer pH 7,3. 84

Abb. 54: Prozesswärmern (korrigiert mittels Kontrolltitration) für den Komplexbildungsprozess zwischen sspDNA und TO-VI in drei Puffersystemen (HEPES, TRIS und MES) bei pH 7,3. a) Prozesswärmern normalisiert auf die Stoffmenge des injizierten Lipids für die TO-VI-zu-DNA-Titration ($c_{\text{sspDNA}} = 0,45 \text{ mM}_{\text{Nuk}}$, $c_{\text{TO-VI}} = 0,84 \text{ mM}$). b) Prozesswärmern normalisiert auf die Stoffmenge der injizierten DNA für die DNA-zu-TO-VI-Titration ($c_{\text{TO-VI}} = 0,26 \text{ mM}$, $c_{\text{sspDNA}} = 4,85 \text{ mM}_{\text{Nuk}}$). 85

Abb. 55: Gegenüberstellung des ζ -Potentials (dreifache Bestimmung) und der Prozessenthalpie der ITC-Experimente für die Lipoplexbildung als Funktion des molaren Verhältnisses zwischen Titrand und Titrator in HEPES-Puffer pH 7,3 für die TO-VI-zu-DNA- (a) als auch die DNA-zu-TO-VI-Titration (b). 89

Abb. 56: Partikelgröße von Lipoplexdispersionen (angegeben als z-Average-Radius) als Funktion des molaren Verhältnisses zwischen Titrand und Titrator (dreifache Bestimmung) in HEPES-Puffer pH 7,3 für die TO-VI-zu-DNA- (a) als auch die DNA-zu-TO-VI-Titration (b). 90

Abb. 57: DSC Heizkurven im Bereich von 2-95 °C von reiner sspDNA und sspDNA im Komplex mit TO-VI für verschiedene N/P-Verhältnisse (blaue Zahlen) in HEPES-Puffer pH 7,3. Die DNA-Konzentration betrug 1 mg ml^{-1} 92

Abb. 58: a) SAXS-Diffraktogramm (experimentelle Daten und GAP-Fit) von TO-VI ($c = 0,2 \text{ g ml}^{-1}$) in HEPES-Puffer pH 7,3 bei 25 °C. b) Aus dem GAP-Fit resultierendes Elektronendichteprofil. z ist die Distanz in Å und ρ die Elektronendichte. 94

Abb. 59: a) SAXS-Diffraktogramm von TO-VI/sspDNA-Komplexen (N/P 1) in HEPES-Puffer pH 7,3 bei 25 °C. b) Schematische Darstellung des TO-VI/sspDNA-Komplexes. c) TEM-Aufnahme einer TO-VI/sspDNA-Komplexdispersion (N/P 3) in HEPES-Puffer ($c = 0,05 \text{ mg ml}^{-1}$). 95

Abb. 60: Graphische Zusammenfassung der DNA-Komplexierung durch TO-VI. 98

Abb. 61: Ergebnisse des ONPG- (β -Galactosidaseaktivität) und MTT-Assays (Viabilität) für TO-VI-Lipoplexe in unterschiedlichen N/P-Verhältnissen mit pCMV-SPORT- β -Gal (Fixkonzentration: $0,15 \mu\text{g DNA pro } 200 \mu\text{l A549-Zellsuspension mit } 2 \times 10^4 - 2,5 \times 10^4 \text{ Zellen pro ml}$). 100

Abb. 62: Ausgewählte Ergebnisse des ONPG- (β -Galactosidaseaktivität) und MTT-Assays (Viabilität) für die Lipoplexe der Lipide TO-IV, TO-X, TO-XII und TO-XIV im effektivsten Cytofektin/DOPE-Verhältnis (n/n) sowie im effektivsten N/P-Verhältnis mit pCMV-SPORT- β -Gal (Fixkonzentration: $0,1 \mu\text{g DNA pro } 200 \mu\text{l A549-Zellsuspension mit } 2 \times 10^4 \text{ Zellen pro ml}$). 102

Abb. 63: Ausgewählte Ergebnisse des ONPG- (β -Galactosidaseaktivität) und MTT-Assays (Viabilität) für die Lipoplexe der Lipide TO-IV, TO-X, TO-XII und TO-XIV im effektivsten Cytofektin/DOPE-Verhältnis (n/n) sowie im effektivsten N/P-Verhältnis mit p-CMV-SPORT- β -Gal (Fixkonzentration: $0,1 \mu\text{g DNA pro } 200 \mu\text{l A549-Zellsuspension mit } 2 \times 10^4 \text{ Zellen pro ml}$). 103

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Anwendungsgebiete der von 1989-2013 gemeldeten klinischen Studien, welchen ein gentherapeutischer Ansatz zu Grunde liegt.¹⁰ 2

Tab. 2: Ausbeuten der drei Methoden für die Darstellung von Oleylamin (rein). 22

Tab.3: Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der Fmoc-Schutzgruppenspaltung für verschiedene Amin/DMF-Gemische nach GREEN. ¹⁰⁹	27
Tab.4: Ausbeuten für die Synthese der Verbindungen 7a-h durch Kupplung von 6a-h mit Tris(2-aminoethyl)amin.	30
Tab.5: Gegenüberstellung der beiden Aufarbeitungsmethoden nach der Abspaltung der BOC-Schutzgruppe mit HCl (Kap. 6.4.2.1 Methode D) im Zweiphasensystem Wasser/Ethylacetat.	32
Tab.6: Vergleich der Ausbeuten für die Synthesen der Verbindungen 15a,b; 16a,b und der Lipide XV sowie XVp, welche im Rahmen dieser Arbeit erzielt wurden (Methode A), mit den Ausbeuten der bereits in der Literatur veröffentlichten Synthesewege (Methode B/C).	43
Tab.7: Übersicht über eine Auswahl von möglichen Erkennungsstrukturen für die Zelltargetierung bei systemischer Anwendung.	44
Tab.8: Übersicht über die Ausbeuten verschiedener Wege zur Darstellung von Monotosylaten und Monomesylaten aus Tetraethylenglycol.	49
Tab.9: Synthese der Verbindung 25a durch <i>O</i> -Alkylierung des Tetraethylenglycolderivats 24 mit α -Bromessigsäure- <i>tert.</i> -butylester unter Verwendung verschiedener Alkylierungsverfahren.	50
Tab.10: Beispiele für lyotrope flüssigkristalline Phasen, deren Abkürzungen sowie die dazugehörigen Reflexpositionen und Verhältnisse im RÖNTGEN-Diffraktogramm nach WINTER. ^{52, 53}	60
Tab.11: Die Hauptumwandlungs- (T_m) und Vorumwandlungstemperaturen (T_p) sowie die dazugehörigen Enthalpien (ΔH) für die DSC-Messungen der Lipide der TT-, HT-, TO- und HO-Reihe in Carbonatpuffer (pH 10, $c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$) im Temperaturbereich von 2-95 °C unter Verwendung einer Heizrate von 60 K h ⁻¹	62
Tab.12: Phasenübergangstemperaturen (T_m) und, wenn angegeben, Enthalpiewerte (ΔH) ausgewählter Phospholipide mit Glycerol-Rückgrat in verschiedenen Dispersionsmitteln (wassergesättigtes Milieu). ^{35,246-252}	65
Tab.13: Massengewichtete und intensitätsgewichtete Partikelgrößenpopulationen (Modus der Verteilung angegeben als Radius r sowie deren Häufigkeit angegeben als Peakfläche A in %) für Lipiddispersionen ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$) von Lipiden der TO-Reihe in Acetatpuffer pH 5 bei 25 °C.	67
Tab.14: Phasenübergangstemperatur (T_m), -enthalpie (ΔH) und Halbwertsbreite ($T_{0,5}$) sowie extrapolierte Anfangs- (T_{on}) und Endtemperatur (T_{off}) von DiTT-IV-Dispersionen ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$) in verschiedenen wässrigen Dispersionsmedien.	70
Tab.15: Übersicht über die DSC-Kenngrößen T_m , $T_{0,5}$, T_{on} , T_{off} und ΔH für die in Abb.49 dargestellten DSC-Heizkurven in Carbonatpuffer pH 10.	75
Tab.16: Partikelgröße der Aggregate, welche in wässrigen Dispersionen der Lipide vom Kopfgruppentyp-VI gebildet werden (Carbonatpuffer pH 10, $c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$).	77
Tab.17: CMC-Werte der Lipide vom Kopfgruppentyp-VI. Die angegebenen Werte sind mit drei verschiedenen Methoden ermittelt worden: Methode A (ITC), Methode B (Fluorescein-Einschluss) und Methode C (DPH-Einschluss).	81
Tab.18: Vergleich der mit Hilfe der ITC ermittelten TEP - und ΔH_{Tot} -Werte in Abhängigkeit vom Puffersystem. Es sind sowohl die Ergebnisse für die TO-VI-zu-DNA- als auch die DNA-zu-TO-VI-Titration dargestellt.	86
Tab.19: Gegenüberstellung der für den Komplexbildungsprozess zwischen sspDNA und TO-VI mit Hilfe der ITC ermittelten Enthalpie- und TEP -Werte mit den ermittelten isoelektrischen Punkten (IEP , Kap. 3.4.3.2) und den effektivsten N/P-Verhältnissen im ONPG-Assay (Kap. 4.2).	88

1 Einleitung

1.1 Gentherapie

Die Aufklärung der DNA-Struktur 1953 durch WATSON und CRICK¹ legte die Voraussetzung für das molekulare Verständnis des genetischen Codes und von Vererbungsprozessen. Durch die Entschlüsselung des humanen Genoms 2001 wurde ein weiterer Grundstein für das Verständnis genetischer Prozesse gelegt.² Viele Erbkrankheiten konnten auf molekularer Ebene aufgeklärt werden. Die monogenen Erbkrankheiten, für die es bis zum heutigen Zeitpunkt keine kausale Behandlung gibt, rückten stärker in den Focus der Gentherapie. In diesem Rahmen sind folgende Krankheiten zu nennen: X-SCID, ADA-SCID, Mukoviszidose, Hämophilie A und Hämophilie B.³

Die Gentherapie bezeichnet das Einbringen von genetischem Material in Zellen oder Gewebe mit dem Ziel durch die Expression und Funktion dieser Gene therapeutischen oder präventiven Nutzen zu erlangen.⁴ Dabei gilt diese Therapieform nicht mehr als eine rein experimentelle Behandlungsstrategie. So wurde im Jahr 1990 erstmals eine erfolgreiche gentherapeutische Behandlung am Menschen beschrieben.⁵ Dabei handelte es sich um ein vierjähriges, an ADA-SCID erkranktes Mädchen, dem man Lymphozyten entnahm und diese *in-vitro* mit einem intakten ADA-Gen transduzierte. Nach Reinfundierung der Lymphozyten trat eine Verbesserung des Krankheitszustandes auf. Im Jahre 2012, 22 Jahre nach der ersten erfolgreichen Gentherapie am Menschen, wurde von der EMA mit Glybera® (EMA/506772/2012) erstmals ein Virus-basiertes Gentherapeutikum zugelassen.⁶ Das Arzneimittel, mit der Wirksubstanz „alipogene tiparvovec“, dient der Behandlung von Lipoproteinlipase-Defizienz. Dabei handelt es sich um eine monogene Erbkrankheit, welche auf einen Gendefekt der Lipoproteinlipase basiert.

Des Weiteren ist die Gentherapie längst in der deutschen und europäischen Gesetzgebung verankert. So ist nach §5 Embryonenschutzgesetz die genetische Veränderung von Keimbahnzellen aus ethischen Gründen verboten und somit auf Körperzellen begrenzt. Ferner wird der Begriff Gentherapeutikum in der Richtlinie 2009/120/EG und im §4 Abs. 9 Arzneimittelgesetz eindeutig definiert.

Durch die Entdeckung und Entwicklung des „Gene Silencing“, mit Hilfe von Antisense Oligonukleotiden⁷ oder siRNA^{8,9}, hat sich das Spektrum der Zielerkrankungen für die Gentherapie erweitert. So traten auch erworbene Krankheiten, wie Tumor- oder Viruserkrankungen, in den Focus der Gentherapie. In Tab. 1 ist eine Übersicht über die Anwendungsgebiete von Gentherapeutika in klinischen Studien im Zeitraum von 1989 bis 2013 dargestellt.

Tab. 1: Anwendungsgebiete der von 1989-2013 gemeldeten klinischen Studien, welchen ein gentherapeutischer Ansatz zu Grunde liegt.¹⁰ Angegeben sind der prozentuale Anteil der klinischen Studien mit gemeinsamer Indikation sowie die absolute Anzahl der Studien.

Anwendungsgebiete/Krankheiten	Anteil [%] (Anzahl)	Anwendungsgebiete/Krankheiten	Anteil [%] (Anzahl)
Krebserkrankungen	64,2 (1264)	neurologische Erkrankungen	1,9 (37)
monogene Erbkrankheiten	8,9 (176)	Augenerkrankungen	1,4 (28)
Infektionskrankheiten	8,2 (162)	inflammatorische Erkrankungen	0,7 (13)
kardiovaskuläre Erkrankungen	8,1 (160)	Sonstige	6,6 (129)

„Nackte“ Polynukleotide eignen sich nur bedingt für die Gentherapie, da sie als Polyanion und Makromolekül nur ineffizient von Zellen aufgenommen werden. Des Weiteren werden sie von Nukleasen abgebaut.¹¹ Um diese biopharmazeutischen Probleme zu überwinden, bedient man sich spezieller Vehikelsysteme, den so genannten Vektoren. Diese werden in zwei Hauptkategorien eingeteilt: die viralen und die nicht-viralen Vektoren. Der Anteil verschiedener Vektorsysteme in klinischen Studien mit gentherapeutischem Hintergrund nach dem Stand vom Juli 2013 ist in Abb. 1 zusammengefasst.

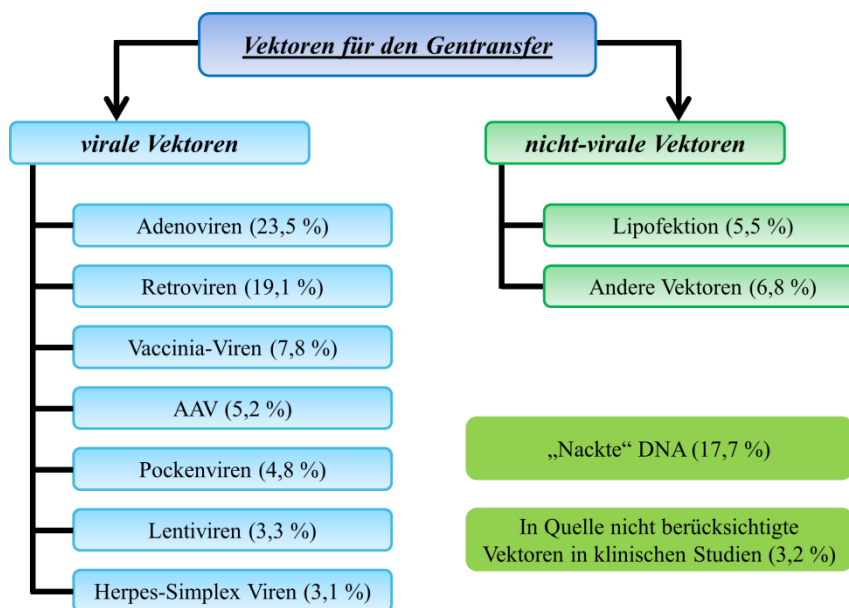


Abb. 1: Vektorsysteme, welche in klinischen Studien mit gentherapeutischem Hintergrund im Zeitraum von 1989-2013 zur Anwendung kamen.¹⁰ Die prozentuale Häufigkeit der Anwendung ist in Klammern angegeben.

Die derzeit am häufigsten eingesetzten Systeme stellen die viralen Vektoren dar, deren Gentransferprozess im Rahmen der Gentherapie als Transduktion bezeichnet wird, um den Prozess von der natürlichen Infektion abzugrenzen.^{12,13} Virale Vektoren sind replikationsdefiziente Viren und sie zeichnen sich durch ihre hohe Effizienz beim Transfer des genetischen Materials aus. Weiterhin ermöglicht die Verwendung spezieller Virustypen, wie

Retroviren oder Adeno-assoziierte Viren (AAV), eine dauerhafte Expression eingeschleuster Gene.^{3,13,14} Dem gegenüber stehen einige Nachteile viraler Vektoren: die geringe Beladungskapazität mit Polynukleotiden, die aufwendigen und kostenintensiven Herstellungsverfahren, das immunogene und kanzerogene Potential, sowie die Gefahr der Rückbildung pathogener Viren.¹⁵⁻¹⁷

Aufgrund der Nachteile der viralen Vektoren rücken nicht-virale Vehikelsysteme in den Fokus der Gentherapie. Der Gentransfer mit nicht-viralen Vektoren wird als Transfektion bezeichnet, wobei es sich um ein Kunstwort aus Transformation und Infektion handelt.¹⁸ Zu den nicht-viralen Vektoren zählen sowohl chemische als auch physikalische Systeme. Physikalische Systeme beinhalten Methoden wie Mikroinjektion von Polynukleotiden in Zellen, Bioballistik mittels „Gene Gun“, Elektroporation, Sonoporation und Magnetofektion.¹¹ Bei den chemischen Vektoren zählen der Polynukleotidtransfer mit kationischen Polymeren (Polyfektion) und kationischen Lipiden (Lipofektion) zu den bedeutendsten Methoden. Wichtige Polymere für den Gentransfer sind Poly-L-Lysin (PLL) und Polyethylenimin (PEI). Da Polymersysteme jedoch nicht Thema dieser Arbeit sind, soll hier auf zusammenfassende Literatur hingewiesen werden.¹⁹⁻²³ Die Lipofektion wird in Kap.1.2 ausführlicher betrachtet.

In der Gentherapie gibt es zwei grundlegende Behandlungsstrategien: die *in-vivo* und die *ex-vivo* Strategie. Beim *in-vivo* Gentransfer wird der Patient direkt mit dem genetischen Material behandelt.²⁴ Dabei kann der Vektor systemisch oder lokal appliziert werden. Beim *ex-vivo* Gentransfer werden dem Patienten Zellen entnommen und in Kultur mit dem Vektor behandelt. Anschließend werden die genetisch modifizierten Zellen dem Patienten reimplantiert/reinfundiert.²⁴ Diese Strategie wird unter anderem für die gentherapeutische Behandlung von Blutzellen genutzt.

1.2 Lipofektion und Lipidassoziate

1987 prägten FELGNER et al. den Begriff Lipofektion mit der Erstbeschreibung des kationischen Lipids DOTMA (siehe Abb.2), welches erfolgreich für *in-vitro* Gentransferexperimente eingesetzt wurde.^{25,26} Seit dieser Zeit sind die kationischen Lipide, auch Cytofektine genannt, in den Fokus der Gentherapie gerückt und stellen derzeit den größten Anteil an nicht-viralen Vektoren in klinischen Studien dar (Abb. 1). Die Gründe hierfür sind die Vorteile der Lipofektion gegenüber der viralen Transduktion: eine vergleichsweise preiswerte und einfache Herstellung der Vektorsysteme, welche auch in größeren Maßstäben realisierbar ist, das Fehlen von immunogen wirkenden Proteinkomponenten und das fehlende

Einleitung

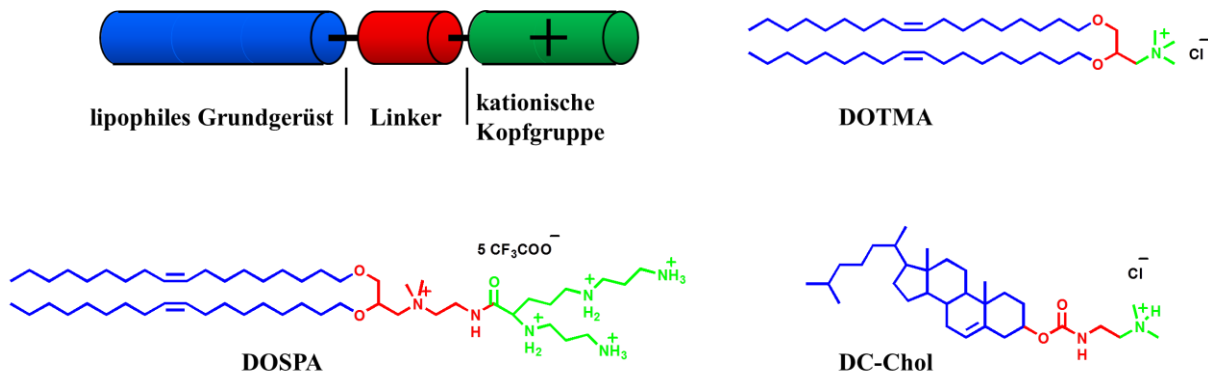


Abb.2: Schematische Darstellung der Grundstruktur von Cytofektinen (oben links): lipophiles Grundgerüst (Blau), Linker (Rot) und kationische Kopfgruppe (Grün). Diese Regionen sind durch Übernahme der zugehörigen Farben auf drei klassische Vertreter der Cytofektine (DOTMA, DOSPA und DC-Chol) übertragen worden.

onkogene Potential, sowie die Möglichkeit auch größere Polynukleotide zu übertragen.²⁷ Dennoch stehen bis zum heutigen Zeitpunkt die kationischen Lipide den viralen Systemen in der Effektivität des Gentransfers nach.^{21,28} Zudem stellt die Toxizität vieler kationischer Lipide ein Problem dar.²⁸

In den vergangenen zwei Jahrzehnten wurde eine Vielzahl von kationischen Lipiden synthetisiert. Da diese sehr vielfältige chemische Strukturen besitzen, soll hier auf einige Übersichtsartikel verwiesen werden.^{23,29,30} Dennoch besitzen alle Cytofektine eine gemeinsame Grundstruktur (Abb.2): ein lipophiles Grundgerüst, welches über eine Linkerstruktur mit einer kationischen Kopfgruppe verbunden ist. Dabei kann die lipophile Struktur sowohl von einer unterschiedlichen Anzahl von Alkylketten mit variabler Länge und Sättigungsgrad, als auch von Steroidstrukturen, wie Cholesterol, gebildet werden (siehe DC-Chol Abb.2). Die Linkerstruktur kann sehr ausgedehnt sein oder lediglich aus dem Lipidrückgrat bestehen. Der kationische Kopfbereich bietet weitere zahlreiche Variationsmöglichkeiten. So können permanente Kationen, wie quartäre Ammoniumionen, oder protonierbare Gruppen, wie primäre Amine oder Guanidinfunktionen, für die positive Ladung verantwortlich sein. Des Weiteren variiert die Anzahl der kationischen/basischen Funktionen. So spricht man bei einer kationischen/basischen Gruppe von monovalenten Lipiden, bei mehreren Ladungen von polyvalenten Lipiden.

Der Aufbau der Cytofektine zeigt, dass sie zu den klassischen Amphiphilen gehören. Sie bestehen aus einem hydrophilen Kopfbereich und aus einem hydrophoben Alkylkettenbereich. Somit bilden sie im wässrigen Milieu verschiedene Molekülassoziate/Molekülaggregate. Die treibende Kraft für die Assoziatbildung ist der hydrophobe Effekt, welcher von den Alkylketten ausgeht.³¹ Die Aggregationseigenschaften bestimmen auch die Struktur der

Komplexe zwischen Cytofektinen und DNA, was in den folgenden Abschnitten näher erläutert werden soll.

Kationische Lipide werden in der Regel als liposomale Formulierungen eingesetzt. Liposomen sind Lipidaggregate, welche 1964 erstmals von BANGHAM beschrieben wurden.³² Der Begriff Liposom wurde 1968 von SESSA und WEISSMANN geprägt.³³ Liposomen bestehen aus einer oder mehreren Lipiddoppelschichten, welche das wässrige Vesikelinnere von der äußeren wässrigen Phase (Dispersionsmittel) abgrenzen (siehe Abb. 3). Je nach der Größe der Vesikel und der Anzahl der Lipiddoppelschichten unterscheidet man zwischen:³⁵

- kleinen unilamellaren Vesikeln (SUV) – eine Lipiddoppelschicht, $\varnothing < 100$ nm,
- großen unilamellaren Vesikeln (LUV) – eine Lipiddoppelschicht, $\varnothing > 100$ nm,
- multilamellaren Vesikeln (MLV) – mehrere Lipiddoppelschicht welche von einer wässrigen Schicht separiert sind.

Die Grenzen zwischen LUV und SUV sind fließend. So bezeichnen einige Autoren schon Vesikel mit einem Durchmesser über 50 nm als LUV.³⁶

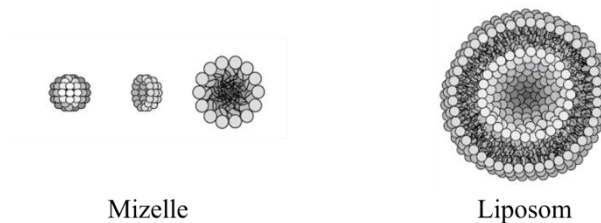


Abb. 3: Schematischer Aufbau von Mizellen und Liposomen. Abbildungen nach BALAZS et al.³⁴

Kationische Liposomen bestehen in der Regel aus einem Cytofektin und einem neutralen Helferlipid.²⁹ Als Helferlipid kommen häufig Cholesterol und DOPE zum Einsatz (siehe Abb. 4). Diesen wird neben der Erleichterung der Liposomenpräparation zusätzlich eine transfektionssteigernde Wirkung zugeschrieben.^{27,37,38} Bei der Formulierung kationischer Liposomen ergeben sich jedoch Schwierigkeiten hinsichtlich der reproduzierbaren Herstellung im Großmaßstab sowie der Lagerung. So ist Art und Größe der Liposomen stark von der Herstellungsmethode und den Eigenschaften des Dispersionsmittels abhängig.³⁹ Des

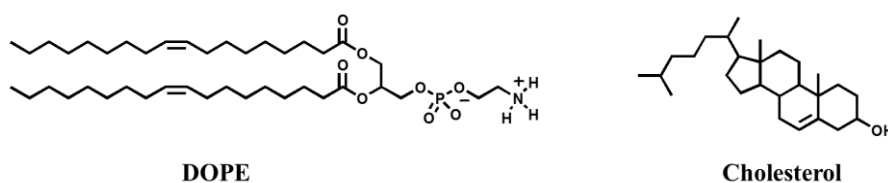


Abb. 4: DOPE und Cholesterol als klassische Helferlipide für Cytofektinformulierungen.

Weiteren gibt es Stabilitätsprobleme durch Fusionsprozesse. Das diese Probleme jedoch überwindbar sind, zeigen kommerziell erhältliche, etablierte Liposomenformulierungen wie Lipofectin® (DOTMA/DOPE, 1/1, m/m) und Lipofectamine® (DOSPA/DOPE, 3/1, m/m).^{25,40}

Im vergangenen Jahrzehnt haben auch „Solid Lipid Nanoparticles“ (SLN's) Anwendung in der Lipidvermittelten Gentransfektion gefunden.²³

Auch Mizellen eignen sich als Formulierungssystem für die Lipofektion. Der Begriff Mizelle für Assoziationskolloide wurde Anfang des 20. Jahrhunderts von MCBAIN geprägt.^{41,42} Nur wenige mizellare Lipidformulierungen für den Gentransfer werden derzeit beschrieben.⁴³⁻⁴⁷ Dies kann auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass Mizellbildner als stark oberflächenaktive Stoffe in der Regel mit Membranschädigungen und somit mit zytotoxischen Eigenschaften einhergehen. Dennoch haben sie Vorteile gegenüber den liposomalen Formulierungen. Mizellen sind kolloidale Aggregate, welche sich spontan aus Amphiphilen in Lösung bilden, wodurch die Herstellung wesentlich einfacher im Vergleich zur Liposomenherstellung ist.⁴² Zudem sind sie thermodynamisch stabil.⁴²

Die Selbstaggregation erfolgt jedoch nur oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) und der kritischen Mizellbildungstemperatur (CMT).^{41,42,48,49} Unterhalb der CMC liegen mizellbildende Amphiphile gelöst vor und unterhalb der CMT kristallisieren die Amphiphile aus und bilden trübe Suspensionen.

Die Art der Molekülaggregate, welche von Amphiphilen gebildet werden, ist abhängig von ihrer Molekülgeometrie. Der Zusammenhang zwischen Molekülform und Aggregationsverhalten wurde 1976 erstmals ausführlich von ISRAELACHVILI beschrieben und ist in Abb. 5 dargestellt.⁵⁰ Als Maß für die Molekülgeometrie des Amphiphils dient hierbei der kritische Packungsparameter (P), welcher nach Gl. 1 berechnet wird:⁴¹

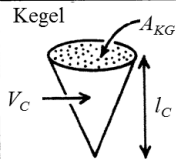
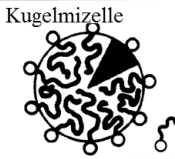



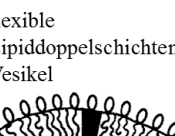


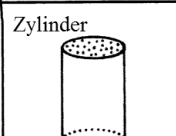
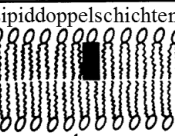
P	kritische Packungsform	Aggregatstruktur
$< 1/3$	Kegel 	Kugelmizelle 
$1/3-1/2$	Kegelstumpf 	zylindrische Mizelle 
$1/2-1$	Kegelstumpf 	flexible Lipiddoppelschichten, Vesikel 
~ 1	Zylinder 	Lipiddoppelschichten planar 
> 1	inverser Kegelstumpf 	inverse Mizellen 

Abb. 5: Zusammenhang zwischen Molekülform und Packungseigenschaften von Amphiphilen und daraus resultierende bevorzugte Aggregate. Thermodynamisch bevorzugte Aggregatstrukturen werden durch das Zusammenwirken von Entropie und Packungsmöglichkeiten aufgrund der Molekülform bestimmt. Abbildung modifiziert nach ISRAELACHVILI.⁵¹

Einleitung

$$P = \frac{V}{A_{KG} \times l_C} \quad (\text{Gl. 1}).$$

Dabei stellen A_{KG} die von der Kopfgruppe des Amphiphils eingenommene Fläche, V_C das Volumen der Kohlenwasserstoffketten und l_C deren kritische Länge dar. Der Zusammenhang zwischen P und den bevorzugten Molekülaggregaten ist in Abb.5 veranschaulicht. So bilden Amphiphile mit $P < 1/3$ (kegelförmige Molekülgeometrie) sphärische Mizellen und Amphiphile mit $1/2 < P < 1$ (Kegelstumpf) vesikuläre Strukturen. Diese Lipide sind befähigt gekrümmte Lipiddoppelschichten auszubilden – eine Voraussetzung für die Ausbildung von Vesikeln. Lipide mit $P \approx 1$ (Zylinder) formieren auch Lipiddoppelschichten, wobei sich durch die fehlende Membrankrümmung eher planare lamellare Strukturen ausbilden.

Es soll aber darauf hingewiesen werden, dass nicht nur die Molekülform allein die Art der Molekül ASSOZIATE bestimmt. Auch die Konzentration des Amphiphils und die Zusammensetzung des Lösungsmittels (Ionenstärke, pH-Wert, Art des Lösungsmittels) sowie die Temperatur haben Einfluss auf die Aggregatstruktur. Dabei wirken sich die Umgebungsbedingungen auch auf die bevorzugte Packungsgeometrie aus. Den komplexen Zusammenhang zwischen Struktur-bedingten und Lösungsmittel-bedingten Einflüssen auf P veranschaulicht Abb.6.

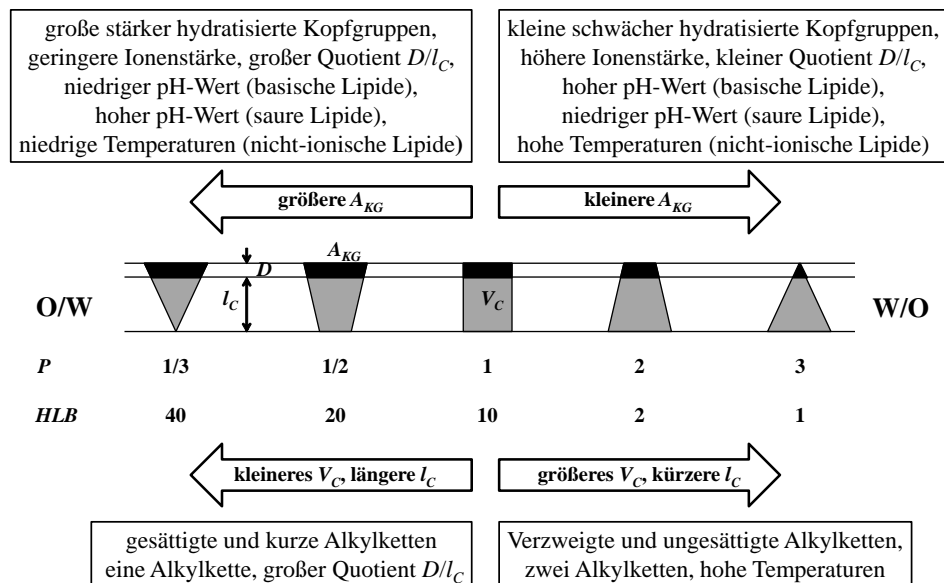


Abb.6: Schematischer Zusammenhang zwischen P , HLB , Lösungsmittel- und Lipideigenschaften und deren Auswirkung auf die Packungseigenschaften von Amphiphilen. Abbildung modifiziert nach ISRAELACHVILI.⁴¹

Der folgende Abschnitt geht genauer auf die Strukturen der Lipid/DNA-Komplexe (Lipoplexe) ein. Zuvor soll jedoch die Nomenklatur von lyotropen flüssigkristallinen Phasen (Mesophasen) erläutert werden, wodurch die Struktur und Bezeichnung der Lipoplexe verständlicher wird.

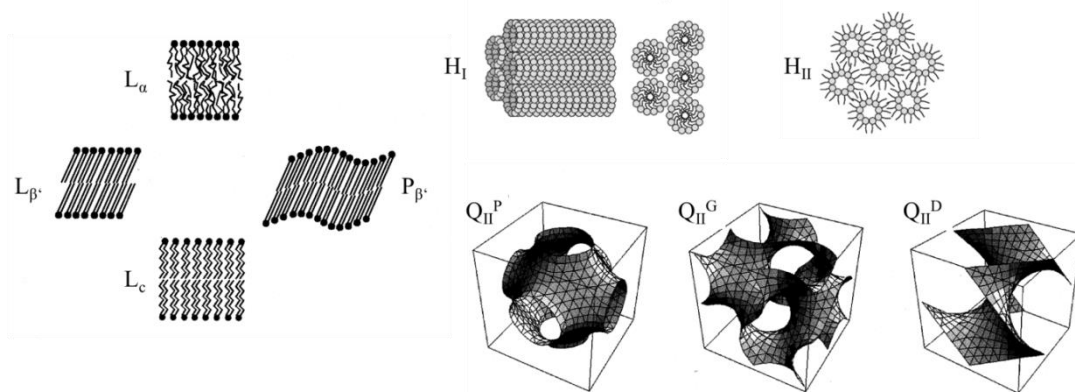


Abb. 7: Schematische Darstellung ausgewählter lyotroper Mesophasen (entnommen aus Arbeiten von WINTER und BALAZS et al.)^{34,52,53}. Die Abkürzungen der Mesophasen sind im Text erläutert. Es sind drei lamellare Mesophasen dargestellt: die flüssig-kristalline L_α -Phase, die L_β -Gelpase mit geneigten Amphiphilen und die kristalline L_c -Phase. Des Weiteren ist die „rippled“-Phase mit geneigten Molekülen dargestellt (P_β). Die hexagonalen Phasen sind in ihrer normalen (H_I) und in ihrer inversen (H_{II}) Form abgebildet. Zusätzlich sind drei kubische Mesophasen dargestellt. Die hochgestellten Buchstaben P (primitiv), G (gyroid) und D (diamant-Typ) kodieren für das Symmetrieverhalten der drei inversen kubischen Phasen Q_{II} .

Eine Auswahl bekannter lyotroper Mesophasen ist in Abb.7 dargestellt. Die Nomenklatur wurde von LUZATTI geprägt und im Zuge neuer Erkenntnisse von anderen Wissenschaftlern ergänzt.^{35,54} Folgende Nomenklatur wird in dieser Arbeit verwendet:

Fernordnung (engl. long range order):

- L – lamellar (eindimensional),
- P – „rippled“ (zweidimensional geneigt oder zentriert),
- H – hexagonal (zweidimensional),
- Q – kubisch (dreidimensional),
- L_c – kristallin lamellar (dreidimensional),

tiefgestellte Indizes in griechischen Buchstaben für die Nahordnung (engl. short range conformation) der Alkylketten:

- α – ungeordnet flüssigartig,
- β – teilweise geordnet gelartig, ungeneigt,
- β' – teilweise geordnet gelartig, geneigt.

Die folgenden tiefgestellten Indizes kennzeichnen das Phasenverhalten:

- I – normale Phase und
- II – inverse Phase.

In den vergangenen zwei Jahrzehnten wurden wichtige Erkenntnisse über die Struktur von Lipoplexen gewonnen. So wurde anfänglich postuliert, dass die DNA elektrostatisch an der Oberfläche von kationischen Liposomen gebunden ist.^{27,29,55} In der Regel ist der Lipoplexaufbau jedoch wesentlich kompakter, was in der Beschreibung der „Spaghetti-Meatball“-Strukturen zum Ausdruck kommt.^{56,57} Im Laufe der Zeit konnten durch RÖNTGEN-

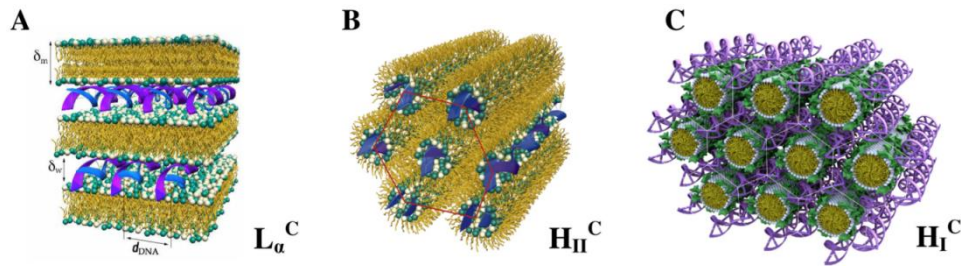


Abb. 8: Modelle für drei beschriebene Lipoplexstrukturtypen: lamellarer Lipoplex (A), invershexagonaler Lipoplex (B) und hexagonaler Lipoplex (C). Abbildung nach ZIDOVSKA et al.⁵⁹

Beugungsexperimente verschiedene Lipoplexmikrostrukturen aufgeklärt werden, wobei RÄDLER et al. 1997 Pionierarbeit auf diesem Gebiet lieferten.⁵⁸ SAXS-Experimente mit DOTAP/DOPC- bzw. DOTAP/DOPE-Mischungen im Komplex mit DNA zeigten einen lamellaren Lipoplexaufbau, wobei die DNA sandwichartig zwischen Lipiddoppelschichten eingelagert ist. Da die Lipiddoppelschichten der L_{α} -Phase von Lipidassoziaten entsprachen, aber zusätzlich DNA komplexierten, wurde in der Nomenklatur ein hochgestelltes C, für englisch „complex“, eingeführt. In diesen von RÄDLER et al. erstmals beschriebenen L_{α}^C -Strukturen liegt die komplexierte DNA in einem eindimensionalen Gitter vor (siehe Abb. 8). Diese gitterförmige DNA-Anordnung wurde auch in nachfolgenden Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen für L_{α}^C -Komplexe mit verschiedenen kationische Lipiden beschrieben.⁶⁰⁻⁶² Neben der L_{α}^C -Lipoplexstruktur existieren auch andere Assoziatformen (siehe Abb. 8). 1998 berichteten KOLTOVER et al. erstmals über die invershexagonale Lipoplexstruktur (H_{II}^C) für DOTAP/DOPE-Mischungen im Komplex mit DNA. Dabei liegt die DNA innerhalb der im hexagonalen Gitter angeordneten Lipidröhren komplexiert vor.⁶³ Die hexagonale Lipoplexstruktur (H_I^C) wurde 2006 erstmals von EWERT et al. für ein kationisches Lipid mit einer voluminösen Dendrimär-artigen Kopfgruppenstruktur beschrieben.⁶⁴ Die DNA liegt in diesem Fall zwischen den Lipidröhren komplexiert in einer wabenförmigen Symmetrie vor. In jüngerer Zeit wurden auch kubische Lipoplexe gefunden.⁶⁵ Der Lipoplexaufbau steht auch im Zusammenhang mit der Effektivität des Gentransfers. So besitzen Lipoplexe von L_{α}^C -Typ einen stabilisierenden Effekt auf die DNA, da diese im Lipoplexinneren teilweise vor dem Abbau durch DNasen geschützt ist.²⁷ Somit ist die L_{α}^C -Struktur günstig für die *in-vivo* Lipofektion. Auch der H_{II}^C -Phase wird ein positiver Einfluss auf die Transfektionseffektivität zugeschrieben, da sie die intrazelluläre Freisetzung des genetischen Materials fördert.²⁷ Auf diesen Freisetzungsmechanismus soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

Die Wege der zellulären Aufnahme von Lipoplexen und die intrazelluläre Freisetzung des genetischen Materials sind bis zum jetzigen Zeitpunkt nur teilweise verstanden. Für eine

Auseinandersetzung mit diesem Thema soll auf zusammenfassende Literatur verwiesen werden.⁶⁶⁻

⁶⁹ Nach aktuellem Stand der Forschung ist die Endozytose der Hauptaufnahmeweg für Lipoplexe in die Zelle. Für einen erfolgreichen Gentransfer muss nach der Endozytose das genetische Material aus dem Endosomeninneren freigesetzt werden, bevor es dem lysosomalen Abbau unterzogen wird. Die Ausbildung der H_{II}^C -Struktur vermag diesen Schritt zu ermöglichen. Eine besondere Bedeutung kommt hier dem Helferlipid DOPE zu, da die Endosomenreifung und die damit verbundene pH-Wert Senkung (von pH 7,4 [in der Regel Zellumgebung] auf pH 6,5 [frühes Endosom] bis hin zu pH 5 [spätes Endosom])⁷⁰ eine Vergrößerung von P durch Protonierungseffekte induziert, wodurch die invershexagonale gegenüber der lamellaren Anordnung bevorzugt wird.^{63,66} Die invershexagonale Phase, als fusogene Struktur, triggert die Fusion und Mischung von Lipoplexstrukturen mit der Endosomenmembran, was letztendlich zur Freisetzung des genetischen Materials führt.

ZELPHATI und SZOKA postulierten für diesen Schritt einen als „Flip-Flop“-Mechanismus bezeichneten Weg der endosomalen Freisetzung (siehe Abb.9).⁷² Hierbei induziert der Lipoplex, aufgrund der positiven Ladung, im Endosom neben der Membranfusion den „Flip-Flop“ von anionischen Lipiden von der zytosolischen Seite der Endosomenmembran auf die luminal Seite. Die Mischung der Cytofektine mit den anionischen Lipiden der Endosomenmembran führt weiterhin zum Ladungsausgleich durch Ionenpaarbildung, wodurch die DNA aus dem Komplex in das Zytosol freigesetzt wird. Neuere Arbeiten auf dem Gebiet zeigen, dass auch andere Mesophasen für die endosomale Freisetzung von Lipoplexen verantwortlich sein können. So bilden kationische Lipide nach Mischen mit Lipiden der Zellmembran kubische Phasen, was mit einer erhöhten Transfektionseffizienz einhergeht.⁷³ Die Korrelation von Transfektionseffizienz und Lipoplexstruktur ist ein Ziel aktueller Forschungen,⁷³⁻⁷⁵ wobei derzeit noch kein allgemeingültiger Zusammenhang gefunden werden konnte. Der Grund

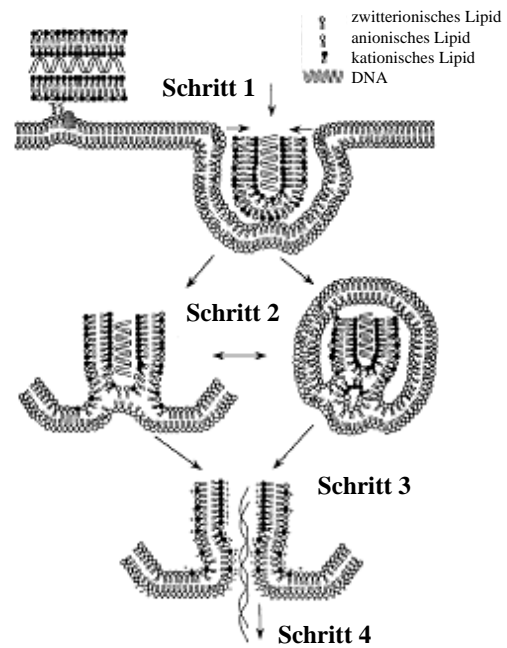


Abb.9: Von ZELPHATI und SZOKA postulierter Mechanismus für die Freisetzung von Polynukleotiden aus Lipoplexen nach XU et al.⁷¹

Schritt 1: Lipoplexaufnahme durch Endozytose.
Schritt 2: Im frühen Endosom resultiert die Lipoplex-induzierte Membrandestabilisierung in einen „Flip-Flop“ anionischer Lipide von der zytosolischen auf die luminal Seite der Endosomenmembran.
Schritt 3: Anionische Lipide diffundieren in den Lipoplex und bilden ladungsneutrale Ionenpaare mit den kationischen Lipiden.
Schritt 4: Die DNA wird aus dem Lipoplex freigesetzt und diffundiert in das Zytoplasma.

dafür scheint einleuchtend: Die Lipofektion ist ein multifaktorieller Prozess und deren Gelingen/Erfolg hängt nicht nur von der Lipoplexstruktur, sondern auch von vielen anderen Lipoplexeigenschaften, wie Ladungsdichte, Größe, Art der DNA, Art der zu transfizierenden Zelle oder Anwesenheit von Serum ab, um nur einige Einflussfaktoren zu nennen.⁶⁶

Die Komplexbildung zwischen DNA und kationischen Lipiden ist ein hoch dynamisches Geschehen bei dem viele Prozesse zeitgleich ablaufen und letztendlich zu der finalen Lipoplexstruktur führen. So zeigen Untersuchungen, dass neben der elektrostatischen Komponente (COULOMB-Wechselwirkung zwischen den positiven Ladungen der Lipide und den negativen Ladungen der DNA-Phosphatgruppen) die Freisetzung von Gegenionen, und der damit einhergehende Entropiegewinn, eine treibende Kraft für die Komplexbildung ist.^{76,77} Aufgrund der hohen negativen Ladungsdichte der DNA bindet diese kleine Gegenionen, wie z.B. Natriumionen (MANNING`s-Ionen-Kondensationsmodell).^{78,79} Auch die kationischen Lipide sind von Gegenionen entgegengesetzter Ladung umgeben. Der Lipoplexbildungsprozess setzt einen Teil dieser Gegenionen frei.

Abschließend gilt: Obwohl seit FELGNERS Erstbeschreibung der Lipofektion mehr als 25 Jahre vergangen sind, ist der Prozess der Lipofektion nur in Ansätzen verstanden. Somit gilt es weitere wissenschaftliche Forschungsarbeit auf diesem Gebiet zu investieren. Ein besseres Verständnis der Lipofektion ermöglicht einen sichereren und effektiveren Einsatz dieser vielversprechenden Behandlungsmethode in der Gentherapie.

1.3 Zielstellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich, aufbauend auf früheren Arbeiten,^{80,81} mit der Synthese und physiko-chemischen Charakterisierung einer neuen Klasse an Cytokineten, welche als Charakteristikum eine Malonamidstruktur aufweisen. Dabei wurden folgende Schwerpunkte gesetzt:

- Es sollte eine neue Grundgerüststruktur entwickelt werden, welche eine stärkere Kopfgruppenverzweigung ermöglicht (Malonamide der 2. Generation). Dabei galt es eine Synthesestrategie für einen modularen Aufbau verschiedener Lipide mit variierenden Kopfgruppenstrukturen und Alkylkettenkombinationen zu entwickeln.
- Des Weiteren galt es die Synthese von Lipiden mit Oleylketten von hoher Reinheit (>95 %) zu etablieren, da in den vorangegangenen Arbeiten lediglich Oleylketten mit einer Reinheit zwischen 70 % und 80 % zum Einsatz kamen.
- Weiterhin waren Methyl-verzweigte Alkylketten zu synthetisieren und in ausgewählte Lipidstrukturen einzufügen.
- Ferner sollten Synthesestrategien für Lipide mit Erkennungsstrukturen etabliert werden, da bis zum jetzigen Zeitpunkt dieser Aspekt der Cytokinetentwicklung innerhalb der Arbeitsgruppe noch nicht behandelt wurde.
- Ergänzend galt es, die neuen Substanzen neben der üblichen analytischen Charakterisierung auch einer kalorimetrischen Charakterisierung mittels DSC zu unterziehen, um diese Daten für spätere Korrelationen zwischen physiko-chemischen Eigenschaften und Transfektionseffizienz bereitzustellen.
- Zusätzlich sollten physiko-chemische Untersuchungen der DNA-Komplexierung an ausgewählten Lipiden der neu synthetisierten Cytoketine durchgeführt werden.

Diese Arbeit dient vorrangig der Bereitstellung von Lipiden für weiterführende Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. ANDREAS LANGNER (MLU, Halle-Wittenberg) und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. GERALD BREZESINSKI (MPI für Kolloid und Grenzflächenforschung, Potsdam). Ergebnisse aus diesen Untersuchungen werden lediglich in stark reduzierter Form in dieser Arbeit behandelt, da sie bei der großen Anzahl an Substanzen den Rahmen weit überschreiten würden. Detaillierte Ergebnisspräsentationen dieser Arbeiten sind den durchführenden Personen vorbehalten.

2 Synthetisch-präparative Arbeiten

2.1 Synthesekonzept

Die Synthesestrategie dieser Arbeit (siehe Abb. 10) beruht auf der Chemie der Malonsäure, welche eine Vielzahl an Synthesevariationen bietet. So ermöglichen die beiden Carboxylfunktionen nicht nur eine Molekülvergrößerung durch Acylierungsreaktionen, sondern der CH-azide Charakter der α -Methyleneinheit zudem eine Molekülvergrößerung durch Alkylierungs- und Acylierungsreaktionen mit dem α -C-Carbanion als Nukleophil. Durch diese Vielfalt an Umsetzungsmöglichkeiten stellt die Malonsäure seit dem letzten Jahrhundert einen wichtigen Baustein für die Synthese von Fettsäuren dar. CHARGAFF nutzte das Malonesterverfahren für die Synthese α -verzweigter Fettsäuren.⁸² WEITZEL und WOJAHN wendeten die Malonestersynthese für die Darstellung von Fettsäuren mit Methylverzweigung in der Alkylkette an.^{83,84} Auch andere Naturstoffe, wie Aminosäuren, wurden durch die Vielfalt der Malonsäurechemie zugänglich: So nutzte EMIL FISCHER das Verfahren für die Synthese verschiedener Aminosäuren.⁸⁵ Auch SNYDER et al. gebrauchte die Malonestersynthese für die Darstellung von Tryptophan.⁸⁶ Außerdem sind Malonsäure bzw. deren Derivate hervorragende C₃-Bausteine in der Heterozyklenchemie.

Diese Strategien aufgreifend wurde in vorangegangenen Arbeiten in der Arbeitsgruppe die α -Alkylierung des Malonsäurediethylesters als zentraler Schritt für die Synthese des lipophilen Molekülteils von Lipiden genutzt. Daraus resultierten zwei neue Klassen von aminofunktionalisierten Transfektionslipiden, deren erstmalige Synthese von I. SCHULZE beschrieben wurde: die verzweigten Fettsäureamide und die Malonsäurediamide der 1. Generation.⁸⁰ Das Lipidrückgrat der Malonamide der 1. Generation wird aus dem Malonsäurediamidbaustein gebildet (siehe Abb. 10, roter Molekülausschnitt). Darauf aufbauend wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Malonsäurediamid-basierte Lipidgrundstruktur entwickelt, welche die 2. Generation der Malonamide darstellt. Diese zeichnet sich durch ein neues Peptid-mimetisches Rückgrat bestehend aus einem Malonsäurediamidbaustein aus, welcher mit der α -Aminogruppe eines Lysinbausteins verbunden ist (siehe Abb. 10, roter und blauer Molekülausschnitt). Resultierend aus dieser Rückgratstruktur besitzen die Malonamide der 2. Generation zwei Ansatzpunkte für aminofunktionalisierte Kopfgruppen: die ϵ -Aminogruppe des Lysins und die Carbonylfunktion der Malonsäure. Dies ermöglicht es größere Dendrimär-artige Kopfgruppenstrukturen aufzubauen.

Der zentrale Baustein der Synthese ist ein alkylierter Malonsäuremonoethylester (siehe Abb. 10, blauer Kasten). Dieser ist in der Lage mit der freien Carboxylfunktion Acylierungs-

reaktionen einzugehen, während die zweite Carboxylfunktion als Ethylester vor einer Umsetzung geschützt ist. Dies ermöglicht eine modulare Synthese der Lipide. So führt die Acylierung eines einfachen Alkylamins zu Malonamiden der 1. Generation, wogegen die Acylierung der α -Aminogruppe eines *N*-Alkyllysinamids in den Malonamiden der 2. Generation resultiert (siehe Abb.10). Die Verseifung der Ethylesterfunktion setzt die Säurefunktion frei, an welcher der Kopfbereich aufgebaut werden kann. Bei den Malonamiden der 2. Generation wurde für diesen Zweck Ethylendiamin und Tris(2-aminoethyl)-amin genutzt, was die Grundstrukturen der zwei Haupttypen dieser Lipide lieferte: den Ethylendiamin-Typ und den Tris(2-aminoethyl)amin-Typ (siehe Abb.10). Diese zwei Grundstrukturen können durch Acylierungsreaktionen im Kopfgruppenbereich mit Lysin vergrößert werden, welche das Spektrum an Verbindungen erheblich erweitern.

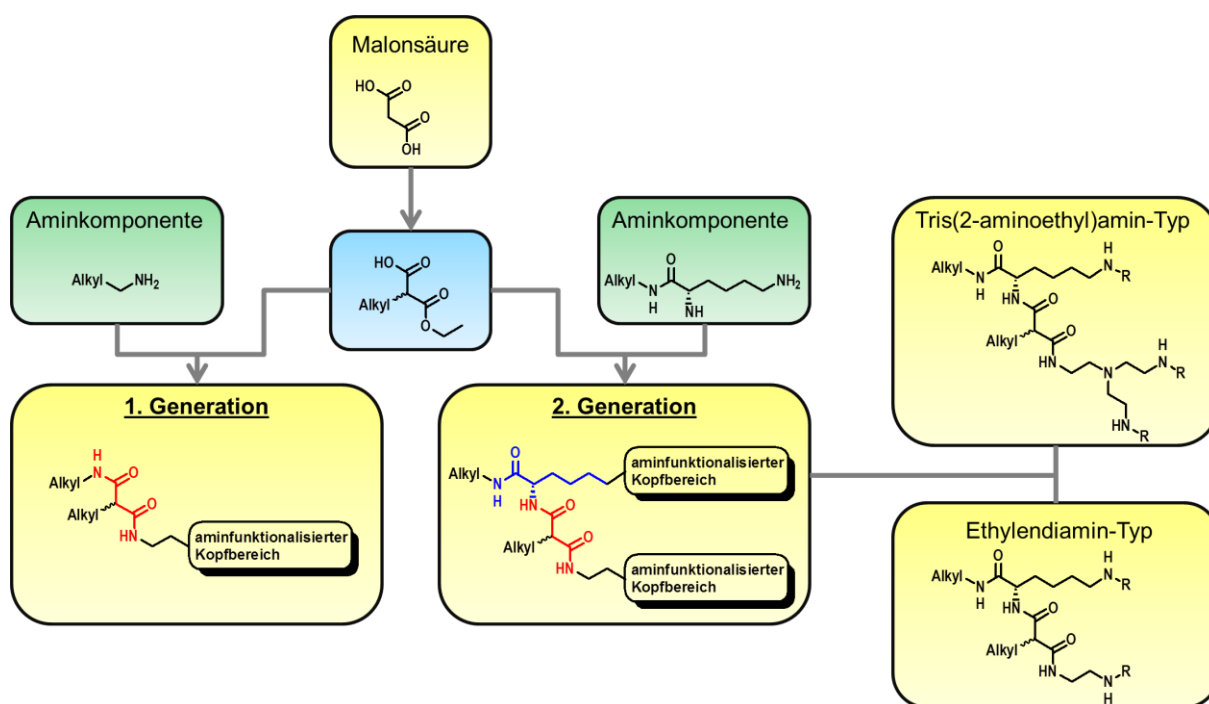


Abb.10: Synthesestrategie der Malonamide der 1. und 2. Generation unter Verwendung des alkylierten Malonsäuremonoethylesters (blauer Kasten) als zentralen Baustein. In grün sind die Aminkomponenten für Acylierungsreaktionen mit der Carboxylfunktion der Malonsäuremonoethylesterderivate dargestellt. In den Formeln der Malonamide der 2. Generation vom Tris(2-aminoethyl)amin-Typ und vom Ethylendiamin-Typ steht das R im Kopfgruppenbereich für ein Wasserstoffatom oder ein Lysinmolekül. Nähere Einzelheiten sind im Text erläutert.

Die modulare Synthese ermöglicht zusätzlich eine einfache Variation der Alkylketten der kationischen Lipide. Durch Verwendung verschiedener Alkylmalonsäuremonoethylester und Anknüpfung von Aminkomponenten mit variierenden Alkylketten ist die Synthese homologer Lipide möglich, welche sich nur in ihrem Alkylkettenmuster unterscheiden. In dem folgenden Kapitel (Kap.2.2) werden die in dieser Arbeit synthetisierten Malonamide der 2. Generation und die verschiedenen Alkylketten- und Kopfgruppenvariationen vorgestellt.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit das Synthespektrum der Malonamide der 1. Generation erweitert. Das Ersetzen der aminofunktionalisierten Kopfgruppe durch eine hydrophile Linkerstruktur ermöglicht es Erkennungsstrukturen wie Galactose an die Lipide zu knüpfen.

2.2 Nomenklatur der Malonsäurediamide der 2. Generation

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen wurden durchlaufend mit Ziffern/ Buchstaben nummeriert. Eine Ausnahme bilden die Endprodukte, welche das Malonsäuredi- amid-Rückgrat der 2. Generation enthalten. Aus Gründen der besseren Strukturzuordnung anhand des Namens wurde eine Bezeichnung aus zwei bis drei Buchstaben (Art der Alkyl- ketten) gefolgt von römischen Ziffern (Kopfgruppentyp) gewählt.

Alkylkettenkombinationen:

TT: $R^1 = R^2 = C_{14}H_{29}$

THM: $R^1 = C_{14}H_{29}$; $R^2 = (CH_2)_9CH(CH_3)(CH_2)_5CH_3$

HT: $R^1 = C_{16}H_{33}$; $R^2 = C_{14}H_{29}$

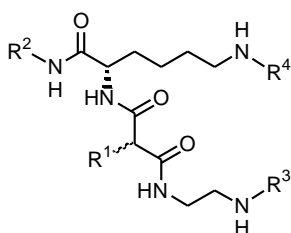
TO: $R^1 = C_{14}H_{29}$; $R^2 = (9Z)-C_{18}H_{35}$ (tech.)

RTO: $R^1 = C_{14}H_{29}$; $R^2 = (9Z)-C_{18}H_{35}$ (rein)

HO: $R^1 = C_{16}H_{33}$; $R^2 = (9Z)-C_{18}H_{35}$ (tech.)

OO: $R^1 = R^2 = (9Z)-C_{18}H_{35}$ (tech.)

Ethylendiamin-Typ:



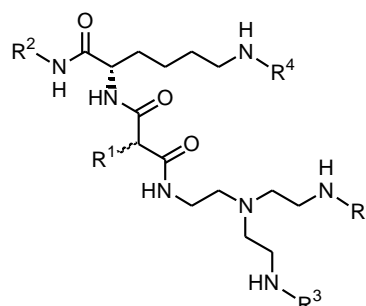
3 Kopfgruppenvariationen:

Typ-X: $R^3 = R^4 = H$

Typ-XIV: $R^3 = L\text{-Lysin}$; $R^4 = H$

Typ-XII: $R^3 = R^4 = L\text{-Lysin}$

Tris(2-aminoethyl)amin-Typ:



3 Kopfgruppenvariationen:

Typ-IV: $R^3 = R^4 = H$

Typ-VIII: $R^3 = L\text{-Lysin}$; $R^4 = H$

Typ-VI: $R^3 = R^4 = L\text{-Lysin}$

Abb. 11: Strukturen der Malonamide der 2. Generation unter Angabe der Nomenklatur für den Kopfgruppentyp und den Abkürzungen für die Alkylkettenmuster.

Die Strukturen der synthetisierten Malonsäurediamide der 2. Generation sind in Abb.11 dargestellt. Die Legende zeigt sowohl die römischen Ziffern für die 6 Kopfgruppentypen der synthetisierten Endverbindungen, als auch die Buchstabenkombinationen der verschiedenen Alkylkettenmuster. So steht die Bezeichnung **HT-X** für ein Lipid mit der Kopfgruppenstruktur vom Typ-X und einer Lysin-gebundenen Tetradeacylkette sowie einer Malonsäure-gebundenen Hexadeacylkette als lipophilen Molekülteil (siehe Abb.12a). Die Bezeichnung der Lipide mit drei Alkylketten ist in Abb. 12b dargestellt. Die Malonamide der

1. Generation, welche im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert wurden, werden im folgenden Teil durch eine römische Ziffer kodiert.

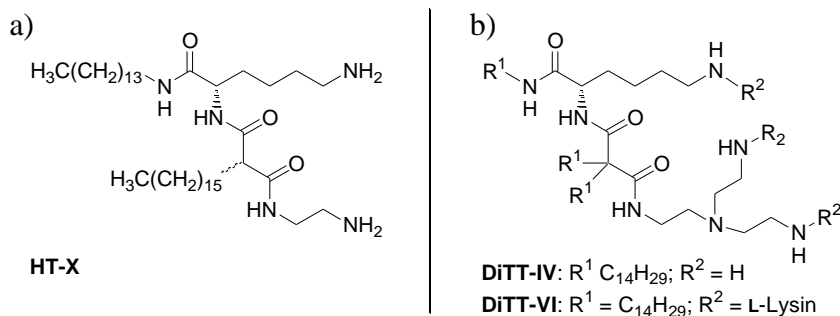


Abb. 12: a) Bezeichnungsbeispiel **HT-X**. Es ist ein Malonamid der 2. Generation mit der Kopfgruppenstruktur vom Typ-**X** und einer Lysin-gebundenen Tetradecylkette sowie einer Malonsäure-gebundenen Hexadecylkette. b) Strukturen und Bezeichnungen der Malonsäurediamide der 2. Generation mit drei Alkylketten.

Bei Betrachtung der Alkylkettenkombinationen fällt auf, dass jedes Malonamid eine Tetradecyl- bzw. eine Oleylkette besitzt. Dies liegt darin begründet, dass nach Literaturangaben der Einbau dieser Alkylketten in kationische Lipide mit einer Steigerung der Transfektionseffizienz einhergeht.⁸⁷ Da innerhalb der Arbeitsgruppe analoge Beobachtungen bezüglich der Oleylketten gemacht wurden,⁸⁸ kamen auch in dieser Arbeit bevorzugt Tetradecyl- und Oleylketten zum Einsatz. Es soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die Synthese von Lipiden mit anderen Alkylkettenkombinationen mit geringem Aufwand möglich ist, jedoch den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde. Daher wurde der Syntheschwerpunkt auf die hier beschriebenen Alkylkettenkombinationen gelegt.

2.3 Amidsynthesen

Ein Schlüsselschritt der im Folgenden vorgestellten Synthesestrategie ist die Ausbildung einer Amidbindung. Die Amidsynthese ist eine wichtige Reaktion in der organischen und bioorganischen Chemie. So ist sie beispielsweise der wesentliche Reaktionsschritt der Peptidsynthese. Für die Amidknüpfung werden Aktivierungsreagenzien benötigt, welche durch Intermediatbildung die Carbonylaktivität der Carbonsäurefunktion erhöhen, da ansonsten unter milden Reaktionsbedingungen Carbonsäuren mit Aminen im Sinne einer Säure/Base-Reaktion lediglich zum Ammoniumsalz reagieren.⁸⁹

Klassische Vertreter solcher Aktivierungsreagenzien sind Chlorierungsmittel, welche die Carbonsäurefunktion als Säurechlorid aktivieren. Diese Aktivierungsmethode fand schon bei EMIL FISCHER für die Peptidsynthese Anwendung.⁹⁰ Repräsentative Vertreter für Chlorierungsreagenzien sind Thionylchlorid und Cyanurchlorid (2,4,6-Trichlor-1,3,5-triazin) (siehe Abb.13). Die Säurechloridmethode zeichnet sich durch die hohe Reaktivität der Acylierungsmittel aus und findet dadurch bei sterisch anspruchsvollen Reaktionen Anwendung. Jedoch besteht in dieser hohen Reaktivität, in Verbindung mit der bei der Chlorierung frei werdenden Salzsäure, die Gefahr von Nebenreaktionen.

Während es sich bei den Säurechloriden um isolierbare Acylierungsmittel handelt, werden die im Folgenden dargestellten Verbindungen in der Regel für *in-situ* Akti-

vierungen von Carbonsäuren genutzt.

Klassische Vertreter solcher Agenzien sind Carbodiimide mit dem von SHEEHAN beschriebenen DCC als Prototyp (siehe Abb.13).⁹¹ Durch die Addition der Carbonsäuren an die C=N-Doppelbindung der Carbodiimide entstehen *O*-Acylisoharnstoffe als aktiviertes Carbonsäurederivat.

Des Weiteren kommen wasserlösliche Derivate wie EDC, deren Nebenprodukte auch wasserlöslich sind, bei der Festphasensynthese von Peptiden zum Einsatz (siehe Abb.13). Der große Nachteil der Amidknüpfung

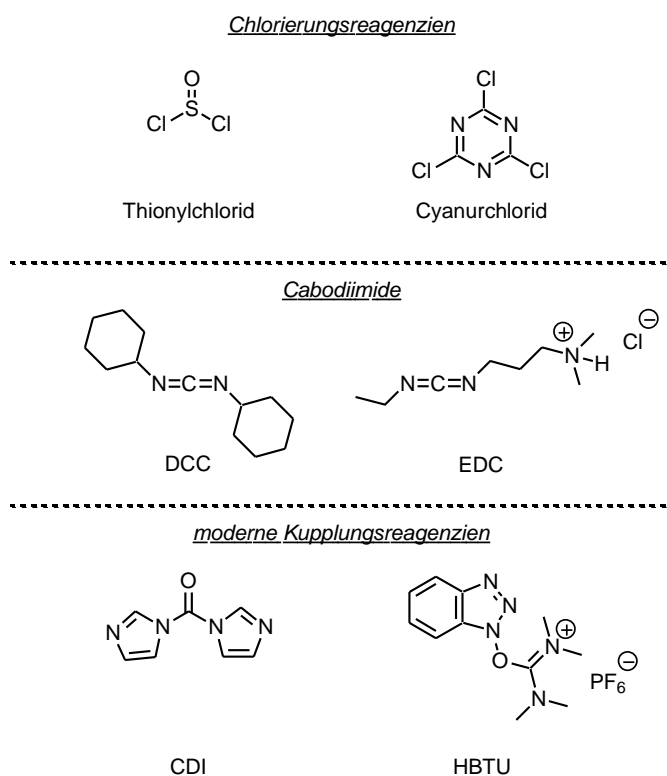


Abb.13: Häufig verwendete Vertreter verschiedener Gruppen von Aktivierungsreagenzien für Acylierungsreaktionen mit Carbonsäuren.

mit Carbodiimiden liegt in der partiellen Racemisierung in α -Position von Aminosäuren bei der Anwendung in der Peptidsynthese.^{92,93} Dieser Nachteil konnte durch die Zugabe von Racemisierungssuppressoren behoben werden. Klassische Suppressoren sind 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und *N*-Hydroxysuccinimid (HOSu). Diese Verbindungen unterdrücken nicht nur die Racemisierung, sondern bilden selber reaktive Ester (Aktivester = Ester mit höherem Acylierungspotential als Alkylester) mit der zu aktivierenden Carbonsäure.⁹⁴⁻⁹⁶

Die Nachteile der Carbodiimide führten zur Entwicklung moderner Kupplungsreagenzien für Acylierungsreaktionen (siehe Abb.13). Eine wichtige Gruppe sind die Imidazolium-Reagenzien mit CDI als klassischen Vertreter, welche Carbonsäurefunktionen in reaktive Acylimidazole überführen.⁹⁷ Auch die Uronium-Reagenzien, wie HBTU und dessen Analoga, finden heute breite Anwendung bei Acylierungsreaktionen.⁹⁸⁻¹⁰⁰

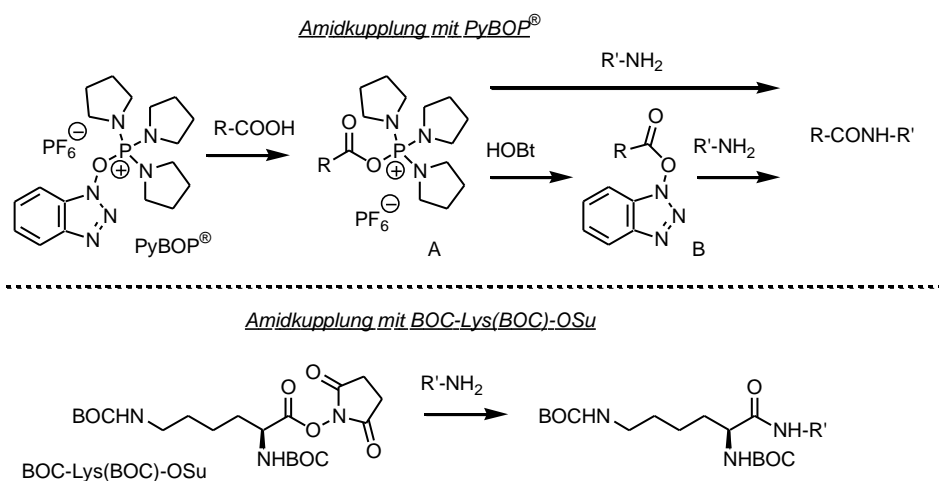


Abb. 14: Reaktionsschemata der in dieser Arbeit verwendeten Amidsynthesereagenzien. Oben: PyBOP[®] und die bei der Verwendung *in-situ* entstehenden Acylierungsderivate (Phosphoniumintermediat A und Benzotriazolylester B). Unten: kommerziell erhältliches BOC-geschütztes Acylierungsreagenz von Lysin (BOC-Lys(BOC)-OSu).

Eine zentrale Rolle im Rahmen dieser Arbeit nimmt PyBOP[®] ein. Dieses Kupplungsreagenz aus der Familie der phosphorhaltigen Aktivierungsreagenzien findet eine breite Anwendung in der Peptidsynthese.¹⁰¹⁻¹⁰³ Es ist ein Analogon von BOP, welches ebenfalls in der Peptidsynthese Verwendung fand. Allerdings wurde es wegen der Entstehung des karzinogenen Hexamethylphosphortriamids, ein Nebenprodukt der Carbonsäureaktivierungsreaktion, durch PyBOP[®] ersetzt.^{104,105} PyBOP[®] aktiviert Carbonsäuren *in-situ* als hoch reaktive Phosphoniumintermediate (siehe Verbindung A, Abb. 14), welche mit Nucleophilen reagieren.¹⁰⁶ Handelt es sich bei dem Nucleophil um ein Amin, entstehen Amide. Des Weiteren reagiert das Phosphoniumintermediat mit dem aus PyBOP[®] frei werdenden HOBt als Nucleophil zum Benzotriazolylester (siehe Verbindung B, Abb. 14). Benzotriazolylester sind ebenfalls Acylierungsreagenzien und reagieren mit Aminen zu Amid.¹⁰⁶ Die

Verwendung von PyBOP[®] ist präparativ sehr einfach zu handhaben und lieferte im Rahmen dieser Arbeit hohe Ausbeuten, weshalb auf eine Testung anderer Amidknüpfungsreagenzien verzichtet wurde.

Eine Ausnahme bildete das BOC-Lys(BOC)-OSu, welches ein kommerziell erhältliches BOC-geschütztes Acylierungsreagenz für Kupplungsreaktionen mit Lysin ist. Es reagiert als *N*-Hydroxysuccinimidester racemisierungsfrei mit Aminen zu Amiden^{107,108} und lieferte im Rahmen der vorliegenden Dissertation ebenfalls hohe Ausbeuten. Weiterhin überzeugt es durch seine, im Vergleich zu PyBOP[®], noch einfachere präparative Anwendung. Aus diesem Grund wurde BOC-Lys(BOC)-OSu in dieser Arbeit zur Vergrößerung der Kopfgruppenstrukturen durch Amidkupplungen von primären Aminen mit Lysin verwendet.

2.4 Schutzgruppen für Amine

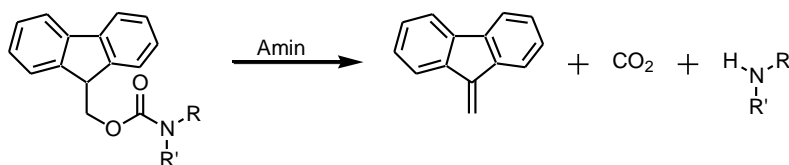
Da im Rahmen dieser Dissertation primäre Amine eine zentrale Rolle spielen, soll an dieser Stelle auf vier klassische Schutzgruppen für Amine (Fmoc-, BOC-, Cbz- und Trifluoracetyl-Schutzgruppe) näher eingegangen werden. Für die Einführung und Spaltung weiterer Schutzgruppen sei auf die Fachliteratur verwiesen.¹⁰⁹

Die Fmoc-Schutzgruppe ist ein Carbamat, welches eine ausgezeichnete Säurestabilität aufweist. Sie wird nicht-hydrolytisch von Aminen gespalten (siehe Abb. 15).^{110,111} Diese Eigenschaft erlaubt eine selektive Fmoc-Spaltung in Anwesenheit von BOC- und Benzyl-basierten Schutzgruppen. Klassische Amine für die Fmoc-Spaltung sind Morpholin oder Piperidin. Diese Schutzgruppe fand Anwendung in der in dieser Arbeit beschriebenen Synthesestrategie der Malonamide der 2. Generation (siehe Kap. 2.5.3).

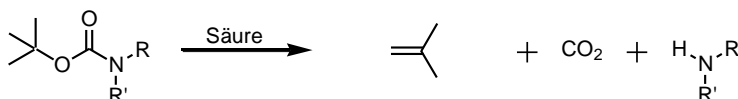
Eine weitere wichtige Aminschutzgruppe ist die BOC-Schutzgruppe. Sie ist unter basischen Bedingungen stabil und inert gegenüber einer Vielzahl von Nukleophilen.¹⁰⁹ Sie wird säurekatalysiert gespalten, wobei vorrangig Salzsäure und Trifluoressigsäure zum Einsatz kommen.^{112,113} Des Weiteren kann sie thermisch entfernt werden (185 °C, 20-30 min, 97 % Ausbeute).^{114,115} Die bei der Spaltung entstehenden Nebenprodukte, CO₂ und *tert.*-Buten (siehe Abb. 15), entweichen als Gase leicht aus dem Reaktionsansatz. Die einfache Spaltung der BOC-Schutzgruppe in Verbindung mit ihrem robusten Charakter trug dazu bei, dass sie bei den im Folgenden beschriebenen Synthesen bevorzugt Anwendung fand (siehe Kap. 2.5.2 bis Kap. 2.7).

Eine weitere klassische Aminschutzgruppe ist die Cbz-Schutzgruppe (siehe Abb. 15). Sie ist unter basischen und sauren Bedingungen relativ stabil. Lediglich im stark sauren Milieu,¹¹⁶⁻¹²⁰ oder durch Einwirken hoher Konzentrationen an Hydroxiden,^{121,122} findet eine Spaltung statt.

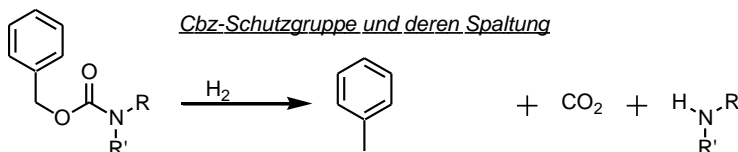
Fmoc-Schutzgruppe und deren Spaltung



BOC-Schutzgruppe und deren Spaltung



Cbz-Schutzgruppe und deren Spaltung



Trifluoracetyl-Schutzgruppe und deren Spaltung

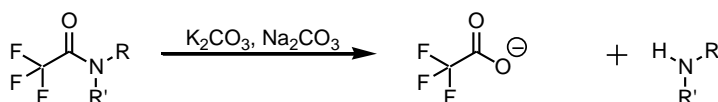


Abb. 15: Auswahl wichtiger Amin-Schutzgruppen und deren üblichen zur Spaltung verwendeten Agenzien sowie die daraus resultierenden Produkte.

Üblicherweise wird die Cbz-Schutzgruppe durch Hydrierung abgespalten.¹²³⁻¹²⁷ Dies ist, neben der doch vorhandenen Anfälligkeit gegenüber Säuren und Basen, der Grund für den Ausschluss dieser Schutzgruppe aus den im Folgenden präsentierten synthetischen Arbeiten, da bei Vorliegen ungesättigter Alkylketten die Gefahr der Hydrierung von Doppelbindung beim Abspalten der Cbz-Schutzgruppe besteht.

Als Letztes soll die Trifluoracetyl-Schutzgruppe vorgestellt werden (siehe Abb.15). Diese kam in der Synthesestrategie der vorliegenden Arbeit nicht zur Anwendung, wurde aber als Nebenprodukt der BOC-Spaltung mit Trifluoressigsäure beobachtet, wenn diese nicht anteilig, sondern mit einem Mal zum Reaktionsansatz zugegeben wurde. Die Trifluoracetyl-Schutzgruppe ist unter sehr milden basischen Bedingungen spaltbar. So reichen schon Natrium- oder Kaliumcarbonat für die Spaltung des Amids aus.¹²⁸⁻¹³⁰

2.5 Synthese der Vorstufen

2.5.1 Synthese nicht-kommerziell erhältlicher Alkylamine

2.5.1.1 Synthese von Oleylamin (rein)

Für die Synthese der Verbindungen mit einer Amid-gebundenen Oleylkette wurde aus Kostengründen das kommerziell erhältliche Oleylamin (tech., Reinheitsangaben des Herstellers: 70%, Gehalt an primären Aminen > 98%) verwendet. GC-MS Untersuchungen des Oleylamins (tech.) zeigten, dass zu 75,1% ein Amin mit einer einfach ungesättigten Octadecylkette enthalten war. Daneben konnten folgende gesättigte Alkylamine nachgewiesen werden: Tetradecylamin (1,7%), Hexadecylamin (5,9%) und Octadecylamin (6,2%) (GC-MS-Spektrum siehe Anhang). $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren zeigten weiterhin einen nicht zu vernachlässigenden Anteil an *trans*-Doppelbindungen im Oleylamin (tech.) (5,35 ppm in Abb. 16c und 130,1-130,4 ppm in Abb. 16d).

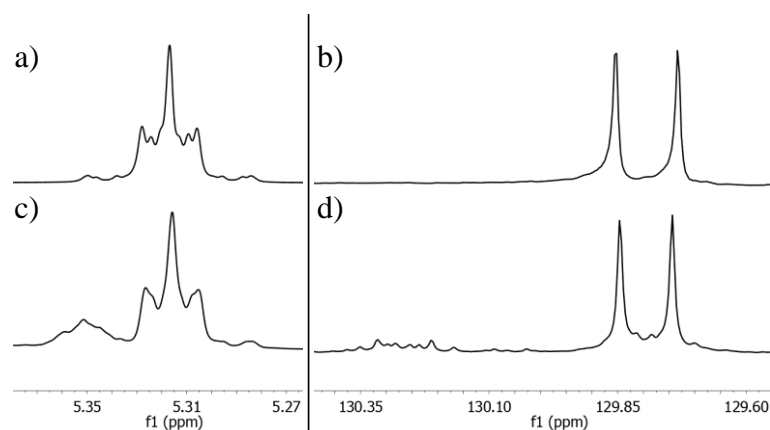


Abb. 16: Auszüge aus NMR-Spektren welche die Signale der olefinischen Wasserstoff- und Kohlenstoffatome von Oleylamin mit unterschiedlichem Reinheitsgrad zeigen: $^1\text{H-NMR}$ (a) und $^{13}\text{C-NMR}$ (b) von Oleylamin (rein) sowie $^1\text{H-NMR}$ (c) und $^{13}\text{C-NMR}$ (d) von Oleylamin (tech.).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten ungesättigte Lipide mit hoher Alkylkettenreinheit synthetisiert werden um in weiterführenden Arbeiten den Einfluss der Reinheit des verwendeten Oleylamins auf das Aggregationsverhalten und die Transfektionseffizienz der Lipide zu untersuchen (siehe auch Kap. 3.3.3). Da Oleylamin von hohem Reinheitsgrad nicht kommerziell verfügbar war, musste es synthetisch zugänglich gemacht werden. Als Ausgangsstoff diente Ölsäure von hohem Reinheitsgrad (99%). Es kamen zwei verschiedene Synthesewege zum Einsatz (siehe Abb. 17).

Variante 1: Eine zweistufige Synthese über das Ölsäureamid, welches im nachfolgenden Schritt mit LiAlH_4 zum gewünschten Produkt reduziert wurde. Dieser Syntheseweg ist in der Literatur beschrieben und ohne Reinigung des Zwischenprodukts durchführbar.^{131,132} Es fanden jedoch Variationen in der Aktivierung der Ölsäure statt. Während in der Literatur die

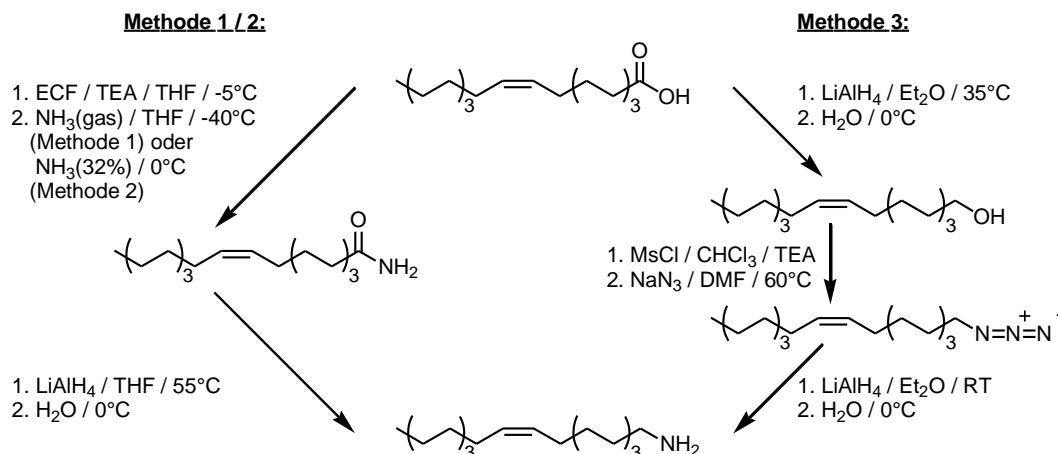


Abb. 17: Synthesewege für die Darstellung von Oleylamin (rein).

Aktivierung als Säurechlorid über Thionylchlorid erfolgte, wurde im Rahmen dieser Arbeit Ethylchloroformiat (ECF) genutzt. Grund hierfür war das Auftreten von schwarz gefärbten Nebenprodukten bei der Aktivierung als Säurechlorid, die vermutlich auf säurekatalysierte Polymerisationsreaktionen über die Doppelbindung der Ölsäure zurückzuführen waren (HCl als Nebenprodukt der Thionylchloridaktivierung). Bei der Aktivierung mit ECF, welches die Carbonsäure als gemischtes Anhydrid aktiviert,¹³³ traten diese schwarzen Nebenprodukte nicht auf. Das Ethyloleoylcarbonat wurde im folgenden Schritt mit Ammoniak zum Ölsäureamid umgesetzt, wobei sowohl ein Ammoniak/THF-Gemisch (Methode 1) als auch wässriger Ammoniak (Methode 2) zum Einsatz kamen.

Variante 2: Der alternative Weg der Oleylamindarstellung führt über den Oleylalkohol und das entsprechende Azid (siehe Abb.17, Methode 3) und ist in abgewandelter Form in der Literatur beschrieben.¹³⁴ Dieser Reaktionsweg weist im Vergleich zu Methode 1 bzw. 2 ein Zwischenprodukt mehr auf. Des Weiteren war eine chromatographische Reinigung auf der Stufe des Oleylazids notwendig. Trotz dieser beiden Nachteile war Methode 3 den anderen Methoden bezüglich der Gesamtausbeute überlegen (siehe Tab.2).

Das ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektrum des synthetisierten Oleylamins (rein) zeigt, dass die Doppelbindung ausschließlich in der *cis*-Konfiguration vorliegt (siehe Abb.16a,b). Die drei Reaktionswege gehen demzufolge nicht mit einer *cis/trans*-Isomerisierung der Doppelbindung einher. GC-MS-Untersuchungen bestätigten (Spektren siehe Anhang) den hohen Reinheitsgrad des Oleylamins (rein), da lediglich das Signal der gewünschten Verbindung detektiert wurde.

Tab.2: Ausbeuten der drei Methoden für die Darstellung von Oleylamin (rein).

Ausbeute in %	
Methode 1	39
Methode 2	22
Methode 3	53

2.5.1.2 Synthese von (10*R,S*)-10-Methylhexadecylamin

Für die Synthese des racemischen 10-Methylhexadecylamins wurde die Alkylkette nach einer von DOBNER¹³⁵ beschriebenen Synthesestrategie aufgebaut (siehe Abb. 18). Als Ausgangsstoff diente der CH-azide α -Methylmalonsäurediethylester, welcher unter Verwendung von Natriumhydrid als Base mit Hexylbromid am α -Kohlenstoff alkyliert wurde. Der entstandene bisalkylierte Malonsäurediethylester wurde daraufhin zur freien Alkylmalonsäure verseift. Durch anschließendes trockenes Erhitzen auf 150-200 °C konnte die (2*R,S*)-2-Methyloctansäure dargestellt werden. Diese Strategie für die Synthese von α -Alkylcarbonsäuren wurde schon von WEITZEL et al.¹³⁶ und CHARGAFF⁸² beschrieben. Für die Synthese des racemischen 2-Methyloctylbromids musste die (2*R,S*)-2-Methyloctansäure zunächst in den Methylester überführt werden, welcher im Anschluss durch LiAlH₄ zu dem entsprechenden Alkohol reduziert wurde. Die Aktivierung der erhaltenen Hydroxylfunktion mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (TsCl), gefolgt von einer nukleophilen Substitution mit LiBr, führt zum gewünschten (2*R,S*)-2-Methyloctylbromid. Das Alkylbromid wurde vor der Umsetzung in der anschließenden GRIGNARD-Reaktion säulenchromatographisch gereinigt. Für die GRIGNARD-Reaktion wurde das Alkylbromid mit Magnesium zum entsprechenden GRIGNARD-Reagenz umgesetzt. Dieses reagierte mit THP-geschütztem 8-Bromooctan-1-ol in einer in der Arbeitsgruppe etablierten Li₂CuCl₄-katalysierten Kupplung.¹³⁷ Durch säurekatalysierte Abspaltung der THP-Schutzgruppe in Methanol mit nachfolgender säulenchromatographischer Reinigung konnte (10*R,S*)-10-Methylhexadecanol sauber erhalten werden.¹³⁸

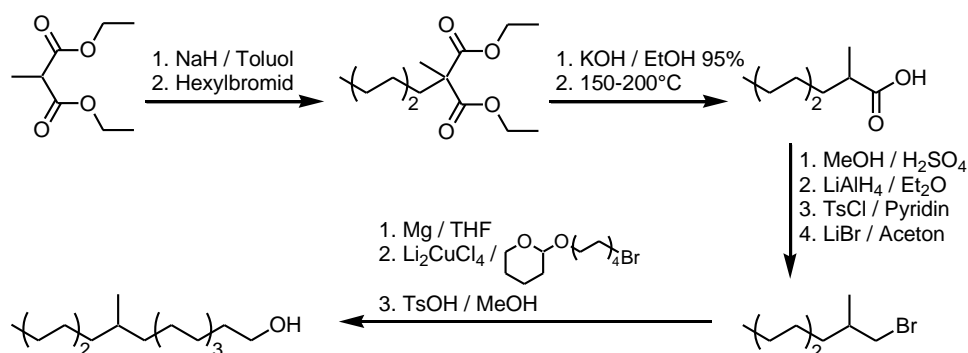


Abb. 18: Syntheschema für die Darstellung von (10*R,S*)-10-Methylhexadecanol.

Um die Hydroxylfunktion des (10*R,S*)-10-Methylhexadecanols in ein primäres Amin zu überführen wurde diese durch Substitutionsreaktion in das entsprechende Azid überführt und anschließend zum Amin reduziert (siehe Abb. 19). Für die Azidsynthese wurde die Hydroxylfunktion als Mesylat aktiviert um im folgenden Schritt dieses mit Natriumazid zu substituieren. Im Anschluss wurde das Azid chromatographisch gereinigt.

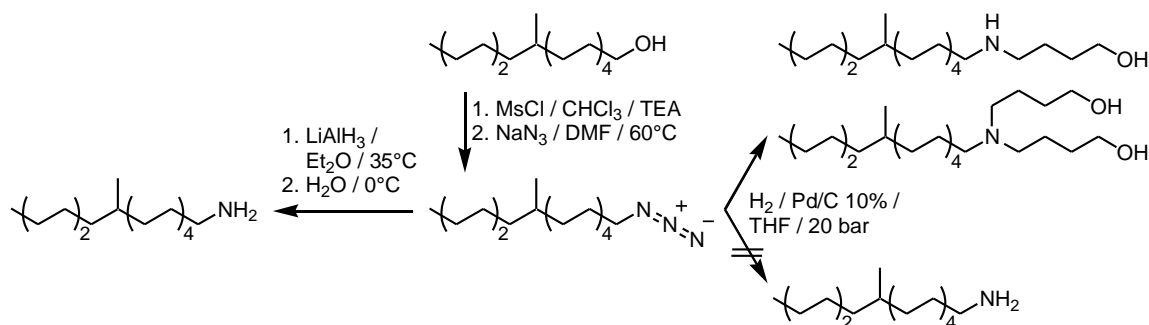


Abb. 19: Darstellung von (10*R,S*)-10-Methylhexadecylamin aus dem Alkohol mit einem Alkylazid als Zwischenprodukt. Die Reduktion des Azids mit LiAlH_4 führt zum gewünschten Produkt. Die Reduktion mit Wasserstoff führte zu den dargestellten unerwünschten Hydroxybutylderivaten.

Die Umsetzung des Azids zum primären Amin sollte auf zwei Wegen erfolgen. Die Reduktion mit LiAlH_4 ¹³⁹ lieferte das gewünschte Amin mit hoher Ausbeute (93%). Die Reduktion mit Wasserstoff bei Raumtemperatur (20 bar, Pd/C 10%) mit THF als Lösungsmittel^{140,141} führte nicht zum gewünschten primären Amin. Stattdessen erfolgte unter den gewählten Reaktionsbedingungen die Reduktion des Azids zum Amin in Kombination mit einer 4-Hydroxybutylierung. So konnten massenspektrometrisch und im ^1H - und ^{13}C -NMR sowohl das Mono- als auch das Bis-4-hydroxybutylderivat des 10-Methylhexadecylamins nachgewiesen werden (siehe Abb. 19). Die Verwendung von alternativen Lösungsmitteln (MeOH, EtOH, Et_2O), die Variation des Katalysators oder die Verminderung des Drucks stellen Möglichkeiten dar um das Auftreten dieser unerwünschten Reaktionsprodukte zu verhindern oder zu vermindern. Da allerdings die Verwendung von LiAlH_4 als Reduktionsmittel das gewünschte Produkt in sehr hoher Ausbeute bei geringem präparativen Aufwand lieferte, wurde die Hydrierung nicht weiter optimiert.

2.5.2 Synthese der Alkylmalonsäuremonoethylester

Eine essentielle Vorstufe für die in dieser Arbeit beschriebenen Lipidsynthesen stellen verschiedene mono- und bisalkylierte Malonsäuremonoethylester dar. Sie sind der zentrale Baustein für die Rückgratsynthese der Malonamide der 1. und der 2. Generation.

Die in Abb. 20 dargestellte Synthese beruht auf einer von CHARGAFF⁸² etablierten Strategie des Malonester-Verfahrens für die Darstellung verzweigter Fettsäuren. Es wurden jedoch folgende Abwandlungen durchgeführt: Bei dem Verseifungsschritt wurde nur eine Ethylesterfunktion gespalten und der Schritt der Decarboxylierung wurde ausgelassen. Dies führte zu Darstellung der Alkylmalonsäuremonoethylester **2a-d**.

Ausgangsstoff der Synthese war der Malonsäurediethylester, welcher aufgrund der CH-aziden Methyleneinheit für Alkylierungsreaktionen in der α -Position zugänglich ist. Durch

Monoalkylierung konnten die Verbindungen **1a-c** erhalten werden. Für diese Reaktion gibt es eine Vielzahl von Vorschriften.¹⁴²⁻¹⁴⁸ Erfahrungen in der Arbeitsgruppe haben gezeigt, das Toluol als Lösungsmittel und Natriumhydrid als Base die besten Ergebnisse lieferte.^{80,81}

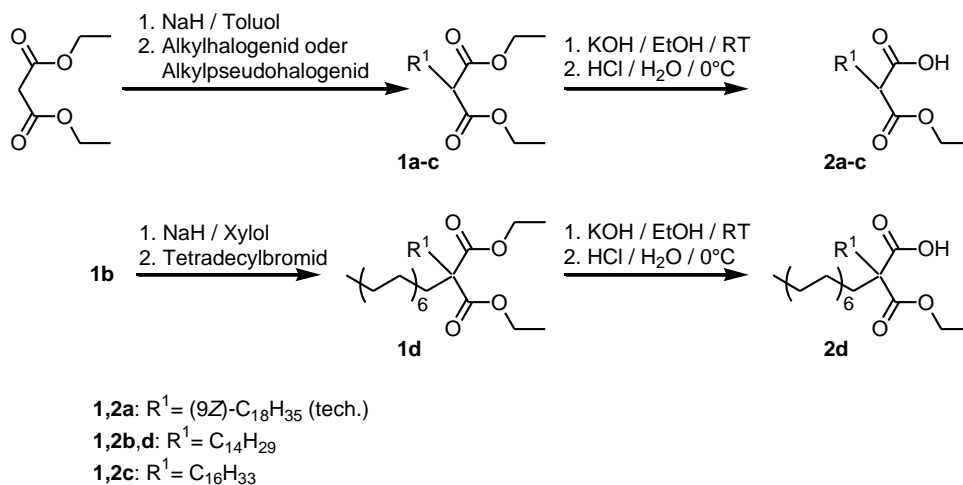


Abb.20: Synthese der Alkylmalonsäuremonoethylester. Es kamen folgende Alkyl(pseudo)halogenide zur Anwendung: Oleylmesylat → **1a**, Tetradecylbromid → **1b**, Hexadecylbromid → **1c**

Für die Alkylierung wurde der Malonsäurediethylester mit Natriumhydrid in das Carbanion überführt, wobei das Ende der Salzbildung durch Aussetzen der Gasbildung (Wasserstoff) angezeigt wird. Das entstandene Salz wurde mit dem entsprechenden Alkylhalogenid (Hexadecyl- oder Tetradecylbromid) oder Oleylmesylat (reagiert als Pseudohalogenid) unter Rückfluss erhitzt. Bei der dabei stattfindenden Substitutionsreaktion entstehen sowohl Mono- als auch Bisalkylierungsprodukte. Die Menge an unerwünschten Bisalkylierungsprodukten kann durch eine Erhöhung der eingesetzten Menge an Malonsäurediethylester verringert werden. Dabei erwiesen sich 2 Äquivalente Malonester und Natriumhydrid auf 1 Äquivalent Bromid/Mesylat als günstig.¹³⁶ Dennoch musste das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt werden um Mono- und Bisalkylmalonester zu trennen. Die Verbindung **1d** fällt dabei als Nebenprodukt bei der Synthese von **1b** an. Durch gezielte Zweitalkylierung von **1b** mit Tetradecylbromid wurde **1d** in größeren Mengen synthetisiert. Die Reaktion erfolgte analog der Monoalkylierung mit zwei essentiellen Änderungen:

- Toluol wurde durch Xylol ersetzt, da der höhere Siedepunkt des Lösungsmittels bei der Reaktion unter Rückfluss die Ausbeuten der sterisch anspruchsvolleren Zweitalkylierung erhöht.
- Weiterhin wurde das stöchiometrische Verhältnis von Edukt/NaH/Tetradecylbromid zu 1/1/2 (n/n/n) abgewandelt, um **1d** in hohen Ausbeuten zu erhalten.

Für die Darstellung der Alkylmalonsäuremonoethylester **2a-d** wurde auf eine von BRESLOW beschriebene Vorschrift zur Monoverseifung von Malonsäurediestern zurückgegriffen.¹⁴⁹ Hierbei wird die geringere Carbonylaktivität der Ethylesterfunktion bei Anwesenheit einer Carboxylatfunktion in β -Position ausgenutzt. So kommt es bei der Umsetzung des α -Alkylmalonsäurediethylesters mit einer äquivalenten Menge Kaliumhydroxid bevorzugt zur Bildung des entsprechenden Monoethylesters. Bei Anwendung dieser Reaktion ist jedoch darauf zu achten, dass die Ausbeute mit abnehmender Kettenlänge der Alkylketten abnimmt. Die Synthese der Verbindungen **2a-d** aus den entsprechenden Diethylestern **1a-d** lieferte Ausbeuten über 80 % nach säulenchromatographischer Aufreinigung.

Mit der hier beschriebenen Synthesestrategie waren die Alkylmalonsäuremonoethylester **2a-d** im Gramm-Maßstab zugänglich und standen als Module für eine breite Variation an kationischen Lipiden zur Verfügung.

2.5.3 Synthese der ϵ -BOC-geschützten *N*-Alkyllysinsamide

Das 2. Modul für die Synthese des Grundgerüsts ist ein BOC-geschütztes *N*-Alkyllysinsamid, dessen Synthese in Abb.21 dargestellt ist. Als Ausgangsstoff diente ein orthogonal geschütztes L-Lysin-Derivat mit einer Fmoc-geschützten α - und einer BOC-geschützten ϵ -Aminogruppe. Die Fmoc-Schutzgruppe wird von Aminen katalysiert gespalten und weist eine verhältnismäßig hohe Säurestabilität auf,^{109,111,150,151} während die basenstabile BOC-Schutzgruppe vorrangig säurekatalysiert gespalten wird.¹⁰⁹ Dies ermöglicht es, die Aminogruppen des Lysins selektiv zu entschützen.

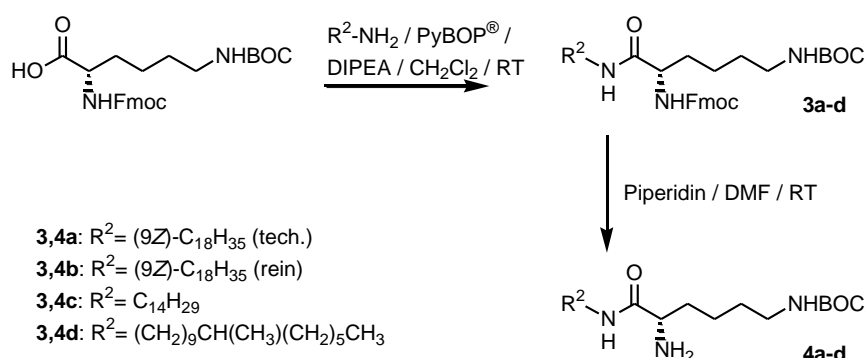


Abb. 21: Synthese der ϵ -BOC-geschützten *N*-Alkyllysinsamidderivate **4a-d**.

Als erster Syntheseschritt wurde das α -*N*-Fmoc- ϵ -*N*-BOC-L-Lysin mit unterschiedlichen Alkylaminen zum orthogonal geschützten *N*-Alkyllysinsamid **3a-d** umgesetzt (siehe Abb. 21). Dabei kam PyBOP[®] als Aktivierungsreagenz zum Einsatz (siehe Kap. 2.3). Bei dieser Reaktion ist die richtige Wahl der Hilfsbase essentiell, um eine Spaltung der

Fmoc-Schutzgruppe während der Amidkupplung zu verhindern. Ein Entschützen der α -Aminogruppe während der Reaktion würde zur Ausbildung einer unerwünschten Peptidbindung zwischen zwei Lysinmolekülen führen. Die Wahl fiel auf Diisopropylethylamin (DIPEA), eine effektive Hilfsbase für Amidkupplungen.^{152,153} Des Weiteren spaltet DIPEA die Fmoc-Schutz-

Tab.3: Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der Fmoc-Schutzgruppenspaltung für verschiedene Amin/DMF-Gemische nach GREEN.¹⁰⁹

$\%_{\text{Amin}} (m/m) \text{ in DMF}$	$t_{1/2}$
20 % Piperidin	6 s
5 % Piperidin	20 s
50 % Morpholin	1 min
50 % Cyclohexylamin	35 min
10 % DMAP	85 min
50 % DIPEA	10h

gruppe im Vergleich zu anderen Aminen mit einer sehr großen Halbwertszeit (siehe Tab.3). Da unter den gewählten Reaktionsbedingungen für die Amidkupplung die Reaktion in 3 Stunden abgebrochen wurde, blieb die Fmoc-Schutzgruppe intakt. Die ermittelten Ausbeuten für diesen Reaktionsschritt (72-98 %) sprechen ebenfalls für eine geringe Spaltung der Fmoc-Schutzgruppe unter den gewählten Reaktionsbedingungen.

Als nächster Reaktionsschritt wurde die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten um die freie α -Aminogruppe des Lysins für nachfolgende Amidkupplungsreaktionen freizusetzen. Als spaltendes Agens diente Piperidin, da es in der Lage ist, die Fmoc-Schutzgruppe in 15 Minuten bei Raumtemperatur quantitativ zu spalten.¹⁵⁴ Zunächst wurde eine 20 %ige Piperidinlösung in Methylenchlorid (m/m) für die Fmoc-Spaltung genutzt.^{155,156} DC-Untersuchungen zeigten eine nahezu vollständige Umsetzung, jedoch gab es Probleme bei der Aufarbeitung. Die Entfernung des Piperidins erwies sich als schwierig. Bei der Verteilung des Rohprodukts zwischen verschiedenen organischen Phasen und gesättigter NH_4Cl -Lösung konnte das Produkt nicht vom Piperidin getrennt werden. Auch die Versuche, das Piperidin am Rotationsverdampfer oder durch Lyophilisation zu entfernen schlugen fehl. Des Weiteren war eine chromatographische Trennung nicht möglich, da das Produkt trotz Elutionsmittelvariation mit Piperidin zusammen eluiert wurde. Die von LEE et al.¹⁵⁵ beschriebene Methode der Verteilung zwischen Chloroform und 1 %iger H_2SO_4 war auf das Reinigungsproblem nicht anwendbar, da unter diesen Bedingungen eine Spaltung der BOC-Schutzgruppe erfolgen würde. Durch die Substitution von Methylenchlorid gegen DMF, in Anlehnung an die MERRIFIELD Peptidsynthese,¹⁵⁴ konnten die Aufarbeitungsprobleme umgangen werden. Durch die Verteilung des Reaktionsansatzes zwischen Wasser und Heptan konnte sowohl das DMF als auch Piperidin erfolgreich mit der wässrigen Phase abgetrennt werden, während die gewünschten Produkte **4a-d** und die Fmoc-Spaltprodukte in der Heptanphase verblieben. Des Weiteren wurde die Piperidinkonzentration in DMF von 20 %

(m/m) auf 5 % (m/m) verringert, da bei dieser Piperidinkonzentration ebenfalls ausreichend kurze Reaktionszeiten beschrieben wurden (siehe Tab. 3).

Es war somit möglich in einer zweistufigen Synthese die ϵ -BOC-geschützten *N*-Alkyllysineamide **4a-d** in guter Ausbeute zu synthetisieren und damit das 2. Modul für das Rückgrat der Malonamide der 2. Generation im Gramm-Maßstab zur Verfügung zu stellen.

2.5.4 Synthese des Rückgrats der Malonamide der 2. Generation

Für die Rückgratsynthese wurden die Synthesemodule **2a-d** und **4a-d** unter Ausbildung einer Amidbindung miteinander verknüpft, wobei die ersten Lipidvorstufen **5a-h** der Malonsäureamide der 2. Generation entstanden (siehe Abb.22). Durch unterschiedliche Kombination der 8 Module (**2a-d** und **4a-d**) steht ein großes Spektrum an homologen Lipiden mit variierenden Alkylketten zur Verfügung, wobei im Rahmen dieser Arbeit nur 8 der 16 möglichen Kombinationen synthetisiert wurden. Die Verknüpfung der Carbonsäuren **2a-d** mit der primären Aminofunktion der Verbindungen **4a-d** erfolgte in Methylenchlorid bei Raumtemperatur unter Verwendung von PyBOP[®] als Kupplungsagens. Da es sich um eine sterisch anspruchsvolle Reaktion handelt, wurde besonderes Augenmerk auf die zu verwendende Hilfsbase gelegt. Es kam erneut DIPEA zum Einsatz, da in der Literatur hohe Ausbeuten für sterisch gehinderte Ester- und Amidkupplungen unter Verwendung des Systems PyBOP[®]/DIPEA beschrieben sind.^{157,158} Die für die Synthese der Verbindungen **5a-h** ermittelten Ausbeuten zwischen 90 % und 99 % unterstützen diese Aussage.

Die chromatographische Aufarbeitung der Produkte war jedoch mit Problemen behaftet. So gelang es nicht mit den in dieser Arbeit routinemäßig genutzten Chromatographiemethoden (Säulenchromatographie Methode 1 und 2, Kap.6.3.1), trotz Variation des Elutionsmittels, das gewünschte Produkt vom Tripyrrolidinophosphorsäureamid, ein Nebenprodukt der PyBOP[®]-Kupplung, welches massenspektrometrisch und NMR-spektroskopisch nachgewiesen wurde, zu trennen. Es musste auf eine als Frontchromatographie bezeichnete Methode (Säulenchromatographie Methode 3, siehe Kap.6.3.1) zurückgegriffen werden. Dafür wurde in DC-Vorversuchen ein Laufmittel gesucht, bei dem die Substanz einen R_f -Wert von 0,5 aufwies, wobei ein Ether/Chloroform-Gemisch (1/1, V/V) die gewünschten Eigenschaften besaß. Für die Frontchromatographie wurde die Substanz in Elutionsmittel gelöst, auf trockenes unconditioniertes Kieselgel (5 Masseteile Kieselgel für 1 Masseteil Rohprodukt) gegeben und isokratisch eluiert. Das Produkt wurde unter Anwendung dieser Methode sauber mit der Elutionsmittelfront eluiert, was namensgebend für diese Technik ist.

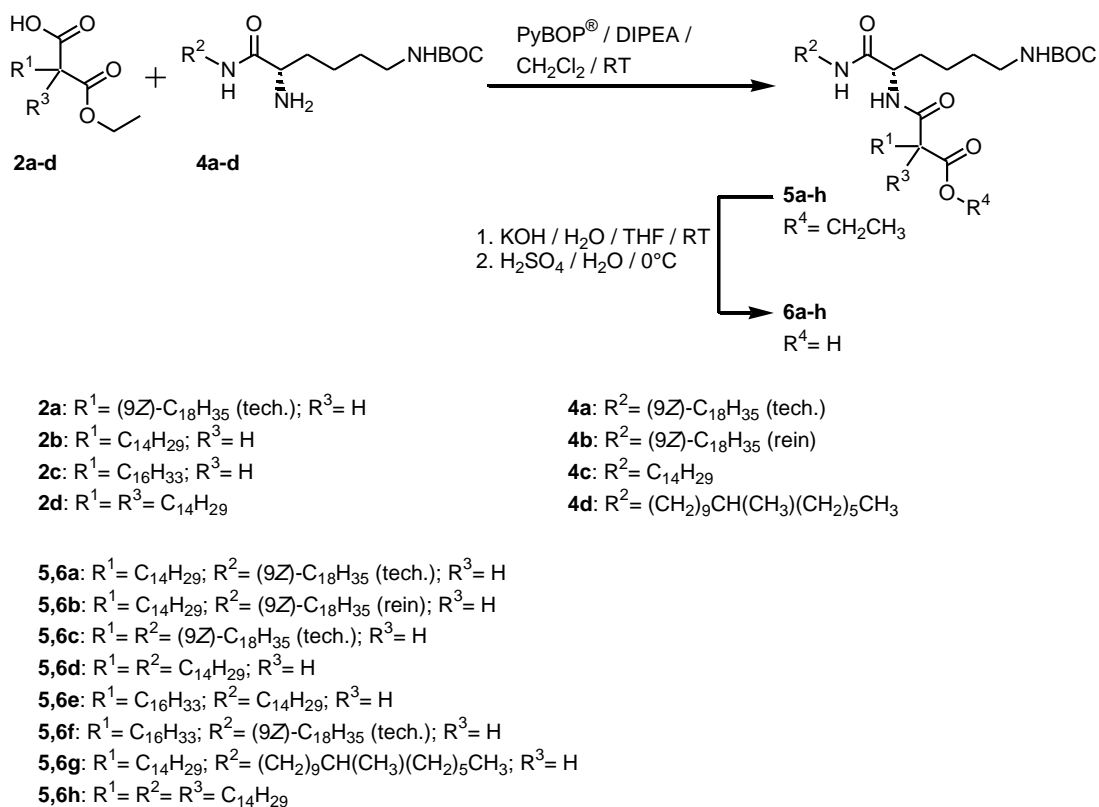


Abb. 22: Syntheschema für die Amidkupplung zur Darstellung des Rückgrats der Malonamide der 2. Generation mit anschließender Esterverseifung.

Im Folgeschritt der Synthese war es nötig die verbleibende Ethylesterfunktion der Verbindungen **5a-h** zu verseifen (siehe Abb.22). Die daraus resultierenden Verbindungen **6a-h** besitzen eine freie Carbonsäurefunktion, welche essentiell für die Anknüpfung der Kopfgruppe über eine Säureamidbindung ist. Bei dieser Verseifungsreaktion war darauf zu achten, dass die ϵ -BOC-Schutzgruppe des Lysinbausteins erhalten bleibt. Aus diesem Grund wurde unter sehr milden Bedingungen gearbeitet: Die Verseifung fand mit 1,5 Äquivalenten Kaliumhydroxid in einem THF/Wasser-Gemisch (3/1, V/V) bei Raumtemperatur statt. Ein kritischer Schritt war das Ansäuern des entstandenen Kaliumsalzes um die freien Säuren **6a-h** zu erhalten, wobei die Spaltung der säurelabilen BOC-Schutzgruppe vermieden werden musste. Dies geschah durch Einsatz einer, dem zugegebenen Kaliumhydroxid äquivalenten Menge, verdünnten Schwefelsäure, welche dem Ansatz unter Eiskühlung zugeführt wurde. Schwefelsäure besitzt gegenüber der sonst verwendeten Salzsäure den Vorteil, dass sie schlecht mit Chloroform mischbar ist. Somit lässt sich das Produkt gut durch Extraktion mit Chloroform eine Minute nach Zugabe der Schwefelsäure aus dem sauren wässrigen Milieu entfernen. Die ermittelten Ausbeuten zwischen 89 % und 99 % zeigen, dass die Carbonsäuren **6a-h** unter den gewählten Bedingungen unter Erhalt der BOC-Schutzgruppe zugänglich gemacht werden konnten.

2.6 Synthese der Lipide mit Tris(2-aminoethyl)amin-Baustein – Lipide vom Tris(2-aminoethyl)amin-Typ

Eine zentrale Rolle der Synthese spielt ein aminofunktionalisierter Baustein, welcher als Kopfgruppe oder als Linker dient. In dieser Arbeit kamen mit Tris(2-aminoethyl)amin und Ethylendiamin zwei solcher Bausteine zum Einsatz. Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit der Synthese der Tris(2-aminoethyl)amin-haltigen Lipide.

Als Vorstufen dienten die Verbindungen **6a-h**, welche eine freie Carboxylfunktion für weitere Funktionalisierungen besitzen (siehe Abb.23). Diese ermöglicht es den Tris(2-aminoethyl)amin-Baustein als Amid anzuknüpfen. Da das Tris(2-aminoethyl)amin drei gleichwertige primäre Aminogruppen besitzt, kommt es bei der Amidknüpfung ohne Schutzgruppenstrategie theoretisch zur Ausbildung unerwünschter Bis- und Trisamide.

Durch die richtige Wahl des stöchiometrischen Verhältnisses der Reaktanden sowie des Reaktionsablaufs war es dennoch möglich, auf eine Schutzgruppenstrategie zu

verzichten. Die Umsetzung der Verbindungen **6a-h** mit einem 20fachen Stoffmengenüberschuss an Tris(2-aminoethyl)amin erwies sich als günstig. Zudem wurde die durch PyBOP[®] aktivierte Säure zu der Aminkomponente langsam zugetropft, was den effektiven Tris(2-aminoethyl)amin-Überschuss weiter erhöhte. Wie aus Tab.4 ersichtlich wird, resultiert diese Synthesestrategie in hohen Ausbeuten für die Darstellung der Verbindungen **7a-h**.

Die Verbindungen **7a-h** stellen einen Schnittpunkt in der Synthese der verschiedenen Lipidkopfgruppen vom Tris(2-aminoethyl)amin-Typ dar (siehe Abb.23). Die säurekatalysierte Abspaltung der BOC-Schutzgruppe an der ϵ -Aminofunktion des Lysinbausteins liefert die Lipide vom Kopfgruppentyp-**IV**. Des Weiteren wurde der Kopfbereich vergrößert, indem die freien Aminogruppen der Verbindungen **7a,c-f** mit BOC-Lys(BOC)-OSu umgesetzt wurden. Es resultierten die BOC-geschützten Lipide **10a,c-f**, welche die Vorstufen der Cytofektine vom Kopfgruppentyp-**VIII** sind. Für die Synthese der Lipide mit der höchsten Anzahl an primären Aminogruppen im Kopfgruppenbereich wurden die Verbindungen **8a,c-f,h** mit BOC-Lys(BOC)-OSu zu den BOC-geschützten Verbindungen **9a,c-f,h** umgesetzt, welche final die Cytofektine vom Kopfgruppentyp-**VI** ergeben.

Tab.4: Ausbeuten für die Synthese der Verbindungen **7a-h** durch Kupplung von **6a-h** mit Tris(2-aminoethyl)amin.

Verbindung	Ausbeute [%]
7a	95
7b	93
7c	94
7d	94
7e	95
7f	85
7g	99
7h	61

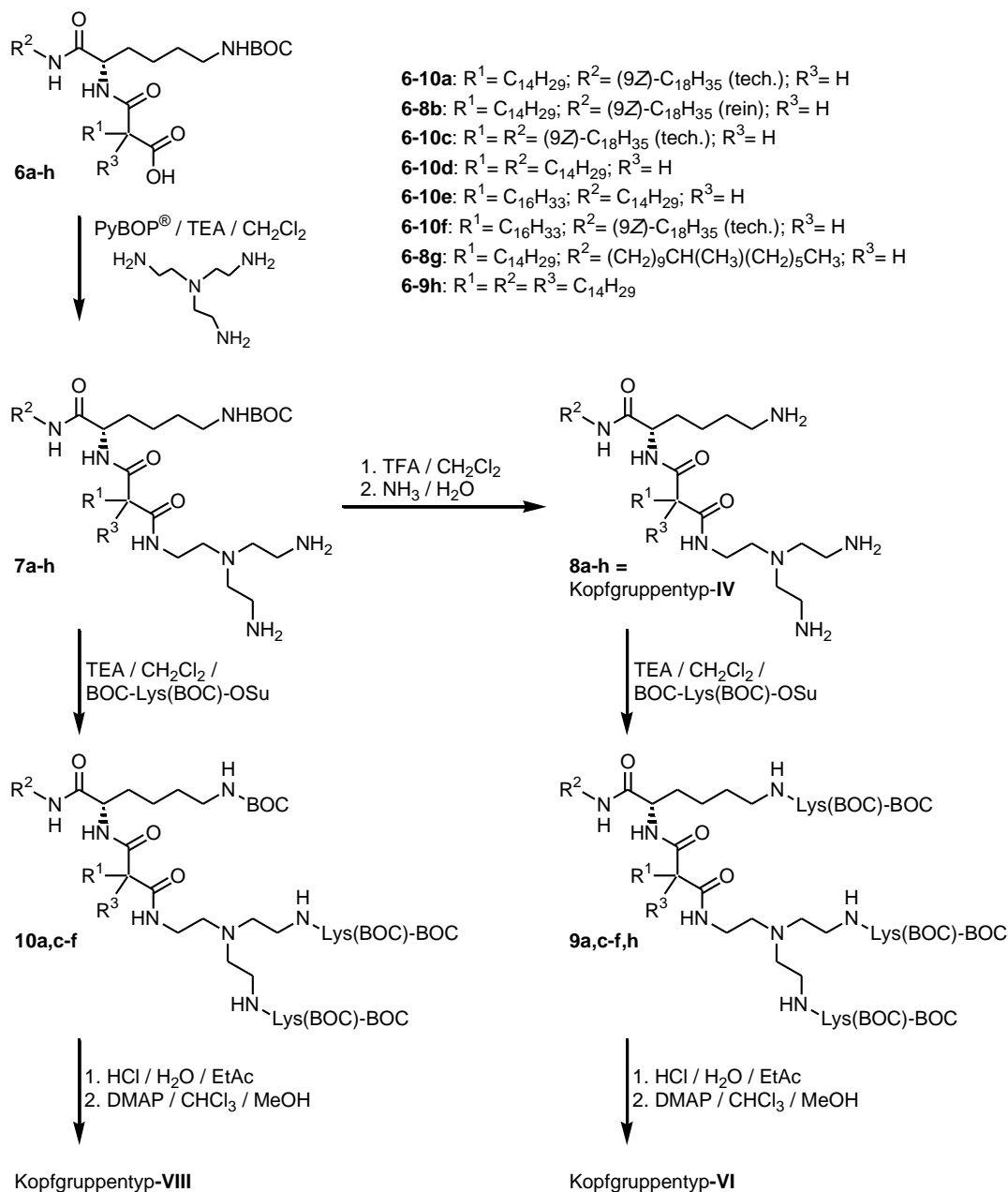


Abb. 23: Synthese der Lipide vom Tris(2-aminoethyl)amin-Typ (Kopfgruppentyp-IV, -VI und -VIII).

Die Abspaltung der BOC-Schutzgruppen der Verbindungen **9a,c-f,h** und **10a,c-f** war dabei mit Problemen behaftet. So zeigte sich, dass die in dieser Arbeit verwendete Standardmethode der BOC-Spaltung mit TFA (Methode C, Kap. 6.4.2.1) nicht anwendbar war. Auch wenn DC-Untersuchungen des Reaktionsverlaufs einen nahezu vollständigen Umsatz zeigten, war es nicht möglich das entstandene aminofunktionalisierte Lipid bzw. dessen TFA-Salz aufzuarbeiten. So gelang nach Einstellung von pH 10 mit Ammoniak keine Extraktion des Lipids mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln (Chloroform, Diethylether, Ethylacetat). Auch der Einsatz eines Perforators zur kontinuierlichen Extraktion⁸⁹ führte trotz einer Extraktionsdauer von 5 Tagen lediglich zu Ausbeuten unter 5%.

Da Extraktions- und Aufarbeitungsprobleme durch ein ungünstiges Verteilungsverhalten des Ammoniumtrifluoracetatsalzes der Lipide zwischen wässriger und organischer Phase verursacht werden können, kam Salzsäure als spaltendes Agens für die BOC-Schutzgruppe zum Einsatz um die Hydrochloridsalze der Lipide zu erhalten. Gewöhnlich werden zu diesem Zweck mit Chlorwasserstoff gesättigte organische Lösungsmittel, wie z.B. Ethylacetat, verwendet.¹¹² Da jedoch auf die Anwendung von Chlorwasserstoffgas zur Sättigung der organischen Lösungsmittel verzichtet werden sollte und kommerziell erhältliche organische Chlorwasserstofflösungen zu preisintensiv waren, kam in Anlehnung an die Literatur wässrige Salzsäure zum Einsatz.¹⁵⁹ Aufgrund der schlechten Lös-

lichkeit der BOC-geschützten Lipide in wässrigen Lösungen wurde zudem in einem Zweiphasensystem aus Ethylacetat und Wasser gearbeitet. Eine vergleichbare Reaktion ist in der Literatur für ein Toluol/Wasser/HCl-Gemisch beschrieben.¹⁶⁰

Die in dieser Arbeit angewendete Strategie der BOC-Schutzgruppenspaltung mit Salzsäure im Zweiphasensystem verlief nach DC-Untersuchungen vollständig. Zudem war die Aufarbeitung der entstandenen Hydrochloridsalze der Lipide durch Alkalisieren der wässrigen Salzsuspension und anschließender Extraktion möglich und verlief für die Umsetzung der Lipide **10a,c-e** in adäquaten Ausbeuten (siehe Tab.5 Aufarbeitung 1). Dadurch wurden die Lipide vom Kopfgruppentyp-**VIII** zugänglich.

Die Ausbeuten für die Synthese der Lipide vom Kopfgruppentyp-**VI** durch BOC-Spaltung mit Salzsäure waren, unter Verwendung des üblichen Extraktionsschrittes in der Aufarbeitung (siehe Kap.6.4.2.1, Methode D, Aufarbeitung 1), zu gering um diese Methode auf die Synthese aller homologen Lipide dieses Kopfgruppentyps anzuwenden (siehe Tab.5 Aufarbeitung 1). Folglich wurde die Aufarbeitung modifiziert um die verlustreichen Extraktionsschritte zu umgehen. Es galt eine starke Base zu finden, welche die Ammoniumhydrochlorid-Funktionen der Lipide in die freien Amine überführt, deren Salz sich aber vollständig ohne Anwendung eines Extraktionsschritts abtrennen lies. Die Wahl fiel

Tab.5: Gegenüberstellung der beiden Aufarbeitungsmethoden nach der Abspaltung der BOC-Schutzgruppe mit HCl (Kap.6.4.2.1 Methode D) im Zweiphasensystem Wasser/Ethylacetat. Aufarbeitung 1 entspricht der herkömmlichen Aufarbeitung durch Extraktion der alkalischen Wasserphase mit Chloroform. Aufarbeitung 2 entspricht der beschriebenen DMAP-Methode.

<i>Lipid</i>	<i>Ausbeute [%]</i>	
	<i>Aufarbeitung 1</i>	<i>Aufarbeitung 2</i>
TO-VI	21	97
OO-VI	n.b.	90
TT-VI	27	99
HT-VI	n.b.	97
HO-VI	n.b.	94
DiTT-VI	n.b.	79
TO-VIII	70	n.b.
OO-VIII	58	n.b.
TT-VIII	69	n.b.
HT-VIII	58	n.b.
HO-VIII	n.b.	96

auf 4-Dimethylaminopyridin (DMAP), eine in organischen Lösungsmitteln sehr starke Base ($\text{pKs}[\text{Wasser}]^{161-163} \approx 10$, $\text{pKs}[\text{Acetonitril}]^{164,165} \approx 18$), welche zudem in der organischen Synthese als Acylierungskatalysator genutzt wird.^{163,166} Aufgrund der starken Basizität von DMAP werden die Hydrochloridsalze der aminofunktionalisierten Lipide in wasserfreien Medien in die freie Base überführt. Hierfür wurden das entsprechende Hydrochloridsalz der Lipide und DMAP in einem Chloroform/Methanol-Gemisch (1/5, V/V) gelöst. Diese Lösung wurde über Kieselgel chromatographiert, wobei das DMAP-Hydrochlorid als lipophiles Ionenpaar unter Verwendung einer Chloroform/Methanol-Mischung (1/5, V/V) eluiert wurde. Anschließend konnte das gewünschte Lipid durch Steigerung der Elutionskraft der mobilen Phase (Chloroform/Methanol/Ammoniak-Mischungen) eluiert werden. Diese Methode ist im Kap. 6.3.1 (Säulenchromatographie Methode 4) näher erläutert. Die mit dieser schnellen Art der Produktaufarbeitung erzielten hohen Ausbeuten (siehe Tab.5 Aufarbeitung 2) führten dazu, dass im weiteren Verlauf der Synthese der Cytofektine vom Typ-**VI** ausschließlich diese DMAP-Methode zum Einsatz kam. Die in Tab.5 angegebene Ausbeute für die Anwendung dieser Aufarbeitungsmethode auf die Synthese der Cytofektine vom Typ-**VIII** (**HO-VIII**) zeigt, dass diese auch für die Reinigung dieser Lipide geeigneter erscheint. Bei einer möglichen Übertragung auf die Synthese wesentlich lipophilerer aminofunktionalisierter Lipide muss jedoch beachtet werden, dass bei der chromatographischen Abtrennung des DMAP-Hydrochlorids Probleme durch ähnliche Retentionszeiten auftreten können. Trotzdem handelt es sich bei der DMAP-Methode um eine neue Aufarbeitungsmethode basischer Lipide, welche sich durch eine schnelle Durchführung bei geringem präparativen Aufwand und hohen Ausbeuten auszeichnet.

Für die chromatographische Reinigung der Lipide mit dem Kopfgruppentyp-**VI** wurden alternative stationäre Phasen im Vergleich zu den in dieser Arbeit beschriebenen Chromatographiemethoden mit Kieselgel (siehe Kap.6.3.1) getestet. Zunächst wurde die Umkehrphasenchromatographie ((RP)-Chromatographie) zur Aufreinigung von **TO-VI** verwendet. Bei der RP-Chromatographie werden alkylmodifizierte Kieselgele als stationäre Phase genutzt, wodurch diese lipophile Eigenschaften erhält. Sie eignet sich besonders zur chromatographischen Trennung sehr hydrophiler Substanzen. Des Weiteren ist die RP-Chromatographie in der Literatur als HPLC-Methode für die Trennung von kationischen Lipiden und Phospholipiden beschrieben.¹⁶⁷⁻¹⁷⁰ In Anlehnung daran wurde Kieselgel 60 RP18 (40-63 μm) der Firma Merck, ein mit *n*-Octadecylketten modifiziertes Kieselgel, verwendet. Als mobile Phase kamen verschiedene Gemische aus Wasser und organischen Lösungsmitteln, unter Zusatz von 0,1 % (m/m) Trifluoressigsäure, zum Einsatz. Es war jedoch nicht

möglich eine chromatographische Trennung der gewünschten Produkte von den Verunreinigungen zu erzielen. Vermutlich ist das Aggregationsverhalten der Lipide, welche im wässrigen Milieu Mizellen ausbilden und somit die Chromatographie erschweren (siehe Kap. 3.4.1), dafür verantwortlich.

Eine weitere stationäre Phase, die als mögliches Trennsystem genutzt wurde, war Sephadex[®] LH-20. Dabei handelt es sich um ein quervernetztes Dextran, welches durch Hydroxypropylierung sowohl hydrophile als auch lipophile Eigenschaften besitzt und daher in Wasser und einer Vielzahl von organischen Lösungsmitteln quillt.¹⁷¹ Die Substanztrennung bei der Chromatographie mit Sephadex[®] LH-20 erfolgt durch Größenausschluss und spezifische Wechselwirkungen zwischen Substanz und stationärer Phase. Die Anwendung auf die Chromatographie von Lipidgemischen ist bereits in der Literatur beschrieben.^{172,173} Als Elutionsmittel für die Reinigung von **TO-VI** diente eine Chloroform/Methanol-Mischung mit steigender Polarität. Mit dem Trennsystem gelang lediglich eine unvollständige Aufreinigung der Verbindung **TO-VI**, da auch Mischfraktionen mit Produkt und Verunreinigung erhalten wurden. Das Verfahren wurde zu Gunsten der Chromatographie mit Kieselgel (Kap. 6.3.1 Säulenchromatographie Methode 4) verworfen, da es bei einer schlechteren Trennleistung mit einem höheren präparativen Aufwand verbunden war. So stellte das Flotieren der stationären Phase bei der Verwendung von Chloroform-haltigen Elutionsmitteln, aufgrund der geringen Dichte des Sephadex[®] LH-20, ein Problem bei der praktischen Anwendung dar.

Zusammenfassend gelang es durch Optimierung von Synthese und Aufreinigungsschritten über die Tris(2-aminoethyl)amin-haltigen Verbindungen **7a-h** die Lipide vom Kopfgruppentyp-**IV**, **-VI** und **-VIII** in guten Ausbeuten zu synthetisieren.

2.7 Synthese der Lipide mit Ethylendiamin-Baustein – Lipide vom Ethylendiamin-Typ

Die Synthese zur Darstellung der Malonamide vom Ethylendiamin-Typ ist in Abb. 24 gezeigt. Diese Malonamide gehören ebenfalls zur 2. Generation, wobei die verwendete Strategie mit der Synthese der Lipide vom Tris(2-aminoethyl)amin-Typ vergleichbar ist (siehe Abb. 23).

Als Vorstufe werden ebenfalls die freien Carbonsäuren **6a-g** verwendet. Unter Nutzung von PyBOP[®] als Kupplungsreagenz wird die Carbonsäurefunktion der Verbindungen **6a-g** mit Ethylendiamin zu den Amiden **11a-g** umgesetzt. Dabei konnte ebenfalls durch Einsatz von 20 Äquivalenten Ethylendiamin auf 1 Äquivalent Carbonsäure auf eine Schutzgruppenstrategie zur Vermeidung von Bisamidierungen verzichtet werden.

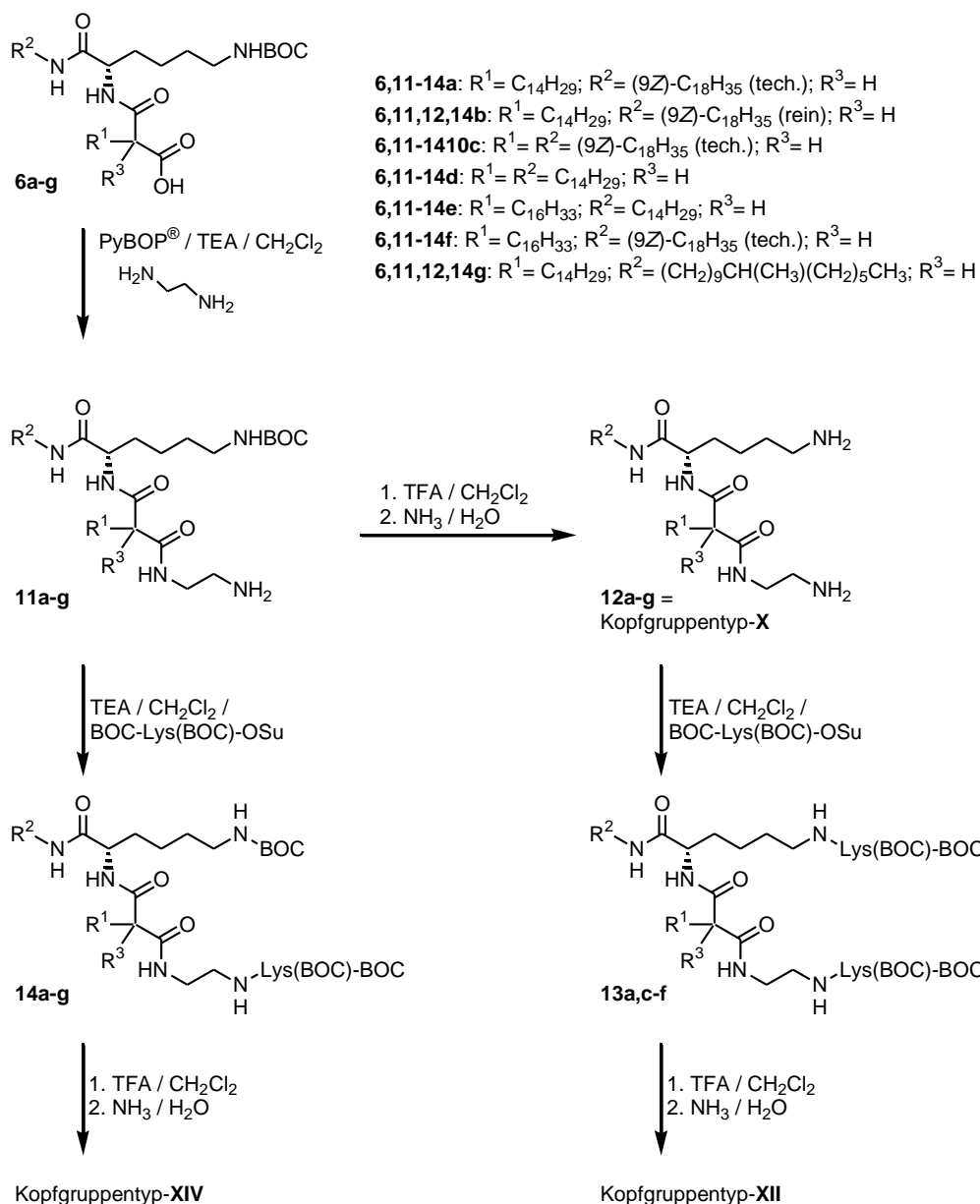


Abb. 24: Synthese der Lipide vom Ethylendiamin-Typ (Kopfgruppentyp-X, -XII und -XIV).

Die Verbindungen **11a-g** stellen ein zentrales Zwischenprodukt für die Synthese der Ethylendiamin-haltigen Lipide dar (siehe Abb.24). So wurde aus **11a-g** durch die Amidkupplung mit BOC-Lys(BOC)-OSu und anschließender BOC-Spaltung mit TFA der Kopfgruppentyp-**XIV** zugänglich. Des Weiteren konnte durch die direkte Behandlung der Verbindungen **11a-g** mit TFA der Kopfgruppentyp-**X** dargestellt werden. Eine weitere Umsetzung der Verbindungen **12a-g** (Kopfgruppentyp-**X**) durch Amidkupplung mit BOC-Lys(BOC)-OSu und anschließender BOC-Spaltung mit TFA macht die Cytokine vom Kopfgruppentyp-**XII** zugänglich.

Bei der Synthese der Lipide vom Ethylendiamin-Typ konnte problemlos TFA als BOC-spaltendes Agens verwendet werden (Vergleich dazu: Syntheseschwierigkeiten beim

Tris(2-aminoethyl)amin-Typ, Kap.2.6). Auch die säulenchromatographische Reinigung der Endprodukte verlief unter Anwendung von Kieselgel und Chloroform/Methanol/Ammoniak-Gemischen steigender Polarität unproblematisch.

Zusammenfassend gelang es über die Ethylendiamin-haltigen Verbindungen **11a-g** die Lipide vom Kopfgruppentyp-**X**, **-XII** und **-XIV** in guten Ausbeuten zu synthetisieren.

2.8 Stereochemie der Malonamide der 2. Generation

Um die Biokompatibilität der Lipide zu gewährleisten, wurde die proteinogene Aminosäure L-Lysin sowohl in den Kopfgruppenbereich als auch in das Rückgrat der Lipide eingebaut. Dabei galt es auf die Stereochemie der Aminosäurebausteine zu achten um die natürliche Konfiguration der proteinogenen Aminosäuren (L-Konfiguration nach FISCHER) zu bewahren. So wies das in der Synthese verwendete BOC-Lys(BOC)-OSu die *S*-Konfiguration am α -Kohlenstoff auf (entspricht L-Konfiguration nach FISCHER). Da die Amidknüpfung mit *N*-Hydroxysuccinimidestern in der Literatur als racemisierungsfrei beschrieben wird, kann davon ausgegangen werden, dass die über BOC-Lys(BOC)-OSu eingeführten Lysineinheiten *S*-konfiguriert sind.¹⁰⁸ Die Amidknüpfung mit PyBOP[®] als Kupplungsreagenz für die Aktivierung von Aminosäuren verläuft racemisierungsarm.^{104,147} Somit kann auch bei den auf diesem Weg eingeführten Lysinbausteinen (Ausgangstoff für das Lysin des Rückgrats war α -*N*-Fmoc- ϵ -*N*-BOC-L-Lysin) von der *S*-Konfiguration ausgegangen werden.

Weiterhin wurde jeder Reaktionsschritt so geplant, dass keine Racemisierungsreaktionen am α -Kohlenstoff der Lysinbausteine auftreten sollten. So wurden die Schutzgruppen unter solchen Bedingungen abgespalten, wie sie auch in der Peptidsynthese Anwendung finden.¹⁰³ Auch die Verseifungsreaktionen bei Vorhandensein von Lysineinheiten im Molekül wurden unter sehr milden Bedingungen durchgeführt (siehe Kap.2.5.4), was eine Racemisierung in α -Position am Lysin ausschließt. Somit wird in der vorliegenden Arbeit davon ausgegangen, dass die Lysineinheiten in den Lipiden *S*-konfiguriert sind.

Im folgenden Teil soll eine stereochemische Besonderheit der Malonsäurediamide der 2. Generation, welche zwei Alkylketten aufweisen, beschrieben werden. Überraschenderweise zeigten die aminofunktionalisierten Lipide nach der Abspaltung der BOC-Schutzgruppe im letzten Syntheseschritt zwei identisch große Flecke mit unterschiedlichen R_f -Werten auf den entwickelten Dünnschichtchromatogrammen - ein Hinweis auf zwei verschiedene Substanzen (siehe Abb. 25). ESI-MS-Untersuchungen der beiden Substanzen nach Extraktion von der DC-Platte zeigten jedoch für beide Extrakte identische Massenspektren des gewünschten Produkts. Aufgrund dieser Beobachtung und unter genauerer Betrachtung des Synthesewegs

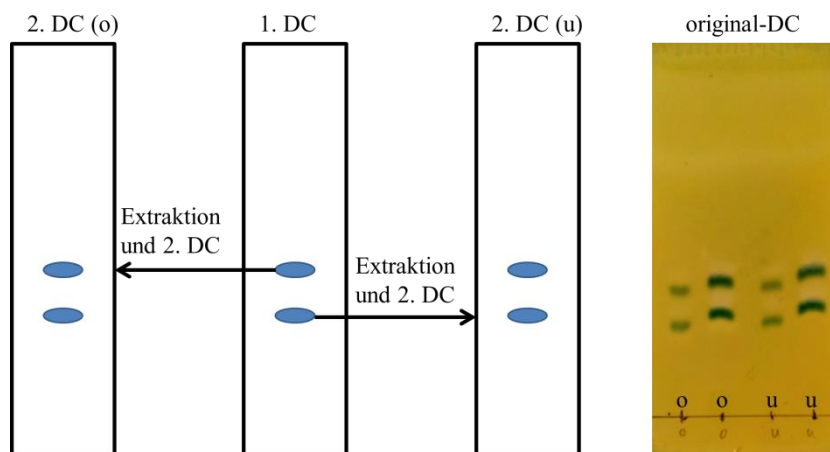


Abb. 25: Schematische Darstellung und Abbildung der original-DC des Extraktionsexperiments mit **HT-X**. Das Schema demonstriert das Extraktionsexperiment: Zunächst wurde das Diastereomerenmischung einer DC-Trennung unterzogen (1. DC). Anschließend wurden die Substanzflecke ausgeschnitten und die Substanzen getrennt extrahiert. Die 2 Substanzextrakte wurden einer zweiten DC-Untersuchung unterzogen (2. DC), wobei erneut 2 Flecke auftraten. Die original-DC zeigt die 2. DC, welche mit den Extrakten der 1. DC entwickelt wurde. o bezeichnet den Extrakt vom Substanzfleck der 1. DC mit dem größeren R_f -Wert, u bezeichnet den Extrakt vom Substanzfleck der 1. DC mit dem kleineren R_f -Wert.

der Lipide, wurde die These aufgestellt, dass die beiden Substanzen ein Diastereomerenpaar darstellen: Die Alkylamide des BOC-geschützten L-Lysins (**4a-d**) und die racemischen monoalkylierten Malonsäuremonoethylester (**2a-c**) wurden bei der Rückgratsynthese über eine rigide Amidbindung verknüpft, wodurch die zwei Diastereomere mit (*S,R*)- und (*S,S*)-Konfiguration entstehen (siehe Abb. 26).

Zunächst wurde versucht das Diastereomerenpaar säulenchromatographisch zu trennen, was trotz der unterschiedlichen R_f -Werte nicht gelang. Eine Antwort auf dieses Trennproblem lieferte folgendes Experiment, welches in Abb. 25 dargestellt ist: Das Diastereomerenpaar wurde auf der DC-Platte getrennt, die Substanzflecken (o und u) von der DC-Platte gekratzt, extrahiert und anschließend in einer zweiten DC-Untersuchung mit dem gleichen Trennsystem entwickelt. Dabei zeigten sich sowohl für den Extrakt der Substanz mit dem größeren R_f -Wert (o) als auch für die Substanz mit dem kleineren R_f -Wert (u) erneut beide Flecken (o und u). Offensichtlich racemisiert das Stereozentrum am α -Kohlenstoff der Malonsäureeinheit sehr einfach. Abb. 26 zeigt den postulierten Mechanismus der Racemisierung über ein Enolintermediat (Struktur in der Mitte).

Letztendlich konnte die Diastereomerenhypothese auch synthetisch bewiesen werden. So besitzen die Lipide **DiTT-IV** und **DiTT-VI** kein Stereozentrum mehr am α -Kohlenstoff der Malonsäureeinheit. Durch den Verlust des Stereozentrums sind diese Verbindungen nicht mehr befähigt Diastereomere auszubilden, sondern stellen lediglich einfache Enantiomere dar. Diese Substanzen zeigen nach der DC-Untersuchung nur einen Fleck.

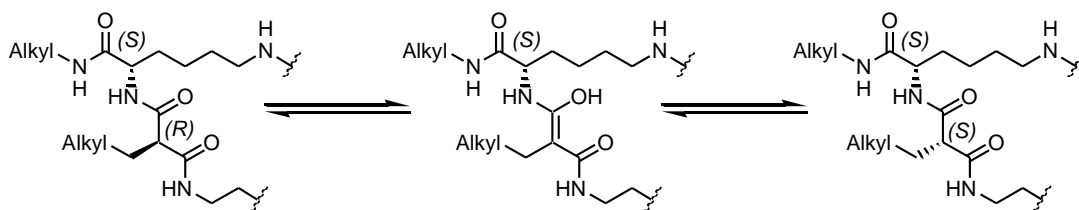


Abb.26: Postulierter Mechanismus für die Racemisierung des Stereozentrums in α -Position der Malonsäurestruktur der Malonsäurediamide der 2. Generation über ein Enolintermediat.

2.9 NMR-Untersuchungen der Malonsäurediamide der 2. Generation

Alle in dieser Arbeit synthetisierten Endverbindungen wurden mittels ^1H - und ^{13}C -NMR untersucht. Die ^1H -Übersichtsspektren der Malonamide der 2. Generation haben Ähnlichkeit mit Übersichtsspektren, welche für Polymere erhalten werden (siehe Abb.27).¹⁷⁴ Eine Ursache dafür liegt in den komplexen Molekülstrukturen, die eine große Anzahl an Wasserstoffatomen mit vergleichbarer chemischer Verschiebung aufweisen. Des Weiteren sorgen charakteristische NMR-Eigenschaften von Amidgruppen für eine weitere Komplexität der ^1H -NMR-Spektren. Hier sind besonders Anisotropie-Phänomene in der Umgebung der Amidfunktion und *cis/trans*-Isomerisierung des N-gebundenen Protons der Amidbindung bei N-monosubstituierten Amiden zu nennen.¹⁷⁵ Aus diesem Grund ist es sehr schwierig die Spektren mit Hilfe von Signalaufspaltungen und Kopplungskonstanten zu interpretieren. Erst

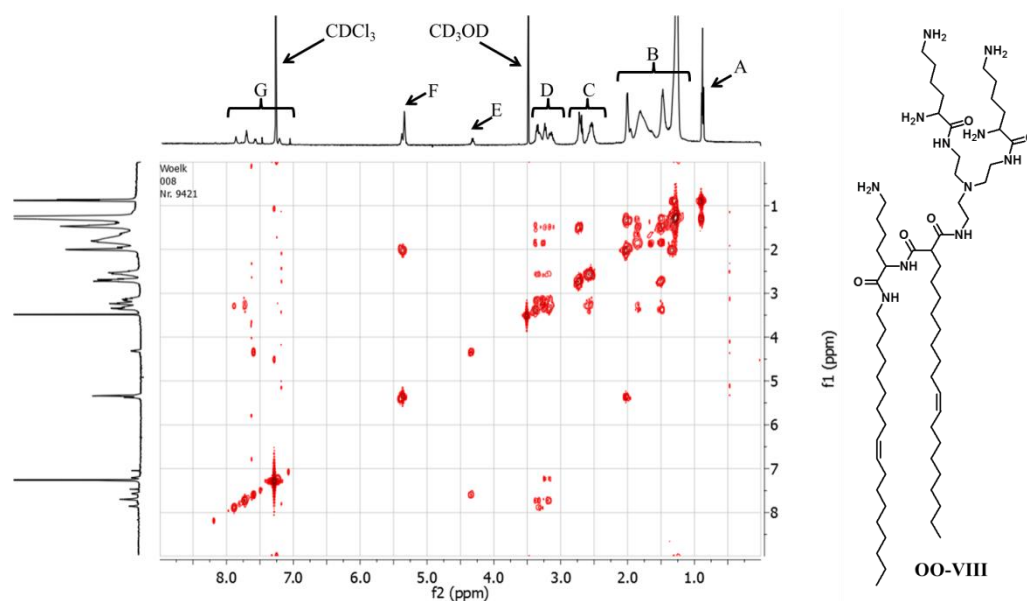


Abb.27: ^1H , ^1H -COSY- und die zugehörigen ^1H -NMR-Spektren für das Lipid **OO-VIII** (Formel rechts) gelöst in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$. Die Signale wurden den entsprechenden Gruppen an Protonen mit ähnlicher chemischer Verschiebung zugeordnet: A – CH_3 , B – Protonen der Alkylketten, C – CH_2 benachbart zu der tertiären Aminogruppe und den ϵ -Aminogruppen der Lysinbausteine, D – CH_2 benachbart zum Amid-NH und α -H der Malonsäureeinheit und der Tris(2-aminoethyl)amin-gebundenen Lysine, E – α -H des Lysins des Rückgrats, F – olefinische Protonen und G – Amid-NH.

durch die Aufnahme von ^1H , ^1H -COSY-Spektren war eine sichere Zuordnung der Signale möglich (siehe Abb. 27 und Supporting Information WÖLK et al.¹⁷⁶).

Üblicherweise wurde CDCl_3 als Lösungsmittel für die Aufnahme der NMR-Spektren verwendet. Überraschenderweise zeigten dabei einige der aminofunktionalisierten Lipide (Kopfgruppentyp-**X** und **-XII**) die Bildung eines Organogels in CDCl_3 , wobei eine auffällig starke Bandenverbreiterung aufgrund der eingeschränkten Beweglichkeit der Lipide beobachtet wurde. Die Gelbildung konnte durch die Verringerung der Lipidkonzentration oder der Zugabe kleiner Mengen CD_3OD , welches Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Lipidmolekülen zu brechen vermag, unterdrückt werden. Leider beeinflussen diese Maßnahmen die Signalintensität (Konzentrationsverringerung) sowie die Vergleichbarkeit der Spektren von homologen Lipiden (Signal-Verschiebungen bei Anwesenheit von CD_3OD sowie Verlust der NH - ^1H -NMR-Signale durch den schnellen Protonenaustausch in Anwesenheit von CD_3OD).

Eine weitere Besonderheit stellen die Lipide vom Kopfgruppentyp-**VI** und einige Lipide vom Kopfgruppentyp-**VIII** dar. Diese Lipide waren aufgrund ihrer Hydrophilie oder ihres Aggregationsverhaltens in den deuterierten Standard-NMR-Lösungsmitteln (DMSO, Methanol, Chloroform, Aceton sowie deren Mischungen) unlöslich. Lediglich D_2O war als Lösungsmittel für die NMR-Untersuchungen geeignet. Zur Aufnahme der Spektren in D_2O wurde bei 60°C gearbeitet, da bei 27°C starke Bandenverbreiterungen durch die Ausbildung von Lipidaggregaten in D_2O auftraten.

^{13}C -NMR-Spektren wurden üblicherweise in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ -Mischungen aufgenommen, da in reinem CDCl_3 eine ausreichende Löslichkeit nicht gegeben war. Bei den Lipiden, deren ^1H -NMR-Spektren bereits in D_2O aufgenommen wurden, erfolgte die ^{13}C -NMR-Spektroskopie ebenfalls mit D_2O als Lösungsmittel. Da die ^{13}C -NMR-Spektren der Lipide sehr komplex sind, ist es in der Regel nur möglich bestimmte Signalgruppen den entsprechenden Gruppen von Kohlenstoffatomen mit einer ähnlichen chemischen Verschiebung zuzuordnen (siehe Abb. 28). Durch Aufnahme von ^1H , ^{13}C -COSY-Spektren wurden wertvolle Informationen für die Signalzuordnung erhalten.

Bei den ^{13}C -NMR-Spektren wurde eine starke Lösungsmittelabhängigkeit in Bezug auf Anzahl und Lage von Signalen beobachtet. Dies wird in Abb. 29 verdeutlicht. Es sind zwei Ausschnitte der ^{13}C -NMR-Spektren von **TO-X** in verschiedenen Konzentrationen bzw. in verschiedenen Lösungsmitteln dargestellt. So zeigen die Spektrenausschnitte der Probe mit hoher Lipidkonzentration in CDCl_3 (Abb. 29c1,c2), wobei eine Gelbildung beobachtet wurde, eine starke Signalverbreiterung im Vergleich zu der niedrig konzentrierten, ungeliierten Probe

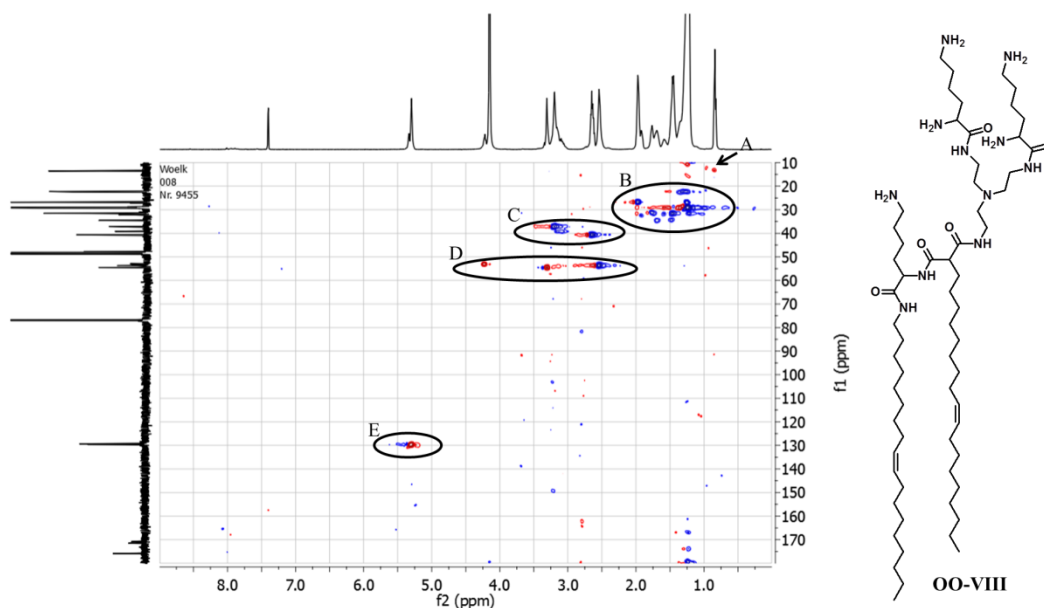


Abb. 28: ^1H , ^{13}C -COSY- und die zugehörigen ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren in CDCl_3 für das Lipid **OO-VIII** (Formel rechts). Die Signale wurden im ^1H , ^{13}C -COSY den entsprechenden Gruppen an Kohlenstoffatomen mit ähnlicher chemischer Verschiebung zugeordnet: A – CH_3 , B – Alkylkohlenstoffatome, C – CH_2 benachbart zu den ϵ -Aminogruppen der Lysinbausteine und Amid-NH, D – CH_2 benachbart zur tertiären Aminogruppe und α -C der Malonsäureeinheit sowie α -C der Lysine, E - olefinische Kohlenstoffe.

in CDCl_3 (Abb. 29b1,b2). Die Signallage ist durch den Konzentrationsunterschied nur schwach beeinflusst. Das Spektrum des gleichen Lipids in einer $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ -Mischung zeigt, verglichen mit den in CDCl_3 aufgenommenen Spektren, eine deutliche Signalverschiebung (siehe Abb. 29a1,a2).

Weiterhin wurde beobachtet, dass neben der Signalverschiebung zusätzlich eine Änderung der Signalanzahl auftrat. So zeigen die in CDCl_3 aufgenommenen Spektren (siehe Abb. 29b2,c2) 4 Signale im Bereich von 39-43 ppm (Kohlenstoffatomzuordnung: $2 \times \text{CH}_2\text{NHCO}$ und $2 \times \text{CH}_2\text{NH}_2$) und die in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ -Mischung (Abb. 29a2) aufgenommenen Spektren lediglich 3 Signale, verursacht von denselben Kohlenstoffatomen. Noch stärker wird die Signalanzahl im Bereich der Carbonylkohlenstoffe (170-172 ppm) beeinflusst (siehe Abb. 29a1-c1). In CDCl_3 erscheinen 2 Signale, welche von 3 Carbonylkohlenstoffatomen stammen. Dagegen verursachen diese 3 Kohlenstoffatome 6 Signale bei der Anwesenheit von CD_3OD . Der Grund für diese Signalaufspaltung ist die Koexistenz von freien Carbonylfunktionen und Carbonylfunktionen in Wasserstoffbrückenbindung mit Methanol.^{177,178}

Die beschriebenen Beobachtungen machen die Interpretation der NMR-Spektren der Lipide sehr schwierig. Dennoch war eine eindeutige Zuordnung der ^1H -NMR-Signale möglich (siehe Kap. 6.4). Die ^{13}C -NMR-Signale wurden als „Fingerprint“ ohne detaillierte Signalzuordnung angegeben. Zudem ist die Wahl der NMR-Lösungsmittel ein Kompromiss aus Substanzlöslichkeit und der Vergleichbarkeit der Spektren der Lipide untereinander, d.h. beim

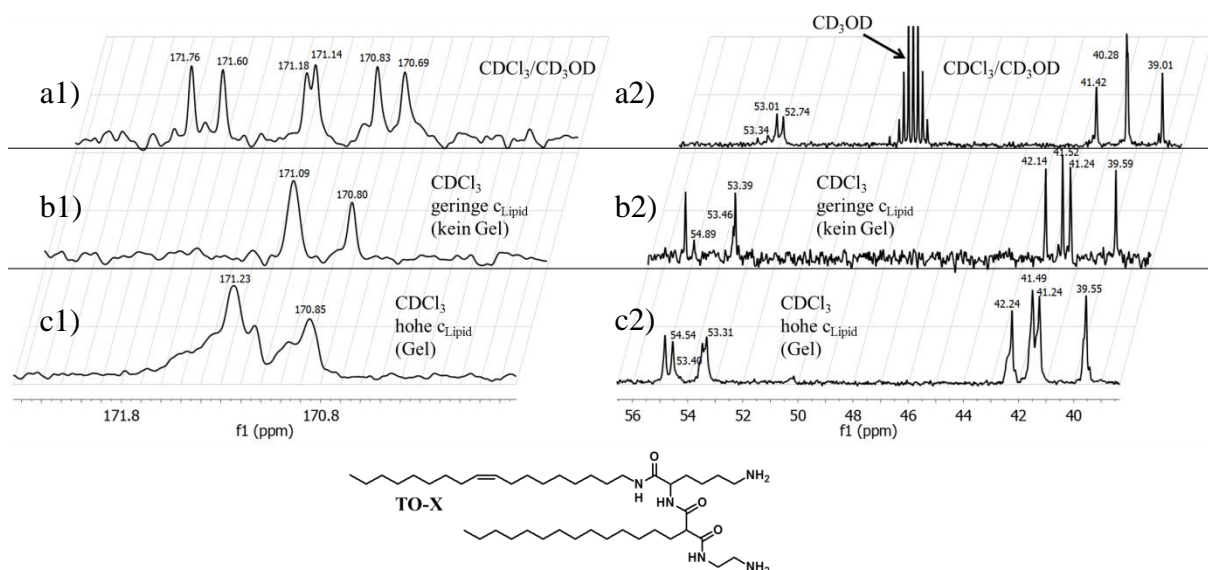


Abb. 29: Ausschnitte aus den ^{13}C -NMR-Spektren von **TO-X** (siehe Formel) in verschiedenen Konzentrationen und Lösungsmitteln: a1-c1) Carbonylregion zwischen 170,0 ppm und 172,3 ppm; a2-c2) Methylenkohlenstoffe in Nachbarschaft zu Amid-Stickstoffatomen und in Nachbarschaft zu primären Aminogruppen in der Region von 38 ppm bis 56 ppm. a1,a2) Lipidlösung in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ -Mischung (2/1, V/V); b1,b2) Lipidlösung niedriger Konzentration in CDCl_3 ; c1,c2) Lipidlösung hoher Konzentration in CDCl_3 unter Organogelbildung.

Vergleich der Spektren einer homologen Reihe von Verbindungen (siehe Kap. 6.4) ist immer auf das verwendete Lösungsmittel zu achten.

2.10 Synthese von Malonsäurediamiden der 1. Generation für gezielte Fragestellungen

Im Laufe der Untersuchung von neuen kationischen Lipiden innerhalb der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. LANGNER haben sich einige Vertreter der Malonsäurediamide der 1. Generation als effektive Vektoren für den Gentransfer erwiesen.⁸⁸ Dennoch blieben spezielle Fragestellungen offen, welche die Synthese von neuen Derivaten erforderten. So kamen für die ungesättigten Vertreter dieser Transfektionslipide bisher Oleylketten von technischer Reinheit zum Einsatz. Mit der gezielten Synthese kettenreiner Lipide sollte der Einfluss der Kettenreinheit auf das Transfektionsverhalten untersucht werden.

Weiterhin wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt in der Arbeitsgruppe kein Malonsäurediamid mit Erkennungsstruktur synthetisiert. Im Rahmen dieser Arbeit werden erste Schritte zur Einführung von Liganden in Malonsäurediamide der 1. Generation für eine Targetierung beschrieben.

Es soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass diese Fragestellungen auch auf die Malonsäurediamide der 2. Generation übertragen werden können. So wurde bei der Syntheseplanung der Malonsäurediamide der 2. Generation die Problematik der Kettenreinheit bereits mit bedacht. Mit den Strukturpaaren **TO-IV/RTO-IV**, **TO-X/RTO-X** und **TO-XIV/**

RTO-XIV wurden ebenfalls Lipide synthetisiert, welche sich lediglich im Reinheitsgrad des verwendeten Oleylamins unterscheiden. Jedoch bedarf es für diese Lipide noch einer ausgiebigeren Charakterisierung.

2.10.1 Synthese der Malonsäurediamide der 1. Generation mit unterschiedlicher Alkylkettenreinheit

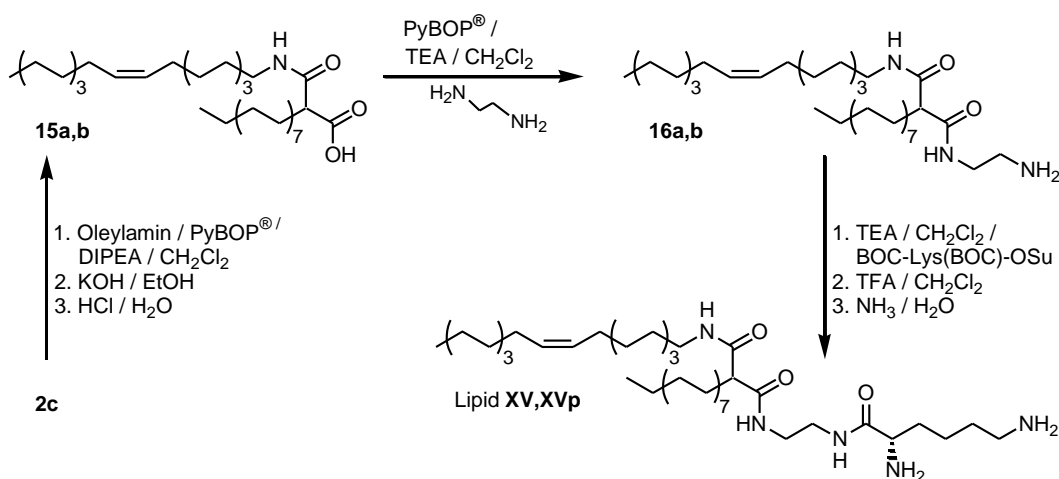


Abb.30: Synthese des homologen Lipidpaars **XV/XVp**. Die Verbindungen **15a**, **16a** und Lipid **XV** wurden mit Oleylamin (tech.) synthetisiert. Die Verbindungen **15b**, **16b** und Lipid **XVp** wurden mit Oleylamin (rein) synthetisiert.

Aus der Gruppe der Malonsäurediamide der 1. Generation wurde das Lipid **XV** (siehe Abb. 30), neben Untersuchungen hinsichtlich der Transfektionseffizienz am Zellkulturmodell, auch einer intensiven physiko-chemischen Charakterisierung, sowohl auf der Monoschicht (IRRAS, GIXD, XR)¹⁷⁹ als auch im Volumensystem (SAXS, WAXS, DSC)¹⁸⁰, unterzogen, um das Aggregationsverhalten des Lipids sowie die Komplexbildung mit DNA ausführlich zu erforschen. Daher fiel die Wahl für erste Untersuchungen des Einflusses der Kettenreinheit auf das Aggregationsverhalten und die Transfektionseffizienz auf Lipid **XV**. Infolge dessen wurde das strukturanaloge Lipid **XVp** unter Verwendung von Oleylamin (rein) synthetisiert. Des Weiteren wurde das Lipid **XV** auf einen im Vergleich zur Erstbeschreibung modifizierten Weg nachsynthetisiert um vergleichende Untersuchungen zwischen den Lipiden **XV** und **XVp** vervollständigen zu können.

Die Synthese der Lipide **XV** und **XVp** erfolgte in Anlehnung an einen bereits beschriebenen Syntheseweg.⁸⁸ Durch die Optimierung der Synthese an 3 Stellen soll im Folgenden noch einmal kurz auf die Darstellung der beiden Lipide eingegangen werden soll (siehe Abb. 30).

Im 1. Schritt der Rückgratsynthese wurde der Hexadecylmalonsäuremonoethylester **2c** mit Oleylamin (rein oder tech.) zu dem entsprechenden Malonsäurederivat **15a,b** unter Verwendung von PyBOP® als Amidkupplungsreagenz umgesetzt. HEINZE et al. beschrieb die

Verwendung von EEDQ oder Thionylchlorid für diesen Syntheseschritt. Durch die Substitution dieser beiden Kupplungsreagenzien gegen PyBOP[®] konnte die Reaktionsausbeute etwas erhöht (siehe Tab. 6) und im Vergleich zu EEDQ die Reaktionszeit verringert werden (PyBOP[®]: 16h; EEDQ: 24h). Des Weiteren ist der präparative Aufwand bei der Verwendung von PyBOP[®] geringer als bei der Amidkupplung mit EEDQ (24 h bei 50 °C) und Thionylchlorid (Schritt 1: Säurechloridsynthese; Schritt 2: Aminacylierung unter Eiskühlung). Nach der Amidkupplung folgte ein Verseifungsschritt in Ethanol mit Kaliumhydroxid zu den freien Carbonsäuren **15a,b**.

Tab. 6: Vergleich der Ausbeuten für die Synthesen der Verbindungen **15a,b**; **16a,b** und der Lipide **XV** sowie **XVp**, welche im Rahmen dieser Arbeit erzielt wurden (Methode A), mit den Ausbeuten der bereits in der Literatur veröffentlichten Synthesewege (Methode B/C).

Verbindung/ Lipid	Methode A ^[a]		Methode B ^[b]		Methode C ^[c]	
	Ausbeute [%]	Amidkupp- lungsreagenz	Ausbeute [%]	Amidkupp- lungsreagenz	Ausbeute [%]	Amidkupp- lungsreagenz
15a	75	PyBOP [®]	68	Thionylchlorid	68	EEDQ
15b	81	PyBOP [®]	n.b.	-	n.b.	-
16a	79	PyBOP [®]	80	BOP	68	HOSu/DCC
16b	65	PyBOP [®]	n.b.	-	n.b.	-
XV	70	HOSu-Ester	56	HOSu-Ester	n.b.	-
XVp	81	HOSu-Ester	n.b.	-	n.b.	-

[a] in dieser Arbeit beschriebener Syntheseweg

[b] Syntheseweg von Heinze et al.⁸⁸

[c] alternativer Syntheseweg von Heinze et al.⁸⁸

Für die Umsetzung der Carbonsäuren **15a,b** mit Ethylendiamin zu den Verbindungen **16a,b** wurde, in Abweichung zu den von HEINZE et al. beschriebenen Methoden (BOP- und HOSu/DCC-Kupplung),⁸⁸ auf die in dieser Arbeit beschriebene schutzgruppenfreie PyBOP[®]-Kupplung zurückgegriffen. Zwar erzielte die *in-situ* Carbonsäureaktivierung mit PyBOP[®] keine Verbesserung der Reaktionsausbeute (siehe Tab. 6), jedoch ist diese Abwandlung durch den Verzicht auf BOP (kanzerogenes Potential) als Aktivierungsreagenz und der einfacheren Handhabung gegenüber der HOSu/DCC-Aktivierung den von HEINZE et al. beschriebenen Methoden vorzuziehen.

Die Synthese der Lipide **XV** und **XVp** wurde in Analogie zu HEINZE et al. durch die Amidkupplung mit BOC-Lys(BOC)-OSu (HOSu-Ester) als Acylierungsagenz und der anschließenden BOC-Spaltung mit verdünnter TFA in Methylenchlorid durchgeführt. Allerdings weicht die Art der Reaktionsdurchführung im Rahmen der vorliegenden Arbeit etwas ab (Vergleich Kap. 6.4.2.1 Methode B mit Synthesevorschrift von HEINZE et al.⁸⁸), was zu einer Steigerung der Ausbeute führte (siehe Tab. 6).

Zusammenfassend gelang es, das strukturanaloge Lipidpaar **XV/XVp** zu synthetisieren. Dabei wurde sich an einer bereits in der Literatur beschriebenen Synthesestrategie orientiert, welche in einigen Reaktionsschritten optimiert werden konnte.

2.10.2 Synthese von Galactose-Derivaten der Malonsäurediamide der 1. Generation

2.10.2.1 Einführung – Targetierung mittels Erkennungsstrukturen

Das Einführen von Kohlenhydratstrukturen in Lipidkopfgruppen kann zur aktiven Targetierung von Erkennungsstrukturen mit Nanopartikeln, d.h. der spezifischen Bindung an Zielstrukturen bei systemischer Applikation von Lipidformulierungen, genutzt werden. So stellt der Einbau von Lipiden mit biologischen Erkennungsstrukturen (z.B. Glycolipide) in Lipoplexten eine gezielte Genexpression in Zielzellen und Zielgeweben in Aussicht und dient damit der Reduzierung von unerwünschten systemischen Wirkungen. Tab.7 stellt eine Übersicht über mögliche Erkennungsstrukturen dar.¹⁸¹⁻¹⁸⁸ Neben den aufgelisteten Liganden finden weitere Erkennungsstrukturen, wie Antikörper, Anwendung.

Tab.7: Übersicht über eine Auswahl von möglichen Erkennungsstrukturen für die Zelltargetierung bei systemischer Anwendung. Neben den Erkennungsstrukturen (Ligand) sind die zugehörigen Rezeptoren (Target) und Beispiele für Zelltypen, welche diese exprimieren, angegeben.

<i>Ligand</i>	<i>Target</i>	<i>exprimierende Zelltypen</i>
Galactose	ASGP-R	Hepatozyten
<i>N</i> -Acetylgalactosamin	ASGP-R	Hepatozyten
Mannose-6-phosphat	M6P/IGF-II	hepatische Stammzellen
Mannose/Oligomannose	MM-R	Makrophagen
sLex	E-,P-Selektin	Tumorzellen, Thrombozyten, Endothelzellen
Serotonin	Serotonin-Rezeptoren	Nervenzellen, Darmzellen
RGD-Peptid	$\alpha_v\beta_3$ -Integrine	Endothelzellen
NGR-Peptid	Aminopeptidase N	Endothelzellen

Ziel der im Folgenden vorgestellten Synthese war es, erste Erkennungsstrukturen für die Malonamide der 1. Generation zu etablieren. Dafür sollte das für diese Lipide typische Grundgerüst über eine hydrophile Linkerstruktur mit Galactose als Kohlenhydratkomponente verknüpft werden, wobei auch die Anzahl der Galactosereste in den Glycolipiden variiert werden sollte. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Glycolipide synthetisiert, welche sich untereinander in der Anzahl der Galactosemoleküle unterscheiden. Dabei handelt es sich um ein Monoglycolipid mit 1 Galactosebaustein sowie ein Cluster-Glycolipide mit 3 Galactose-

resten. Die damit verbundene Erhöhung der Zuckerdichte in den Glycolipiden kann die Bindungsaffinität an den Rezeptoren erhöhen (Cluster-Effekt).^{189,190} Die Synthese der einzelnen Bausteine soll nun im Folgenden beschrieben werden.

2.10.2.2 Synthese der β -D-Galactoside

Für den Zuckerbaustein der Glycolipide wurde β -D-Galactose ausgewählt. Diese sollte über eine „click“-Reaktion an das Aglycon geknüpft werden. Folglich galt es verschiedene Azid- und Alkin-haltige Galactoside herzustellen. Als Ausgangsstoff wurde kommerziell erhältliche peracetylierte β -D-Galactose ausgewählt. Diese wurde einerseits mit Propargylalkohol und andererseits mit 2-Azidoethanol zu den β -D-Galactosiden **18** und **19** umgesetzt (siehe Abb. 31). Für diesen Zweck wurde 2-Azidoethanol aus 2-Bromethanol und Natriumazid nach einer Vorschrift von PFAENDLER und WEIMAR dargestellt.¹⁹¹

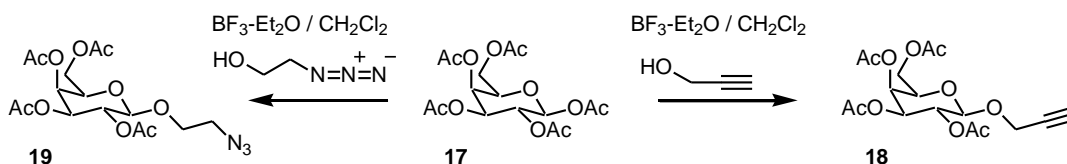


Abb.31: Synthese der Galactoside **18** und **19** durch Umsetzung peracetylierter Galactose mit verschiedenen Alkoholkomponenten. Die Kupplung mit Propargylalkohol liefert das alkinfunktionalisierte Galactosid **18**, die Umsetzung mit 2-Azidoethanol liefert das azidfunktionalisierte Galactosid **19**.

Die Darstellung der *O*-Glycoside erfolgte in Anlehnung an die von TAKANO beschriebene Vorschrift für die Darstellung von *O*-Allylglycosiden¹⁹² nach Abwandlung von SCHMIDT,¹⁹³ wobei ein anderer Alkohol (Aglycon) eingesetzt wurde (siehe Abb. 31). Die Reaktion wird mit Hilfe des Bortrifluoridetherat-Komplexes als LEWIS-Säure katalysiert.

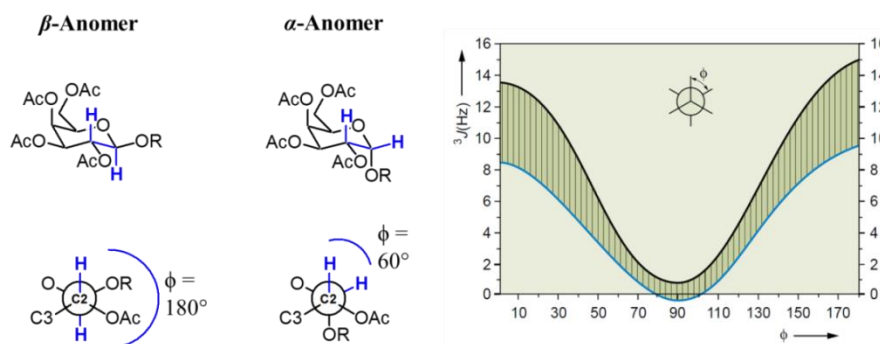


Abb.32: Sesselkonformation (obere Struktur) und NEWMAN-Projektion (untere Struktur) entlang der C2-C1-Achse für das β -Anomer und das α -Anomer der D-Galactose. Der Diederwinkel ϕ zwischen H1 und H2 ist blau gekennzeichnet. Das Diagramm zeigt die Abhängigkeit der vicinalen Kopplungskonstante 3J von ϕ (KARPLUS-Kurve)¹⁹⁵.

Für die angewendete Vorschrift wurde eine hohe Stereoselektivität beschrieben. So betrug nach SCHMIDT die Anomerenreinheit der 1,2-*trans*-Verbindung des Zuckerderivats 95%.¹⁹³ Da jedoch von ERDMANN eine geringere Stereoselektivität für die Glycosylierung von

siliziumhaltigen Alkoholen durch peracetylierte Zucker mit Bortrifluoridetherat-Komplex als Katalysator beschrieben wurde,¹⁹⁴ galt es die Galactoside **18** und **19** NMR-spektroskopisch nach der säulenchromatographischen Aufreinigung zu untersuchen.

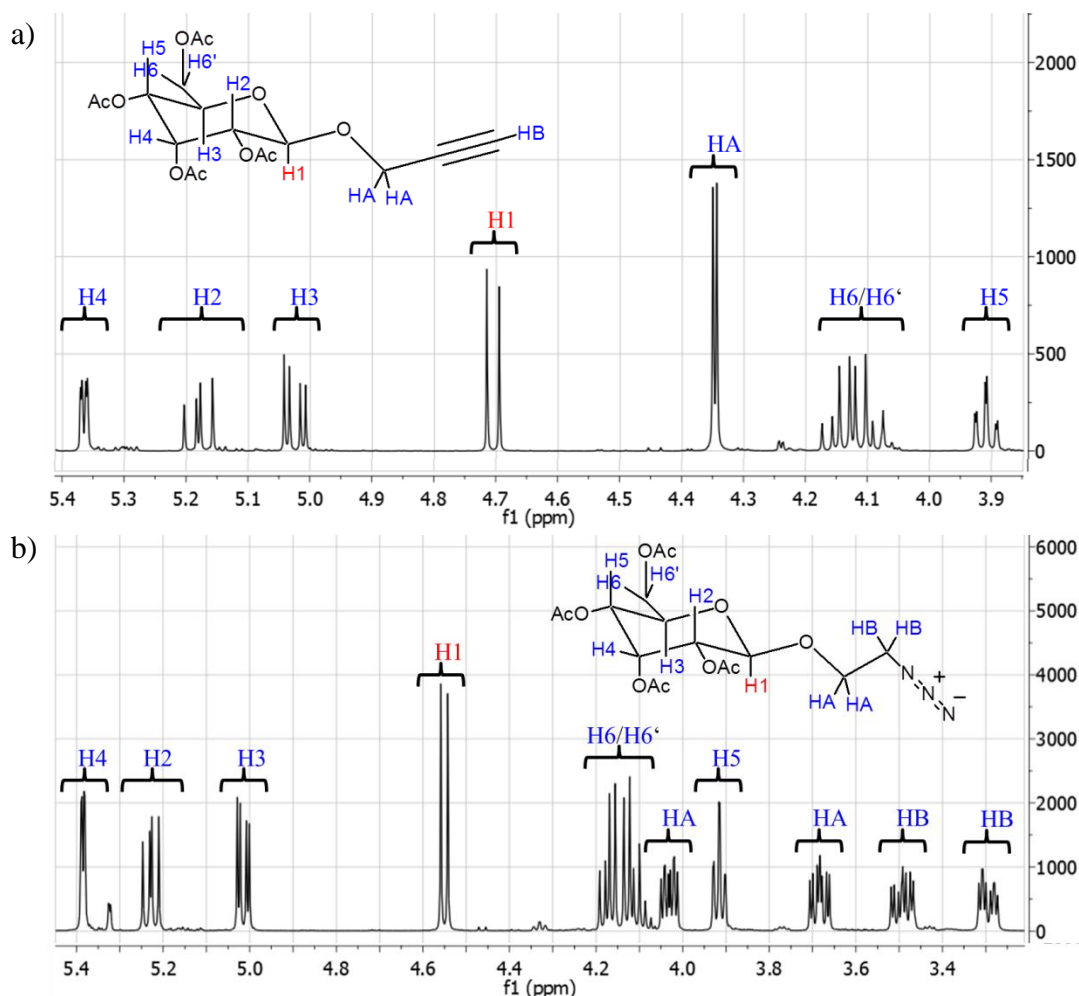


Abb.33: Ausschnitt aus dem ¹H-NMR Spektrum in CDCl₃ (500MHz, 27 °C) und Strukturformel der Galactoside **18** (a) und **19** (b). Die Kopplungskonstanten, welche für H1 bestimmt wurden, entsprechen denen der β-Anomere: Galactosid **18** ³J(H1,H2) = 7,9Hz, Galactosid **19** ³J(H1,H2) = 8,0Hz.

Bei den Galactosederivaten eignet sich die Analyse der Kopplungskonstante ³J zwischen dem H1-Atom am anomeren Zentrum mit dem H2-Atom des Zuckers. α- und β-Anomere besitzen unterschiedlichen Diederwinkel φ zwischen den beiden Protonen (siehe Abb.32). Dieser Winkel steht im Zusammenhang mit der Größe der vicinalen Kopplungskonstante, ein Zusammenhang, der 1959 als erstes von KARPLUS beschrieben wurde und in der KARPLUS-Kurve dargestellt ist (siehe Abb. 32).^{196,197} Demnach besitzen *trans*-diaxiale Wasserstoffatome eine große Kopplungskonstante (8-14Hz) und axial-äquatorial sowie äquatorial-äquatorial orientierte Wasserstoffatome eine kleine Kopplungskonstante (1-7 Hz). Das β-Anomer der synthetisierten Galactosederivate **18** und **19** besitzt *trans*-diaxial orientierte Wasserstoffatome H1 und H2, während diese beim α-Anomer axial-äquatorial angeordnet sind.

Zusätzlich bieten NOE-Differenzspektren eine gute Möglichkeit der Anomerenunterscheidung. Diese Methode findet vor allem bei Mannosiden Anwendung, da hier nur die axial-äquatoriale sowie äquatorial-äquatoriale Orientierung von H1 und H2 auftritt und somit der Unterschied der Kopplungskonstanten zu gering für eine eindeutige Unterscheidung im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ist.

Die $^1\text{H-NMR}$ -Untersuchungen der in dieser Arbeit synthetisierten Galactoside **18** und **19** zeigen Kopplungskonstanten in der für β -Anomere typischen Größenordnung: $^3J(\text{H1},\text{H2}) = 7,9\text{Hz}$ für **18** und $^3J(\text{H1},\text{H2}) = 8,0\text{Hz}$ für **19**. Die Spektren zeigen keine Signale, welche den α -Glycosiden zuzuordnen sind (siehe Abb.33). Somit kann eine Anomerenreinheit von $>95\%$ angenommen werden.

2.10.2.3 Synthese der TRIS-Derivate

Um die Cluster-Struktur in das Glycolipid zu integrieren, galt es eine Verzweigung einzuführen. Die Wahl fiel auf die TRIS-Base, welche drei identische Hydroxymethyl-Strukturen an einem C-Atom aufweist. Zu Beginn der Syntheseveruche galt es das BOC-geschützte Triazid **21b** zu synthetisieren (siehe Abb.34). Als Ausgangsstoff diente TRIS, eine Base, welche in der Biochemie als physiologischer Puffer Anwendung findet und preisgünstig in hoher Reinheit kommerziell erhältlich ist.

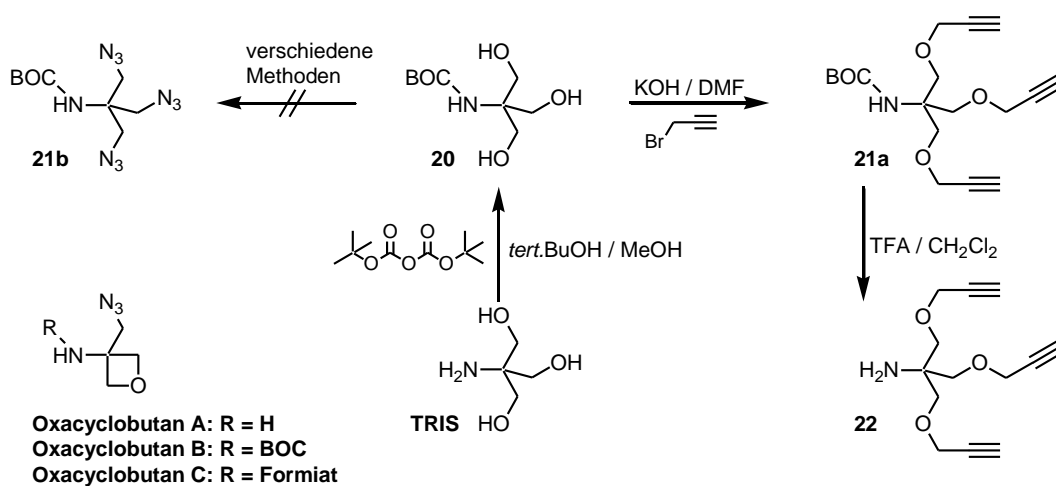


Abb. 34: Syntheschema für die Darstellung der substituierten TRIS-Derivate als Verzweigung für Cluster-Strukturen.

Zunächst wurde die Aminofunktion durch die Umsetzung mit Di-*tert.*-butyldicarbonat nach einer Vorschrift von SEGURA et al. BOC-geschützt.¹⁹⁸ Diese Reaktion läuft quantitativ ab. Anschließend galt es die Hydroxylfunktionen durch Mesylierung oder Tosylierung für Substitutionsreaktionen zu aktivieren und, durch nachfolgende Substitution mit Natriumazid, in das Triazid **21b** zu überführen. Für diese Reaktion wurde nach abgewandelten Vorschriften für

beschriebene Polyazidsynthesen gearbeitet,^{199,200} jedoch konnte das gewünschte Produkt **21b** auf diesem Wege nicht in isolierbaren Mengen synthetisiert werden. Auch die Azidsynthese aus Alkoholen mit Diphenylphosphorylazid und DBU als Hilfsbase in THF^{201,202} lieferte nicht das gewünschte Triazid. Stattdessen wurden immer die Oxacyclobutanderivate A-C (siehe Abb.34) massenspektrometrisch nachgewiesen. Es kommt bei der Reaktion folglich zum intramolekularen Ringschluss durch Substitutionsreaktion zwischen den aktivierten Estern und einer benachbarten Alkoholatfunktion. Des Weiteren zeigt das Auftreten des Oxacyclobutans C, welches zusätzlich durch ¹H- und ¹³C-NMR-spektroskopische Untersuchungen nachgewiesen werden konnte, dass die BOC-Schutzgruppe unter den gewählten Substitutionsbedingungen in DMF instabil ist und eine Formamidstruktur durch Umacylierung entsteht. Dieses Problem konnte durch Austausch des Lösungsmittels behoben werden. Die Unterdrückung des intramolekularen Ringschlusses stellte ein größeres Problem dar. Da bei der Aktivierung von Hydroxylfunktionen für Substitutionsreaktionen (z.B. durch Mesylierung, Tosylierung) Protonen frei werden, musste die Hilfsbase (z.B. TEA, Pyridin) in äquimolaren Mengen eingesetzt werden um die Spaltung der BOC-Schutzgruppe durch Protonenkatalyse zu verhindern. Die Hilfsbase ist, je nach Basizität, auch in der Lage einen gewissen Prozentsatz an Hydroxylfunktionen zu deprotonieren, wodurch der Ringschluss mit benachbarten aktivierten Estern begünstigt wird.

Demzufolge wurde die Synthesestrategie abgewandelt und das Trisalkin **21a** durch *O*-Alkylierung von **20** mit Propargylbromid nach einer Vorschrift von SEGURA et al. dargestellt.¹⁹⁸ Die Abspaltung der BOC-Schutzgruppe führt zum aminofunktionalisierten Trisalkin **22**, welches als Ersatz für das ursprünglich gewünschte Triazid **21b** in der nachfolgenden „click“-Reaktion bereitgestellt werden konnte.

2.10.2.4 Synthese der Polyethylenglycol-haltigen Linkerstrukturen

Als Ausgangsstoff für die Linkerstruktur diente Tetraethylenglycol, welches in das Azid **24** überführt wurde (siehe Abb.35). Ursprünglich sollte dafür die Synthesestrategie nach BOGDAN et al. über das Monochlorid **23c** Anwendung finden.²⁰³ Jedoch erwies sich schon der erste Syntheseschritt, die Monochlorierung von Tetraethylenglycol mit Thionylchlorid, als ungeeignet. Es kam zur Polymerisierung der Tetraethylenglycolketten und die in der Literatur angegebene Ausbeute von 31 % wurde nicht erreicht.

Als Alternative fand die Monomesylierung bzw. Monotosylierung von Tetraethylenglycol Anwendung. Dabei wurden verschiedene Ansatzverhältnisse von Tosylchlorid zu Tetraethylenglycol hinsichtlich der Ausbeute untersucht. Auch verschiedene Hilfsbasen (Pyridin,

DMAP und TEA) kamen zum Einsatz. Als effektivste Methode erwies sich die Tosylierung mit 0,7 Äquivalenten Tosylchlorid auf 1 Äquivalent Tetraethylenglycol und DMAP als Hilfsbase (siehe Tab. 8).

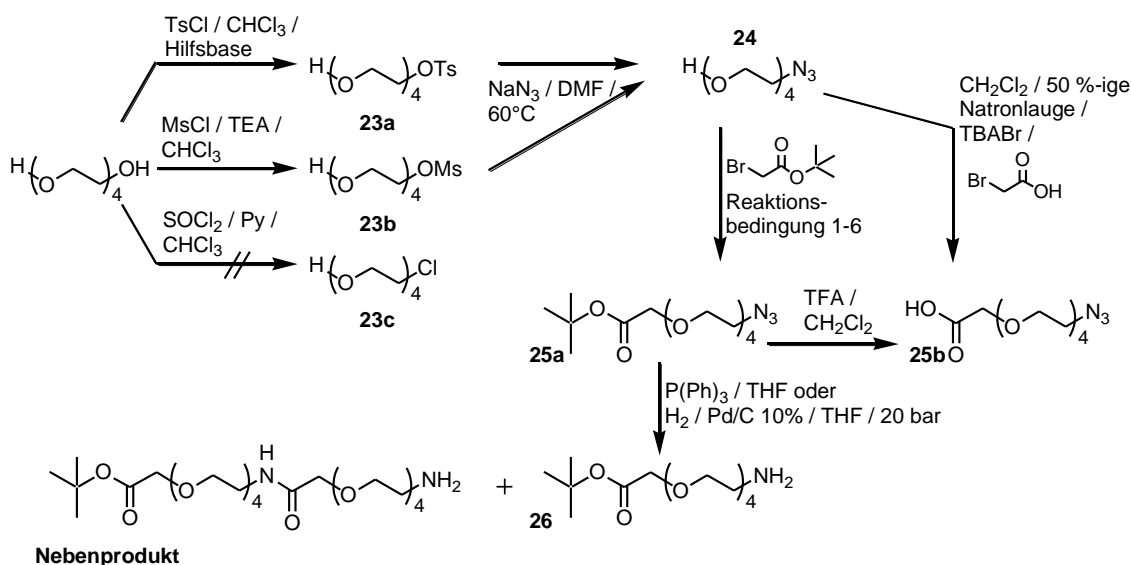


Abb. 35: Synthese der beiden Linkerstrukturen **25b** und **26** ausgehend von Tetraethylenglycol. Die Reaktionsbedingungen 1-6 sind in Tab. 9 erläutert.

Für die anschließende Substitutionsreaktion wurde das Mesylat **23b** bzw. Tosylat **23a** mit 3 Äquivalenten Natriumazid in DMF bei 60 °C umgesetzt. Die Substitutionsreaktion lieferte das Azid **24** in guten Ausbeuten.

Im weiteren Syntheseverlauf sollte die Carbonsäure **25b** über eine Ethersynthese zwischen dem Azidoalkohol **24** und α -Bromessigsäure dargestellt werden. Dafür wurde zunächst in einem Zweiphasensystem aus Methylenechlorid und 50%iger Natronlauge nach einer Vorschrift von BOGDAN et al. gearbeitet.²⁰³ Da diese Reaktion entgegen den Literaturangaben lediglich mit 10% Ausbeute einherging, wurden andere Verfahren zur Ethersynthese angewendet. Für diesen Zweck musste die Carbonsäurefunktion geschützt werden, wobei der säurelabile *tert.*-Butylester zum Einsatz kam.

Die Ethersynthese zur Darstellung der Verbindung **25a**, unter Verwendung von Natriumhydrid als Base für die Alkoholatbildung (Reaktionsbedin-

Tab. 8: Übersicht über die Ausbeuten verschiedener Wege zur Darstellung von Monotosylaten und Monomesylaten aus Tetraethylenglycol. Die angegebenen Äquivalente beziehen sich auf 1 Äquivalent Tetraethylenglycol.

<i>OH</i> -Aktivierungsagens (Äquivalente)	Hilfsbase (Äquivalente)	Ausbeute [%]
Tosylchlorid (0,7)	DMAP (0,7)	46
Tosylchlorid (0,7)	Pyridin (0,7)	35
Tosylchlorid (0,8)	TEA (0,8)	21
Tosylchlorid (0,7)	TEA (0,7)	39
Tosylchlorid (0,6)	TEA (0,6)	30
Mesylchlorid (0,7)	DMAP (0,7)	32

Tab. 9: Synthese der Verbindung **25a** durch *O*-Alkylierung des Tetraethylglycolderivats **24** mit α -Bromessigsäure-*tert.*-butylester unter Verwendung verschiedener Alkylierungsverfahren. Die angegebenen Äquivalente sind auf 1 Äquivalent der Verbindung **24** bezogen.

Reaktions- bedingung	α -Bromessigsäure- <i>tert.</i> -butylester	Base	Lösungsmittel	Additiv	Ausbeute [%]
1	1 äq	1 äq NaH	Toluol	TBAI	30
2	1 äq	1 äq NaH	THF	TBAI	20
3	1 äq	1 äq NaH	1,2-Dimet- oxyethan	TBAI	28
4 ^[a]	1 äq	1 äq K- <i>tert.</i> -butylat	THF	TBAI	35
5	1 äq	1,5 äq Ag ₂ O	CHCl ₃	KI	62
6	1,6 äq	1,5 äq Ag ₂ O	CHCl ₃	KI	80

[a] Synthesevorschrift nach SCHMIDT.¹⁹³

gungen 1-3, Tab. 9), erzielte, trotz Variation des Lösungsmittels, Ausbeuten unter 30 % (siehe Tab. 9). Auch die von SCHMIDT beschriebene Synthesevorschrift (Reaktionsbedingung 4, Tab. 9) zur Darstellung von Ethern mit THP-geschützten Ethylglycolderivaten¹⁹³ erzielte bei der Anwendung auf die Synthese der Verbindung **25a** lediglich Ausbeuten von 35 %. Bei dieser Vorschrift zur Ethersynthese kam Kalium-*tert.*-butylat als Base für die Alkoholatbildung zum Einsatz. Die von SCHMIDT angegebenen Ausbeuten zwischen 49 % und 95 % wurden nicht erreicht.

Die effektivsten Synthesewege der Testreihe für die Darstellung von **25a** beruhen auf der Ethersynthese mit Silberoxid (Reaktionsbedingungen 5/6, Tab. 9). Dabei wurde nach einer modifizierten Vorschrift von DIF et al. gearbeitet,³³³ wobei das Eisenoxid durch Silberoxid ersetzt und die eingesetzten Äquivalente abgewandelt wurden. Als Additiv kam Kaliumiodid zum Einsatz, wobei dieses den α -Bromessigsäureester in das reaktivere α -Iod-Derivat im Sinne einer *in-situ* FINKELSTEIN-Reaktion überführt.

Die Substanz **25a** bietet mehrere Möglichkeiten für weitere synthetische Variationen (siehe Abb. 35). So resultiert die saure Esterspaltung in der Bildung der freien Carbonsäure **25b**. Diese Verbindung stellt die erste Linkerstruktur dar und weist einerseits durch die Carboxylfunktion eine Verknüpfungsmöglichkeit mit aminofunktionalisierten Lipidankern und andererseits durch die Azidfunktion eine Verknüpfungsmöglichkeit mit alkinfunktionalisierten Zuckerderivaten auf. Die Überführung der Azidfunktion von Verbindung **25a** in die Aminfunktion von Verbindung **26** resultiert in einer zweiten Linkerstruktur, welche bei der Synthese des Cluster-Glycolipids Anwendung fand (Kap. 2.10.2.5).

Für die Synthese der Verbindung **26** wurden zwei verschiedene Darstellungswege von Aminen aus Aziden getestet. Zum einen kam die Reduktion nach STAUDINGER²⁰⁴ basierend auf einer Vorschrift von SCHULZE zum Einsatz.⁸⁰ Dabei wurde das Azid **26** mit Triphenyl-

phosphin in THF bei Raumtemperatur umgesetzt, und der Reaktionsansatz nach 24h mit Wasser versetzt. Dieser Syntheseweg lieferte lediglich eine Ausbeute von 36%. Grund hierfür war einerseits die unvollständige chromatographische Abtrennung des Nebenprodukts Triphenylphosphinoxid und andererseits die Entstehung von Dimerisierungsprodukten durch Umacylierungsreaktionen (Ester/Amid-Umwandlung). Letzteres stellte sich als größeres Problem heraus. So scheint die Esterfunktion der Verbindung **26** aktiv genug zu sein, um mit der Aminofunktion eines zweiten Moleküls ein Amid zu bilden. Das dimerisierte Nebenprodukt (siehe Abb.35) konnte massenspektrometrisch sowie durch ^1H - und ^{13}C -NMR-Untersuchungen nachgewiesen werden.

Es galt somit eine Reaktion zu finden, welche das gewünschte Amin **26** in kurzer Reaktionsdauer liefert. Eine Hydrierung bei 20 bar Wasserstoffatmosphäre am Palladium/Kohle-Katalysator erwies sich dabei als günstig. Hier konnte das gewünschte Produkt **26** bei einer Reaktionsdauer von einer Stunde in einer Ausbeute von 65% erhalten werden. Die gewählten Reaktionsbedingungen für die Hydrierung sind das Resultat eines intensiven Optimierungsprozesses, welcher im Rahmen der Synthese Anwendung fand, jedoch nicht näher erläutert werden soll.

2.10.2.5 Synthese der Glycolipide

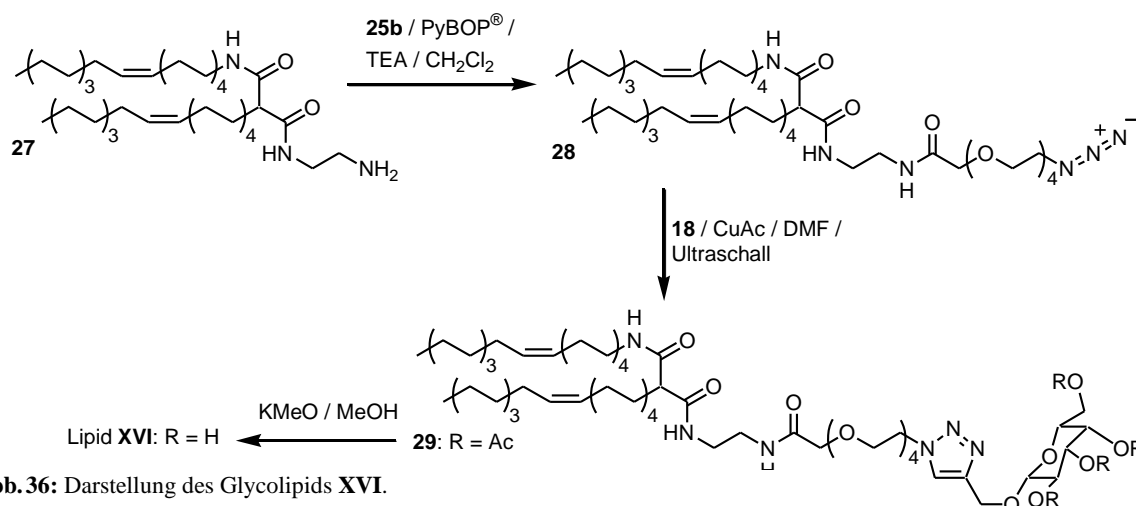


Abb. 36: Darstellung des Glycolipids XVI.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Glycolipide (**XVI** und **XVII**, siehe Abb.36 und Abb.37) synthetisiert. Das Aglycon besitzt als lipophile Grundstruktur das Malonamidgerüst der 1. Generation, welches mit einer hydrophilen, aus 4 Ethylenglycoleinheiten bestehenden Linkerstruktur verbunden ist. Die Galactosestruktur ist über einen Triazolring an den Linker gekoppelt. Die beiden Glycolipide unterscheiden sich sowohl im Linkeraufbau, als auch in der Anzahl der Zuckermoleküle. So weist das Lipid **XVI** nur 1 Galactosemolekül im

Kopfgruppenbereich auf (siehe Abb.36). Im Lipid **XVII** sind dagegen 3 Galactosereste eingebaut, welche in einer symmetrischen Cluster-Struktur angeordnet sind (siehe Abb. 37).

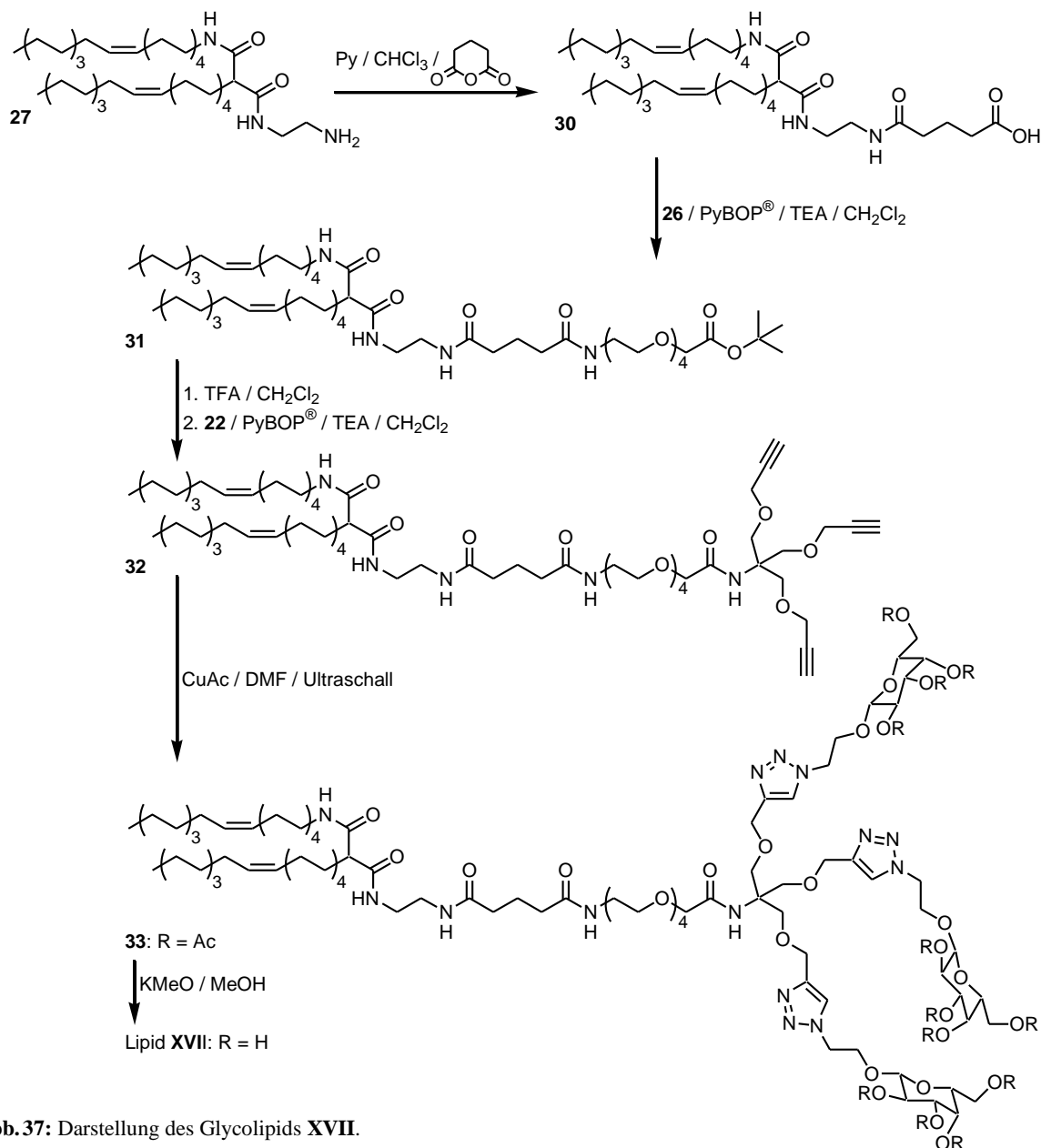


Abb.37: Darstellung des Glycolipids **XVII**.

Die Synthese basiert auf einem modularen Aufbau der Lipide. Ausgangsstoff ist das aminofunktionalisierte Lipid **27**, welches analog der Verbindung **16a** (siehe Kap. 2.10.1 Abb.30) unter Verwendung des Oleylmalonsäurediethylesters anstatt des Hexadecylmalonsäurediethylesters synthetisiert wurde. Durch Amidkupplung mit der Linkerstruktur **25b** konnte die Verbindung **28** als Vorstufe für die Kupplung mit dem Propargylalkohol-modifizierten Galactosederivat **18** synthetisiert werden. Die Kupplung des Zuckerbausteins fand über die Kupfer-(I)-acetat-vermittelte „click“-Reaktion^{205,206} zwischen Azid und Alkin statt. Der Mechanismus dieser schnellen und unter moderaten Reaktionsbedingungen ablaufenden 1,3-dipolaren Cycloaddition von Aziden und Alkinen zu 1,2,3-Triazolen wurde

von HUISGEN aufgeklärt.²⁰⁷ Die Verwendung von Kupfer-(I)-Salzen als Katalysator ermöglicht die regioselektive Darstellung der 1,4-substituierten Triazole.^{208,209} Die Kupfer-(I)-Salze können dabei entweder direkt dem Reaktionsansatz beigelegt werden^{153,210} oder *in-situ* aus Kupfer-(II)-Salzen und Ascorbinsäure durch Reduktion erzeugt werden.^{208,211} Im Rahmen dieser Arbeit wurde Kupfer-(I)-acetat als Katalysator einer Ultraschall-unterstützten „click“-Reaktion verwendet.¹⁵³ Unter diesen Bedingungen war die Reaktion nach einer Stunde abgeschlossen. Das Produkt **29** konnte mit einer Ausbeute von 54 % nach säulenchromatographischer Aufreinigung erhalten werden. Die anschließende Abspaltung der Acetatschutzgruppen der Galactoseeinheit verlief unter sehr milden Bedingungen und unter Verwendung von katalytischen Mengen Kaliummethanolat in trockenem Methanol quantitativ.^{212,213} Dabei wird die Acetatschutzgruppe durch Umesterung mit dem im großen Überschuss vorhandenen Methanol als Methylester abgespalten. Somit konnte das Glycolipid **XVI** ohne weitere Aufreinigung erhalten werden.

Für die Synthese des Cluster-Glycolipids **XVII** wurde die Verbindung **27** durch die Umsetzung mit Glutarsäureanhydrid in die Carbonsäure **30** überführt. Dabei handelt es sich um eine klassische Reaktion für die Funktionalisierung von Phosphatidylethanolaminen um eine Kupplung von Erkennungsstrukturen mit Amino- oder Hydroxylfunktionen zu ermöglichen.³⁹ Durch die anschließende Amidknüpfung zwischen Lipid **30** und der aminofunktionalisierten Verbindung **26** (Linkerstruktur) wurde Lipid **31** synthetisiert.

Die Spaltung der *tert.*-Butylesterfunktion in Verbindung **31** im sauren Milieu lieferte die freie Carboxylfunktion für die Amidkupplung mit dem TRIS-Derivat **22**. Die dadurch erhaltene Lipidstruktur **32** besitzt drei homologe, endständige Alkinfunktionen, welche für die „click“-Reaktion mit dem Acetat-geschützten Azidoethylgalactopyranosid **19** zur Reaktion gebracht werden können.

Unter Anpassung der stöchiometrischen Verhältnisse erfolgte die „click“-Reaktion unter den gleichen Bedingungen, wie sie für die Synthese der Verbindung **29** beschrieben sind. Die Verbindung **33** wurde dabei lediglich in einer Ausbeute von 18 % erhalten. Nach der chromatographischen Aufreinigung der Verbindung **33** wurden die Acetatschutzgruppen der Galactoseeinheiten unter sehr milden Bedingungen mit katalytischen Mengen Kaliummethanolat in trockenem Methanol gespalten und das Glycolipid **XVII** als Produkt erhalten.

Zusammenfassend ist es gelungen zwei Glycolipide als funktionalisierte Lipide für die Zelltargetierung zu synthetisieren. Für zukünftige Arbeiten auf dem Gebiet gilt es jedoch die „click“-Reaktion durch eine effektivere Methode zu ersetzen und somit die Ausbeute zu steigern, welche vor allem bei der Cluster-Struktur niedrig ausfiel.

Dennoch ist die hier entwickelte Linkerstruktur eine geeignete Verbindung für eine Vielzahl von Derivatisierungen. An dieser Stelle soll auf die Verbindung **31** hingewiesen werden. Durch Spaltung des Esters wird die Carbonsäurefunktion freigesetzt. Somit stehen vielfältige Variationsmöglichkeiten für die Funktionalisierung der Lipide zur Verfügung. Eine einfache Kupplung über eine Amidbindung ermöglicht die Anknüpfung einer Vielzahl von aminofunktionalisierten Erkennungsstrukturen, wie z.B. Peptide, für Targetierungszwecke.

3 Physiko-chemische Charakterisierungen

3.1 Vorbemerkung

Wie in der Einleitung bereits ausgeführt wurde, ist es für die Lipofektion von Bedeutung, Korrelationen zwischen Transfektionseffizienz und physiko-chemischen Eigenschaften sowohl der Lipide als auch der Lipoplexe zu ermitteln. Gelingt dies, könnte das in der Neuentwicklung von Cytofektinen aufwendige und kostenintensive *in-vitro* Screening von kationischen Lipidformulierungen an Zellkulturen reduziert werden. Das Verständnis der Komplexbildung zwischen DNA und Cytofektin ist hierfür ein wichtiger Schritt.

Im Rahmen der Arbeit wurde diese Thematik mit berücksichtigt. Um auch Daten für zukünftige Korrelationsversuche zur Verfügung zu stellen wurden die synthetisierten Cytofektine hinsichtlich der Phasenübergänge in wässrigen Dispersionen untersucht. Ausführlichere Analysen über die DNA-Komplexierung durch das Lipid **TO-VI** unter Anwendung einer Vielzahl von physiko-chemischen Methoden folgten.

3.2 Methoden

Im folgenden Abschnitt werden die Grundlagen der Messmethoden kurz dargestellt, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die Charakterisierung des Aggregationsverhaltens der Lipide in wässrigen Dispersionen sowie der Lipoplexbildung Anwendung fanden.

3.2.1 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Die DSC ist eine Methode zur quantitativen kalorimetrischen Untersuchung von temperatur-induzierten Zustandsänderungen und hat einen hohen Stellenwert in der Lipidanalytik eingenommen, da sie die Untersuchung von Phasenumwandlungen ermöglicht.^{35,214,215} Als Messprinzip werden die Unterschiede im Wärmestrom ($\Phi = dQ/dt$) der Probe zur Referenz in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen, wobei sowohl die Probe als auch die Referenz einer kontinuierlichen Heiz- oder Kühlrate unterzogen werden. Demzufolge wird der Wärmestromunterschied als Funktion der Temperatur aufgezeichnet. Als Ergebnis erfolgt in der Regel die Angabe der molaren Wärmekapazität bei konstantem Druck (C_p) als Funktion der Temperatur. Für einen Einblick in die genauere Funktionsweise soll hier auf die Fachliteratur verwiesen werden.²¹⁶

Die Verwendung hochempfindlicher Mikrokalorimeter, wie das von VALERIAN PLOTNIKOV entwickelte Gerät,²¹⁷ dessen Messprinzip mit der VP-DSC von *Microcal* auch im Rahmen dieser Arbeit Anwendung fand, ermöglicht die Vermessung mit geringen Probenmengen.

Im Folgenden sollen wichtige Parameter, welche aus dem Thermogramm abgeleitet werden können, kurz erläutert werden (Abb. 38): Unter Annahme eines Phasenübergangs 1. Ordnung lässt sich die Übergangsenthalpie ΔH bei konstantem Druck durch das Integral über C_p berechnen:

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} C_p(T) dT \quad (\text{Gl. 2}).$$

Eine weitere wichtige Kenngröße ist die Übergangstemperatur (T_m), welche über das Peakmaximum des Phasenübergangs ermittelt wird. Zusätzlich werden die Peakhalbwertsbreite ($T_{0,5}$), welche ein Maß für die Kooperativität des Übergangs darstellt, sowie die durch Tangentenkonstruktion ermittelte extrapolierte Anfangstemperatur (T_{on}) und extrapolierte Endtemperatur (T_{off}) für die Charakterisierung von Phasenübergängen verwendet.

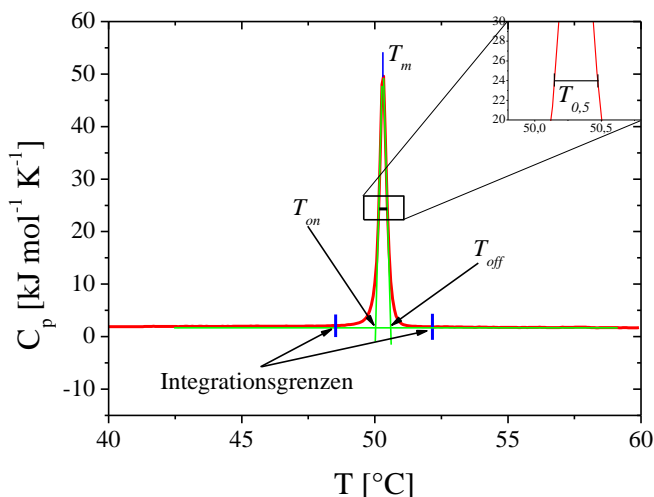


Abb. 38: Beispiel eines Wärmekapazitäts/Temperatur-Profiles als Ergebnis eines DSC-Experiments (DMPE 1 mg ml⁻¹ in HEPES-Puffer) mit wichtigen Kenngrößen: Das Peakmaximum (T_m) wird als Umwandlungstemperatur definiert. Die durch Integration ermittelte Peakfläche entspricht der Übergangsenthalpie (ΔH). Des Weiteren sind die Peakhalbwertsbreite ($T_{0,5}$) und die durch Tangentenkonstruktion ermittelte extrapolierte Anfangstemperatur (T_{on}) und extrapolierte Endtemperatur (T_{off}) dargestellt.

3.2.2 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Die ITC ist eine kalorimetrische Methode um Prozesswärmern in einem isothermen Titrationsprozess zu ermitteln. Das Messprinzip ähnelt dem der DSC, wobei Proben- und Referenzzelle getrennt temperiert werden. Während des Titrationsprozesses wird die Heizleistungsdifferenz zwischen beiden Zellen gemessen, wobei die Zellen bei einer konstanten Temperatur gehalten werden.²¹⁸ Die ITC findet breite Anwendung bei der Untersuchung von Makromolekül/Ligand-Wechselwirkungen, wie z.B. Wechselwirkungen von Peptiden oder Proteinen mit Liganden.²¹⁹⁻²²² Auch Interaktionen von Molekülen mit Lipidmembranen sind potenzielle Anwendungsgebiete dieser Methode. So sind Untersuchungen von Wechselwirkungen zwischen Lipidmembranen mit kationischen oder anti-

mikrobiellen Peptiden beschrieben.²²³⁻²²⁶ Auch Untersuchungen zu DNA/Cytofektin-Interaktionen sind bekannt^{76,77,227-234} und wurden auch im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

Die Anwendung der ITC ist jedoch auf Kurzzeitprozesse beschränkt (Zeitskala von Sekunden bis wenige Minuten). Langzeitprozesse (Zeitskala von mehreren Minuten bis Stunden) sind aufgrund des Instrumentendriffs nicht erfassbar.⁷⁷ Da der Komplexbildungsprozess in einem Zeitraum von wenigen Minuten abgeschlossen ist,^{77,235,236} eignet sich diese Methode für die Untersuchung der Lipoplexbildung.

Die ITC ermöglicht neben der Bestimmung des Äquivalenzpunkts der Komplexbildung eine direkte Ermittlung der Prozessenthalpie (ΔH) durch Integration der bei der Titration auftretenden Änderung des Wärmestroms (Φ).²³⁷ Des Weiteren ist die Bindungskonstante K durch Anwendung eines geeigneten Bindungsmodells aus der Titrationskurve bestimmbar.²²⁰ Dies ermöglicht eine ausführliche thermodynamische Beschreibung des Titrationsprozesses, da sowohl die GIBBS-Energie (ΔG) als auch die Entropie (ΔS) durch folgende Gleichungen zugänglich sind:²¹⁸

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (\text{Gl. 3}),$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (\text{Gl. 4}).$$

3.2.3 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die dynamische Lichtstreuung, auch als quasielastische Lichtstreuung bezeichnet,⁵² ist ein Verfahren zur Ermittlung von Partikelgrößen. Daneben erlaubt sie aufgrund der kurzen Registrierzeit die Bestimmung von Translations-, Rotations- und intramolekularen Molekülbewegungen.⁵² In Bezug auf die Zeitskala der Messmethode unterscheidet man folgende zwei Techniken: Photonen-Korrelationsspektroskopie (PCS) – Prozesse $> 10^{-6}$ s – und elektrooptische Filtermethoden – Prozesse $< 10^{-6}$ s.⁵²

Im Rahmen dieser Arbeit kam die PCS Methode zum Einsatz, eine Methode, bei der die Anzahl der von Partikeln gestreuten Photonen pro Zeiteinheit in einem bestimmten Streuwinkel (θ) gemessen wird. Die dabei detektierte zeitliche Intensitätsfluktuation wird in die Intensitätskorrelationsfunktion ($C(\tau)$, Gl.5) umgerechnet. Dabei wird die Photonenintensität des Streulichts zu einer bestimmten Zeit (t_i) für y aufeinander folgende Streulichtsignale mit der Photonenintensität zu einer späteren Zeit ($t_i + \tau$) multipliziert.^{52,238}

$$C(\tau) = \frac{1}{y} \sum_{i=1}^y I_s(t_i) \cdot I_s(t_i + \tau) = [1 + \gamma [g^{(1)}(\tau)]^2] \quad (\text{Gl. 5}).$$

Dabei ist γ die Gerätekonstante (Kohärenzfaktor) und $g^{(1)}(\tau)$ die normalisierte Zeit-Autokorrelationsfunktion 1. Ordnung. Deren zeitliches Abklingen wird vom Diffusionskoeffizient (D) der Partikel und der Länge des Streuvektors q ($q = (4\pi/\lambda)\sin(\theta/2)$) bestimmt.²³⁸

$$g^{(1)}(\tau) = \exp(-q^2 D\tau) \quad (\text{Gl. 6}).$$

Somit ist der Molekularradius (r) über die STOKE-EINSTEIN-Gleichung (Gl. 7) zugänglich:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (\text{Gl. 7}).$$

Die DLS ist eine Technik zur Ermittlung des hydrodynamischen Durchmessers/Radius.^{52,238, 239} Des Weiteren muss beachtet werden, dass die Theorie von sphärischen Partikeln in verdünnten Systemen ausgeht – ein Idealzustand, welcher üblicherweise nicht vorherrscht.^{238,239}

3.2.4 Zetapotential (ζ -Potential)

Die ζ -Potentialbestimmung ermöglicht es Aussagen über die Partikelladung zu treffen. Das ζ -Potential ist dabei das unter Einwirken eines elektrischen Feldes messbare Potential in der hydrodynamischen Gleitebene (Scherebene - S).²⁴⁰⁻²⁴² Als Messprinzip dient die elektro-phoretische Mobilität ($\mu_e = v/E$) der Partikel, wobei die Partikelgeschwindigkeit (v) mit einem Laserlichtstreuverfahren bestimmt wird. Ist der Teilchenradius sehr viel größer als die elektrische Doppelschicht, gilt die SMOLUCHOWSKI-Gleichung (Gl. 8) als Näherung zur Bestimmung des ζ -Potentials in einem definierten elektrischen Feld der Feldstärke E .²⁴²

$$\zeta = \frac{\eta v}{\varepsilon E} = \frac{\eta \mu_e}{\varepsilon} \quad (\text{Gl. 8}).$$

Das ζ -Potential spiegelt jedoch nicht die direkte Ladung an der Partikeloberfläche (NERNST-Potential Ψ_0) wieder, was in Abb.39a, eine Abbildung nach MÜLLER,²⁴¹ verdeutlicht wird. Darin ist die Abhängigkeit des Potentials (Ψ) an der Oberfläche eines Partikels in einer Elektrolytlösung als Funktion des Abstands von der Partikeloberfläche dargestellt. So wird bei der Bewegung des Partikels im elektrischen Feld ein Teil der nicht-fixierten diffusen Ionenhülle (GOUY-CHAPMAN-Schicht) abgeschert. Hier liegt die Scherebene (S), deren Potentialdifferenz zum Lösungsmittel (elektrisch neutral) dem ζ -Potential entspricht. Es ist jedoch nicht möglich die an der Partikeloberfläche fest fixierte Ionenhülle (STERN-Schicht) abzuscheren. Demzufolge ist mit diesem Versuchsaufbau die tatsächliche Oberflächenladung (Ψ_0) nicht zugänglich.

Des Weiteren gilt es zu beachten, dass die Ionenhülle eines Partikels und somit auch Ψ und ζ von der Art und Konzentration des Elektrolyts im Dispersionsmittel abhängt. Dies wird in Abb.39b verdeutlicht. Hier sind exemplarisch drei verschiedene Potentialverläufe an einer Partikeloberfläche ausgehend von dem gleichen Ψ_0 dargestellt. In allen drei Fällen werden verschiedene ζ -Potentiale ermittelt. So ist die Potentialdifferenz in der Scherebene (S) einmal positiv (rote Kurve), einmal negativ (blaue Kurve) und einmal nahezu Null (grüne Kurve).

Dies gilt es beim Vergleich von verschiedenen ζ -Potentialen zu beachten. So wurde im Rahmen dieser Arbeit für alle ζ -Potentialmessungen in HEPES-Puffer (pH 7,3) mit einer geringen Ionenstärke (20 mM) gemessen. Dies ermöglicht die Vergleichbarkeit der Messungen untereinander. Die geringe Ionenstärke verhindert ebenfalls einen zu starken Abfall von Ψ als Funktion vom Partikeloberflächenabstand, wobei die ermittelten Werte Rückschlüsse auf die tatsächliche Partikelladung zulassen (jedoch nicht auf den genauen Betrag).²⁴¹ Weiterhin weist HEPES lediglich eine schwache Wirkung als Peptisator auf, wogegen z.B. Phosphationen durch Absorptionseffekte an der Oberfläche positiv geladener Partikel ein negatives Ψ_S induzieren können.²⁴¹

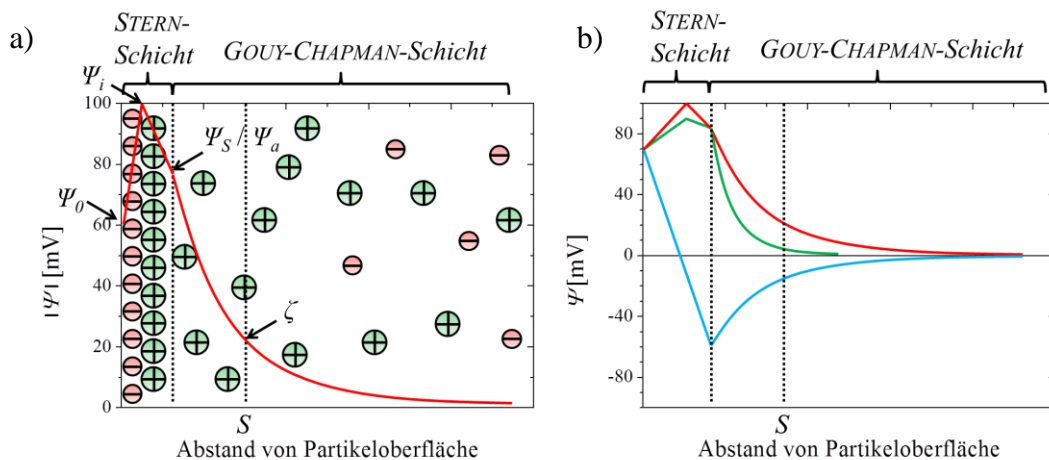


Abb. 39: a) Schematische Darstellung der Ionenverteilung in Abhängigkeit von der Entfernung zur Oberfläche eines Partikels in einem elektrolythaltigen Dispersionsmittel mit einwertigen Kationen und Anionen. Die STERN-Schicht wird in die innere HELMHOLTZ-Schicht (dehydratisierte fixierte Anionen) und die äußere HELMHOLTZ-Schicht (hydratisierte fixierte Kationen) unterteilt. Die rote Kurve stellt den Potentialverlauf als Funktion des Abstands von der Partikeloberfläche dar. Es sind verschiedene charakteristische Potentiale gekennzeichnet: Ψ_0 – NERNST-Potential = Potential an der Partikeloberfläche, Ψ_i – Potential an der inneren HELMHOLTZ-Schicht, Ψ_a – Potential an der äußeren HELMHOLTZ-Schicht, welches gleichzusetzen ist mit Ψ_S – Potential am Ende der STERN-Schicht, ζ – Potential an der Scherebene (S). b) Beispiel für drei mögliche Potentialverläufe (unterschiedliches ζ -Potential) ausgehend vom gleichen Oberflächenpotential Ψ_0 des Partikels in verschiedenen Dispersionsmedien. Für nähere Erläuterungen siehe Text.

3.2.5 RÖNTGEN-Untersuchungen – Streuung an teilgeordneten Strukturen

RÖNTGEN-Beugungsexperimente sind ein wichtiges Werkzeug zur Strukturaufklärung. So liefern Reflexe aus RÖNTGEN-Diffraktionsexperimenten wertvolle Strukturinformationen von Lipidaggregaten. Die Positionen der RÖNTGEN-Reflexe im Diffraktogramm werden durch die BRAGG-Gleichung (Gl. 9) beschrieben:⁵²

$$n\lambda = 2d \sin\theta_r \quad (\text{Gl. 9}),$$

wobei λ die Wellenlänge, d den Netzebenenabstand, θ_r den BRAGG-Winkel und n ganze Zahlen darstellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden SAXS-Experimente durchgeführt. Bei der SAXS-Technik werden die Beugungsreflexe im Kleinwinkelbereich ($2\theta_r \approx 0,5-5^\circ$, abhängig von λ)²⁴³

detektiert, wobei Aussagen über die Periodizität der Lipidaggregate getroffen werden können (Wiederholabstände). So lässt sich beispielsweise über das Reflexmuster die Art der lyotropen flüssigkristallinen Phase bestimmen (siehe Tab. 10). Eine weitere wichtige Methode für die Strukturaufklärung von Lipidaggregaten ist die WAXS-Technik. Bei dieser Methode werden die Beugungsreflexe im Weitwinkelbereich ($2\theta_r > 5^\circ$, abhängig von λ)²⁴³ betrachtet. Die Reflexe im Weitwinkelbereich geben Auskunft über die zweidimensionale laterale Anordnung der Alkylketten in den Lipidaggregaten.^{52,243}

Tab. 10: Beispiele für lyotrope flüssigkristalline Phasen, deren Abkürzungen sowie die dazugehörigen Reflexpositionen und Verhältnisse im RÖNTGEN-Diffraktogramm nach WINTER.^{52, 53} s gibt den reziproken Netzebenenabstand und d den Netzebenenabstand an; a ist die kubische Gitterkonstante; h , k und l sind die MILLER-Indizes.^{52,53}

Struktur	Abkürzung	Reflexposition	Verhältnisse der Reflexpositionen
lamellar	L	$s_h = \frac{h}{d}$	1, 2, 3, 4, 5,...
hexagonal	H _I	$s_{hk} = \frac{2}{\sqrt{3}a} \sqrt{h^2 + k^2 + hk}$	1, 3 ^{1/2} , 4 ^{1/2} , 7 ^{1/2} , 9 ^{1/2} , 12 ^{1/2} , 13 ^{1/2} ,...
primitiv-kubisch	Q _I ^P	$s_{hkl} = \frac{1}{a} \sqrt{h^2 + k^2 + l^2}$	1, 2 ^{1/2} , 3 ^{1/2} , 4 ^{1/2} , 5 ^{1/2} , 6 ^{1/2} , 8 ^{1/2} , 9 ^{1/2} ,...

3.3 Untersuchungen des Aggregationsverhaltens von wässrigen Dispersionen der Malonsäurediamide der 2. Generation

3.3.1 DSC-Untersuchungen der Lipide mit den Alkylkettenkombinationen OO, TO, HO, TT und HT

Mit Hilfe der DSC sollte der Alkylketten- und Kopfgruppeneinfluss auf die Phasenübergangstemperatur der Lipidaggregate in wässrigen Systemen untersucht werden. Dafür wurden Thermogramme in einem Temperaturbereich von 2-95 °C bei verschiedenen pH-Werten aufgenommen.

Um eine weitgehende Deprotonierung der Aminogruppen der Lipide zu gewährleisten, wurde ein pH-Wert von 10 (Carbonatpuffer) gewählt. Höhere pH-Werte wurden aus Stabilitätsgründen vermieden. Bei pH 10 bildeten die Lipide trübe Dispersionen ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$), wobei TEM-Untersuchungen auf die Ausbildung multilamellarer Lipidschichten oder ähnlicher Aggregate hinweisen (siehe Anhang Abb.S-19 bis Abb.S-22). Zwei Kopfgruppentypen bildeten eine Ausnahme: Lipide vom Kopfgruppentyp-**VI** bildeten klare Dispersionen, Lipide vom Kopfgruppentyp-**VIII** bildeten klare Dispersionen wobei sich Zeit- und Temperaturabhängig ein Präzipitat bildete.

Die DSC-Kurven von Dispersionen der Lipide vom Alkylkettentyp-**TT**, **-HT**, **-TO** und **-HO** in Carbonatpuffer pH 10 im Temperaturbereich von 2-95 °C sind in Abb.40, nach

Kopfgruppen und Alkylketten geordnet, dargestellt. Zunächst fällt auf, dass die Umwandlungen der Lipide mit Oleylketten deutlich breiter sind als die der homologen gesättigten Lipide. Diese geringere Kooperativität der Umwandlungen kommt durch das für die Synthese verwendete Oleylamin (tech.) zustande. Dadurch enthalten diese Lipide neben der deklarierten Alkylkettenkombination-**TO** oder **HO** andere Alkylkettenmuster als Verunreinigung (siehe Kap.2.5.1.1). Streng genommen handelt es sich bei diesen Lipiden nicht um definierte Substanzen, sondern um Substanzgemische, womit die geringere Kooperativität der Umwandlung erklärt werden kann.¹⁸⁰

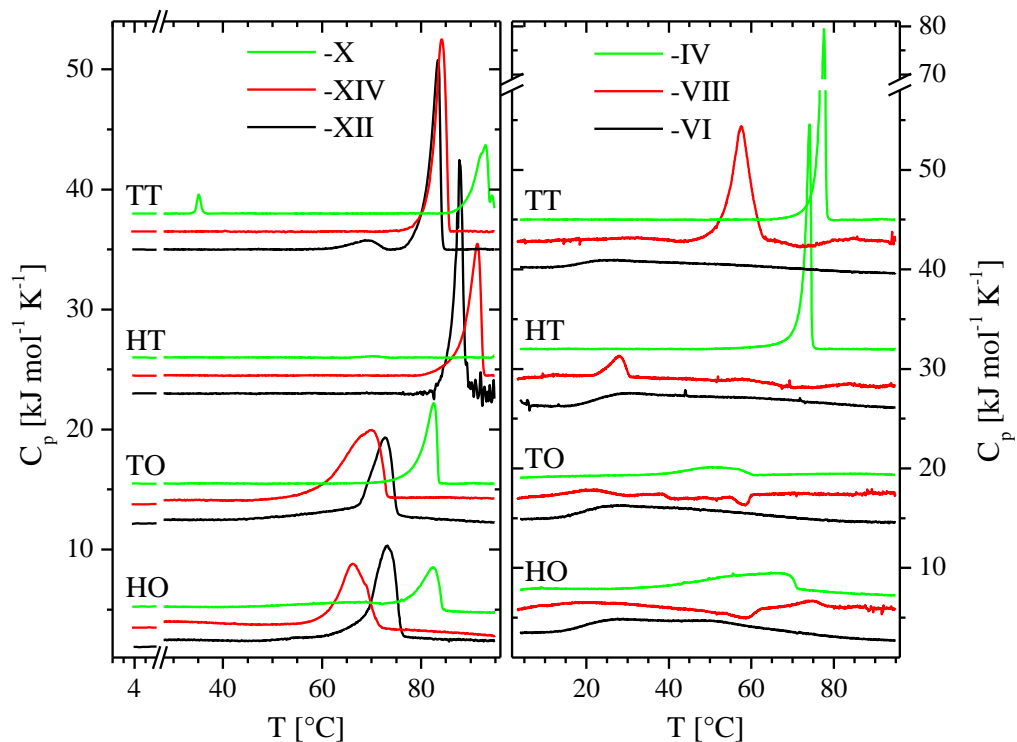


Abb. 40: DSC-Kurven der wässrigen Dispersionen der Lipide vom Alkylkettentyp-**TT**, **-HT**, **-TO** und **-HO** bei pH 10 ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$ in Carbonatpuffer). Linkes Diagramm: Lipide vom Ethylendiamin-Typ. Rechtes Diagramm: Lipide vom Tris(2-aminoethyl)amin-Typ. Die Kurven wurden aus Übersichtsgründen vertikal verschoben. Die Heizrate betrug 60 K h^{-1} , mit Ausnahme der Lipide vom Kopfgruppentyp-**VIII**, bei denen die Heizrate 20 K h^{-1} betrug.

Die Peakmaxima (T_m) und Umwandlungsenthalpien (ΔH) der in Abb.40 dargestellten DSC-Kurven sind in Tab.11 zusammengefasst. Weitere Umwandlungen niedrigerer Intensität, welche unterhalb der T_m -Werte liegen, wurden mit T_p bezeichnet.

Als erstes sollen die T_m -Werte für die Lipide vom Ethylendiamin-Typ verglichen werden. Für die kleinste Kopfgruppe (Typ-**X**) steigt die Umwandlungstemperatur von **TT-X** ($T_m = 92,9^{\circ}\text{C}$) nach **HT-X** ($T_m > 95^{\circ}\text{C}$) aufgrund der Verlängerung der Alkylkette um zwei Methyleneinheiten an. Im Gegensatz dazu senkt der Austausch der Amid-gebundenen Tetradeckylkette in **TT-X** und **HT-X** gegen eine Oleylkette die Umwandlungstemperatur auf annähernd vergleichbare Werte ($T_m(\text{TO-X}) = 82,5^{\circ}\text{C}$; $T_m(\text{HO-X}) = 82,6^{\circ}\text{C}$). Der gleiche

Tab. 11: Die Hauptumwandlungs- (T_m) und Vorumwandelungstemperaturen (T_p) sowie die dazugehörigen Enthalpien (ΔH) für die DSC-Messungen der Lipide der **TT**-, **HT**-, **TO**- und **HO**-Reihe in Carbonatpuffer (pH 10, $c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$) im Temperaturbereich von 2-95 °C unter Verwendung einer Heizrate von 60 K h^{-1} .

Lipid	Typ	Anzahl der Lysine	Anzahl primärer Aminogruppen	T_p [°C] (ΔH [kJ mol ⁻¹])	T_m [°C] (ΔH [kJ mol ⁻¹])
TT-X	Ethylendiamin-Typ	1	2	35,1 (1,7)	92,9 (20,0)
TT-XIV		2	3	-	84,2 (47,9)
TT-XII		3	4	69,4 (2,8)	83,4 (42,4)
HT-X		1	2	69,9 (0,6)	[a]
HT-XIV		2	3	-	91,4 (41,3)
HT-XII		3	4	-	86,9 (43,7)
TO-X		1	2	-	82,5 (24,2)
TO-XIV		2	3	-	70,0 (51,7)
TO-XII		3	4	-	72,7 (29,8)
HO-X		1	2	-	82,6 (16,3)
HO-XIV		2	3	-	66,2 (34,6)
HO-XII		3	4	-	73,2 (40,8)
TT-IV	Tris(2-aminoethyl)amin-Typ	1	3	-	77,6 (52,9)
TT-VIII		3	5	-	57,4 (59,1) ^[b]
TT-VI		4	6	-	-
HT-IV		1	3	-	74,1 (44,1)
HT-VIII		3	5	-	27,6 (9,2) ^[b]
HT-VI		4	6	-	-
TO-IV		1	3	-	50,0 (11,8)
TO-VIII		3	5	[c]	[c]
TO-VI		4	6	-	-
HO-IV		1	3	-	67,9 (33,2)
HO-VIII		3	5	[c]	[c]
HO-VI		4	6	-	-

[a] Der Phasenübergang beginnt am Ende des beobachteten Temperaturbereichs und konnte somit nicht bestimmt werden.

[b] Die Heizrate betrug 20 K h^{-1} .

[c] Die DSC-Daten waren aufgrund nicht-reproduzierbarer DSC-Kurven nicht ermittelbar.

Effekt der Alkylkettenvariation auf das thermotrope Verhalten ist für den um zwei Lysine vergrößerten Kopfgruppentyp-**XII** zu beobachten. Es gilt die Reihenfolge: $T_m(\text{HT-XII}) > T_m(\text{TT-XII}) > T_m(\text{TO-XII}) \approx T_m(\text{HO-XII})$. Für den um nur ein Lysin erweiterten Kopfgruppentyp-**XIV** gilt die Sequenz mit einer Abweichung: $T_m(\text{HT-XIV}) > T_m(\text{TT-XIV}) > T_m(\text{TO-XIV}) > T_m(\text{HO-XIV})$. Hier liegen die T_m -Werte für **TO-XIV** und **HO-XIV** nicht auf dem gleichen Niveau.

Vergleicht man die Phasenübergänge der Lipide mit unterschiedlichen Kopfgruppen bei gleichbleibender Alkylkettenkombination (**HT**, **TT**, **HO**, **TO**), so ist ersichtlich, dass durch die Kopfgruppenvergrößerung um einen Lysinbaustein (**X**→**XIV**) der T_m -Wert um ungefähr 10K gesenkt wird. Bei Einführung eines weiteren Lysinbausteins (**XIV**→**XII**) bleibt der T_m -Wert annähernd konstant (Ausnahme: Alkylkettenkombination-**HO**).

Die Auswertung der Alkylketten- und Kopfgruppen-bedingten Änderungen des thermotropen Verhaltens der Lipide vom Tris(2-aminoethyl)amin-Typ in wässriger Dispersion bei pH 10 zeigt eindeutige Abweichungen zu den Lipiden des Ethylendiamin-Typs. Betrachtet man die Abhängigkeit der T_m -Werte der Lipide vom Kopfgruppentyp-**IV** und -**VIII** von der Alkylkettenvariation, so zeigt sich, dass ausgehend von den **TT**-Lipiden ein Alkylkettenaustausch durch Hexadecyl- und/oder Oleylketten die Temperatur der Hauptumwandlung senkt. Es gilt: $T_m(\mathbf{TT-IV}) > T_m(\mathbf{HT-IV}) > T_m(\mathbf{HO-IV}) > T_m(\mathbf{TO-IV})$ und $T_m(\mathbf{TT-VIII}) > T_m(\mathbf{HT-VIII})$. Die Kopfgruppenabhängigkeit der Lage des Phasenübergangs ist mit den Lipiden vom Ethylendiamin-Typ vergleichbar. So senkt die Einführung von zwei Lysinen die Phasenübergangstemperatur: $T_m(\mathbf{TT-IV}) > T_m(\mathbf{TT-VIII})$ und $T_m(\mathbf{HT-IV}) > T_m(\mathbf{HT-VIII})$.

Die Lipide **TT-VIII** und **HT-VIII** zeigten nur reproduzierbare DSC-Kurven bei einer Heizrate von 20 K h⁻¹. Bei einer Heizrate von 60 K h⁻¹ wurde ein nicht-reproduzierbarer langsamer Abfall der Wärmekapazität C_p über einen weiten Temperaturbereich, gefolgt von einem sprunghaften Anstieg von C_p , beobachtet (siehe Anhang Abb.S-1 und Abb.S-2). Die Lipide **TO-VIII** und **HO-VIII** zeigten keine reproduzierbaren DSC-Kurven (siehe Anhang Abb.S-3 und Abb.S-4). Eine experimentell untermauerte Erklärung für diese Beobachtung ist noch nicht vorhanden, jedoch scheint das Dispersionssystem nicht im Gleichgewicht zu stehen. Vermutlich werden unter den experimentellen Bedingungen metastabile Zustände gebildet, deren Umwandlung die beobachteten nicht-reproduzierbaren C_p -Änderungen verursacht. Ein Indiz für diese These sind Temperatur- und Zeit-abhängige DLS-Messungen, welche starke Präzipitationsvorgänge ausgehend von klaren Lipiddispersionen zeigten (Daten nicht gezeigt).

Die Lipide mit dem Kopfgruppentyp-**VI** zeigten in DSC-Untersuchungen bei pH 10 keinen Phasenübergang im Temperaturbereich von 2-95 °C. Es ist lediglich eine sehr breite Umwandlung im Bereich von 15-80 °C zu erkennen, deren Ursache nicht geklärt ist. DLS-Untersuchungen zeigten, dass diese Lipide unter den gegebenen Bedingungen sehr kleine Aggregate (Mizellen) bilden. Auf die Besonderheit dieser Lipide wird im Folgenden noch detailliert eingegangen (siehe Kap. 3.4.1).

Zusammenfassend sind bei den Malonamiden der 2. Generation folgende Strukturabhängigkeiten auf die Phasenübergangstemperatur bei pH 10 ermittelt worden:

1) Ausgehend von den Lipiden mit zwei Tetradecylketten (**TT**) wurde durch das Einführen von zwei zusätzlichen Methyleneinheiten in die Malonsäure-gebundene Alkylkette (**TT**→**HT**) die Phasenübergangstemperatur im Falle der Malonamide vom Ethylendiamin-Typ erhöht und im Falle der Malonamide vom Tris(2-aminoethyl)amin-Typ gesenkt. Während die 1. Beobachtung ($T_m \uparrow$) im Vergleich zu äquivalenten Alkylkettenvariationen bei Phospholipiden erwartet wurde,²⁴⁴ lässt sich die 2. Beobachtung ($T_m \downarrow$) für den Austausch einer Tetradecylkette gegen eine Hexadecylkette schwerer erklären. Vermutlich sind Kopfgruppen-abhängige Veränderungen in der Molekülkonformation und eine damit einhergehende Veränderungen in den Packungseigenschaften der Lipide dafür verantwortlich. Es sind jedoch weitere physiko-chemische Untersuchungen, wie z.B. RÖNTGEN-Beugungsuntersuchungen, nötig um diese Vermutung zu unterstützen.

2) Der Austausch der Lysin-gebundenen Tetradecylkette gegen eine Oleylkette (**TT**→**TO** und **HT**→**HO**) senkt die Phasenübergangstemperatur sowohl bei den Lipiden vom Ethylendiamin-Typ als auch vom Tris(2-aminoethyl)amin-Typ. Diese Beobachtung stimmt mit analogen Alkylketteneffekten bei Phospholipiden überein: *cis*-Doppelbindungen reduzieren die effektive Kettenlänge und stören die Kettenanordnung in den Lipidaggregaten, was letztlich in einer Erniedrigung der Phasenübergangstemperatur resultiert.²⁴⁴

3) Des Weiteren wurden klare Einflüsse der Kopfgruppengröße auf das thermotrope Verhalten der Lipide in wässriger Dispersion ermittelt. So resultiert die Einführung von ein oder zwei Lysinmolekülen bei gleichbleibendem Alkylierungsmuster in einer Verschiebung der T_m -Werte zu niedrigeren Temperaturen. Der Kopfgruppentyp-**X** stellt die kleinste Kopfgruppe dar, wodurch eine zylinderartige Lipidform entsteht – eine Struktur, welche eine dichte Lipidpackung erlaubt. Die Kopfgruppenerweiterung durch Lysin führt aufgrund der Volumenvergrößerung des polaren Lipidteils zu einer konischen Lipidform. Daraus resultiert eine Senkung der Phasenübergangstemperatur aufgrund der Distorsion der Lipidpackung. Des Weiteren kann eine Erhöhung der Kopfgruppenhydratation durch die zusätzlichen hydrophilen Lysineinheiten angenommen werden. Der Anstieg des Solvatationsgrads im Kopfgruppenbereich ist mit Änderungen der Eigenschaften der Lipiddoppelschicht/Solvent-Grenzschicht verbunden und beeinflusst somit auch das Phasenübergangsverhalten.²⁴⁵

Aus den Umwandlungstemperaturen der Lipide vom Kopfgruppentyp-**X**, **-XII**, **-XIV** und **-IV** lassen sich noch weitere Rückschlüsse ziehen: alle T_m -Werte liegen oberhalb von 59 °C. Unter Berücksichtigung der Anwesenheit von Oleyl- und Tetradecylketten liegen diese Werte in

sehr hohen Temperaturbereichen. Vergleicht man die T_m -Werte der Malonamide mit Glycerol-basierten Phospholipiden mit vergleichbaren Alkylkettenkombinationen, so weisen die betrachteten Malonamide deutlich höhere Werte auf (vergleiche Tab.11 und Tab.12). Zusätzlich zeigt eine in der Literatur beschriebene Klasse Aminosäure-basierter kationischer Lipide (Lysin als Kopfgruppe, zwei Tetradecylketten als lipophilen Molekülteil und Glutamat als Rückgrat) deutlich niedrigere Phasenübergänge (T_m 25,5-41 °C) als die Lipide **TT-X**, **TT-XII**, **TT-XIV** und **TT-IV**.²⁵³ Die hohen T_m -Werte der hier betrachteten Malonamide sind ein Indiz dafür, dass zusätzlich zu den VAN-DER-WAALS-Kräften zwischen den Alkylketten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Lipiden im Bereich der Lipidkopfgruppen und des Rückgrates vorliegen.^{245,254-259}

Tab. 12: Phasenübergangstemperaturen (T_m) und, wenn angegeben, Enthalpiewerte (ΔH) ausgewählter Phospholipide mit Glycerol-Rückgrat in verschiedenen Dispersionsmitteln (wassergesättigtes Milieu).^{35,246-252}

<i>Lipid</i>	<i>Medium</i>	T_m [°C] (ΔH [kJ mol ⁻¹])
DMPC	H ₂ O, pH 7	24,0
DMPC	H ₂ O, pH 12	23,63
DMPE	H ₂ O, pH 7	51,3
DMPE	H ₂ O, pH 12	21,5
DM-TAP	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (50 mM), pH 7,4	38,4
MPPC	H ₂ O	34,0 (33,8)
PMPC	H ₂ O	26,0 (32,6)
MOPC	H ₂ O, Ethylenglycol	-19,0 (20,1)
OMPC	H ₂ O, Ethylenglycol	-27,0
POPC	H ₂ O, Ethylenglycol	-4,6 (21,3)
OPPC	H ₂ O, Ethylenglycol	-7,9
POPE	nicht angegeben	25,0
OPPE	nicht angegeben	-8,0

Des Weiteren wird diese These durch die hohe Umwandlungsenthalpie der Hauptumwandlung der Lipide **TT-XIV**, **TT-XII**, **TT-IV** und **TT-VIII** unterstützt (42,4-59,1 kJ mol⁻¹, siehe Tab. 11). Diese Werte übertreffen den Bereich für die L _{α} /L _{β} -Phasenübergangsenthalpien der 1,2-Diacyl-*sn*-glycero-3-phospholipide und Glycolipide mit vergleichbaren Alkylkettenlängen (publizierte ΔH -Werte liegen im Bereich von \approx 21-25 kJ mol⁻¹).²⁴⁸ Des Weiteren wurden hohe Übergangsenthalpien auch für die Lipide **HT-XIV**, **TO-XIV**, **HO-XIV**, **HT-XII**, **HO-XII**, **HT-IV** und **HO-IV** ermittelt (siehe Tab.11). Der Enthalpieänderung, welche bei Umwandlungen zwischen lamellaren Phasen auftritt, liegen folgende Prozesse zugrunde.^{244,245}

- 1) Konformationelle Änderungen im Bereich der Alkylketten und somit Änderungen der VAN-DER-WAALS-Interaktionen, sowie
- 2) Wärmebeiträge durch Kopfgruppenhydratation und dem Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen und anderer intra- sowie intermolekularer Wechselwirkungen im Bereich der Kopfgruppen- und/oder Lipidrückgratregion.

Zum bisherigen Zeitpunkt liegt kein weiterer Beweis für die Annahme der dichteren Kettenpackung mit abnehmender Kopfgröße sowie der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Lipiden vor. Hier sind ergänzende Experimente basierend auf RÖNTGEN-Beugung oder Infrarotspektroskopie nötig. SAXS-Experimente geben jedoch Hinweise, dass es sich bei den Phasenübergängen der Lipide vom Kopfgruppentyp-**X**, **-XII**, **-XIV** und **-IV** um Umwandlungen zwischen verschiedenen lamellaren Phasen handelt (L_{α}/L_{β}).²⁶⁰

Die DSC-Heizkurven von Lipiddispersionen der Malonamide mit zwei Oleylketten (**OO**-Reihe) in Carbonatpuffer pH 10 sind in Abb.41 dargestellt. Betrachtet man zunächst die Lipide vom Ethylendiamin-Typ (**OO-X**, **OO-XIV** und **OO-XII**), so zeigen die DSC-Kurven mindestens zwei breite Umwandlungen von geringer Intensität im betrachteten Temperaturbereich von 2-95 °C. Demgegenüber zeigen die Dispersionen der Lipide vom Tris(2-aminoethyl)amin-Typ entweder keine Umwandlung (**OO-IV**) oder sehr breite Umwandlungen von geringer Kooperativität (**OO-VIII** und **OO-VI**). Das thermotrope Verhalten aller Lipide der **OO**-Reihe in wässriger Dispersion bei pH 10 lässt sich wie folgt erklären: Die Abwesenheit von detektierbaren Phasenumwandlungen in den DSC-Kurven kann auf das Vorhandensein von zwei ungesättigten Alkylketten zurückgeführt werden, welche die Phasenübergangstemperatur stark senken, so dass diese unterhalb des betrachteten Temperaturbereichs liegt.²⁴⁴

Das Auftreten von sehr breiten bzw. mehreren Umwandlungen geringer Intensität beruht auf der Tatsache, dass ein gewisser Anteil an Lipiden mit gesättigten Alkylketten in den Lipiden der **OO**-Reihe vorhanden ist, wodurch Mischungs- und Phasenseparationseffekte auftreten.^{243,261} Grund für diese „Alkylkettenverunreinigung“ ist die Verwendung von Oleylamin (tech.) und Oleylalkohol (tech.) in der Synthese (siehe Kap. 3.3.3).

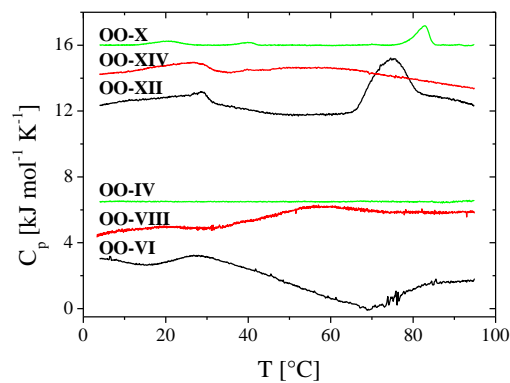


Abb. 41: DSC-Kurven der wässrigen Dispersionen der Lipide vom Alkylkettentyp-**OO** bei pH 10 ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$ in Carbonatpuffer). Die Kurven wurden aus Übersichtsgründen vertikal verschoben. Die Heizrate betrug 60 K h^{-1} .

Um Aussagen über das thermotrope Verhalten der Lipide im vollständig protonierten Zustand treffen zu können, wurden DSC-Untersuchungen bei pH 5 (Acetatpuffer) durchgeführt. Vergleichbare pH-Werte werden in späten Endosomen von Zellen erreicht.^{70,262}

Die Dispersionen der untersuchten Malonamide (1 mg ml⁻¹) in Acetatpuffer pH 5 waren klar, was auf die Bildung von Mizellen oder sehr kleinen Lipidaggregaten hinweist. Diese Annahme konnte durch DLS-Messungen unterstützt werden (siehe Tab.13). Die Radien der kleinsten ermittelten Partikelgrößenpopulation liegen für alle aufgeführten Lipiddispersionen (TO-Reihe) in Acetatpuffer pH 5 unter 4 nm. Diese geringe Größe der Lipidaggregate deutet auf Mizellen hin. Die kleinste Partikelgrößenpopulation in der massengewichteten Größenverteilung, welche für polydisperse Größenverteilungen repräsentativer ist,²⁶³ macht über 99 % der Gesamtmenge der Partikel aus. Dies zeigt, dass diese kleinen Strukturen die vorherrschende Aggregatstruktur in den Lipiddispersionen darstellen.

Auch das thermotrope Verhalten der Dispersionen bei pH 5 im DSC-Experiment gibt einen Hinweis auf Veränderungen im Aggregationsverhalten. Analog zu den Lipiden vom Kopfgruppentyp-**VI**, welche bei pH 10 Mizellen bilden (siehe Kap. 3.4.1), zeigen die Lipide der TO-Reihe bei pH 5 keine Phasenumwandlung im Temperaturbereich von 2-95 °C (siehe Abb.42). Erste Annahmen, dass dies nur bei den Lipidsystemen mit ungesättigten Kohlenwasserstoffketten zutrifft, konnten durch weiterführende DSC-Messungen der Lipide **TT/HT-IV**, **TT/HT-VIII**, **TT/HT-XIV**, **TT/HT-XII** und **TT/HT-X** widerlegt werden. Auch diese Lipide zeigten, mit Ausnahme von **TT-X** und **HT-X**, keinen Phasenübergang in Acetatpuffer pH 5 (siehe Anhang Abb.S-5 und Abb.S-6).

Zusammenfassend scheint bei den Malonamiden der 2. Generation eine vollständige Protonierung der Kopfgruppe, durch Verringerung des pH-Werts (pH 10→pH 5), mit einer

Tab.13: Massengewichtete und intensitätsgewichtete Partikelgrößenpopulationen (Modus der Verteilung angegeben als Radius r sowie deren Häufigkeit angegeben als Peakfläche A in %) für Lipiddispersionen ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$) von Lipiden der TO-Reihe in Acetatpuffer pH 5 bei 25 °C. Es sind die 2 Populationen mit den kleinsten Partikelgrößen berücksichtigt. Größere Partikelpopulationen, deren Häufigkeit sich aus der Differenz der summierten Häufigkeiten aus Population 1 und 2 der Tabelle zu 100 % ergibt, wurden nicht mit in die Tabelle übernommen.

Lipid	Population 1: r [nm] (A [%])	Population 2: r [nm] (A [%])	Wichtung der Verteilung
TO-IV	3,7 (53,1)	77,1 (32,3)	Intensität
	3,4 (99,9)	90,8 (0,03)	Masse
TO-VI	2,7 (22,8)	42,1 (70,7)	Intensität
	2,6 (99,8)	37,6 (0,1)	Masse
TO-VIII	3,4 (50,6)	66,2 (21,4)	Intensität
	3,0 (99,97)	59,9 (0,01)	Masse
TO-X	3,6 (35,5)	421 (42,9)	Intensität
	2,7 (99,7)	999 (0,2)	Masse
TO-XII	3,8 (31,9)	81,1 (34,0)	Intensität
	3,2 (99,8)	92,3 (0,1)	Masse
TO-XIV	3,9 (76,1)	55,5 (14,1)	Intensität
	3,5 (99,98)	51,3 (0,01)	Masse

Verschiebung des Phasenübergangs zu niedrigeren Temperaturen einherzugehen. Dieser Effekt ist so stark, dass bei pH 5 kein Phasenübergang im betrachteten Temperaturbereich von 2-95 °C detektiert wurde. Grund für dieses Phänomen ist die Vergrößerung der Lipidkopfgruppe durch Protonierung der Aminofunktionen und die damit einhergehende Vergrößerung der Solvathülle. Diese Veränderung im Molekül geht auch mit einer Veränderung des Aggregationsverhaltens einher, wobei die Bildung mizellarer Aggregate vermutet werden kann.

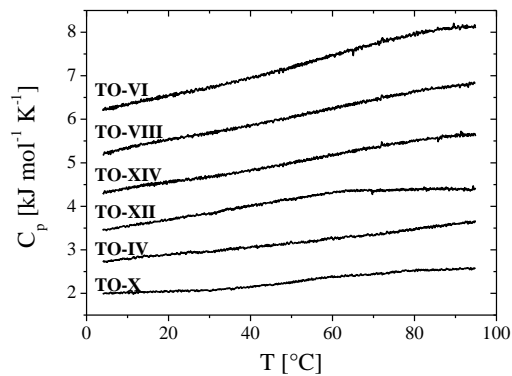


Abb. 42: DSC-Kurven der wässrigen Dispersionen der Lipide vom Alkylkettentyp-TO bei pH 5 ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$ in Acetatpuffer). Die Kurven wurden aus Übersichtsgründen vertikal verschoben. Die Heizrate betrug 60 K h^{-1} .

Bei den DSC-Experimenten bei pH 7,3 traten häufig Probleme hinsichtlich der Reproduzierbarkeit auf (aufeinanderfolgende Heizkurven waren nicht äquivalent, siehe Beispiel Abb. S-7). Offensichtlich bilden sich aufgrund des Protonierungsgrads bei pH 7,3 metastabile Zustände aus, was eine Auswertung der DSC-Kurven nicht zulässt. Auf das thermotrope Verhalten der Lipiddispersionen bei physiologischem pH-Wert (pH 7,3) wird nicht weiter eingegangen.

3.3.2 DSC-Untersuchungen der Lipide mit drei Tetracyclketten – die DiTT-Reihe

Die beiden Vertreter der DiTT-Reihe wurden aus zwei rationellen Gründen synthetisiert. Zum einen um die Diastereomerenhypothese synthetisch zu beweisen (siehe Kap. 2.8). Zum anderen sollte der Einfluss der Einführung einer dritten Alkylkette auf das thermotrope Verhalten wässriger Dispersionen der Lipide im DSC-Experiment untersucht werden.

Betrachten wir zunächst die Einführung einer weiteren Tetracyclkette in TT-VI (TT-VI → DiTT-VI) und deren Auswirkung auf das thermotrope Verhalten der Verbindung im Wasser-gesättigten System. Die 2. und 3. Heizkurve eines DSC-Experiments mit einer DiTT-VI-Dispersion bei pH 10 sind in Abb. 43 dargestellt. Zwei Unterschiede im Vergleich zu der DSC-Kurve von TT-VI (zum Vergleich siehe Abb. 40) sind erkennbar: Die Kurven sind im Falle von DiTT-VI nicht deckungsgleich und damit nicht reproduzierbar. Das nicht reproduzierbare Verhalten weist auf ein thermodynamisch instabiles System hin, wie es schon für die Lipide der Kopfgruppenstruktur-VIII postuliert wurde. Weiterhin sind zwei Umwandlungen sehr geringer Intensität zu erkennen (siehe Pfeile Abb. 43).

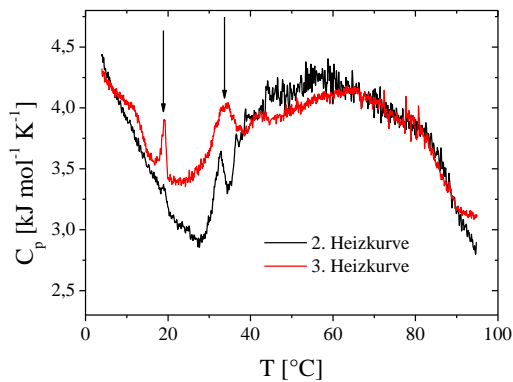


Abb. 43: DSC-Heizkurven der wässrigen Dispersion von **DiTT-VI** bei pH 10 ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$ in Carbonatpuffer). Die Heizrate betrug 60 K h^{-1} . Die Pfeile markieren Phasenumwandlungen geringer Intensität.

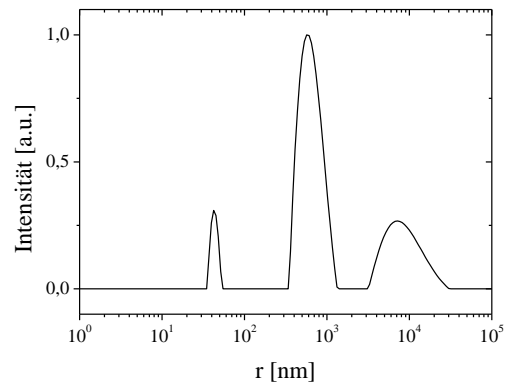


Abb. 44: Intensitätsgewichtete Größenverteilung einer Dispersion von **DiTT-VI** in Carbonatpuffer pH 10 ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$). Es sind drei verschiedene Größenpopulationen zu erkennen.

TT-VI ist ein Mizellbildner (Vergleich Kap. 3.4.1). Die Volumenvergrößerung des lipophilen Molekülteils durch die dritte Tetradecylkette (**TT-VI**→**DiTT-VI**) verhindert die Bildung von Mizellen. So zeigt die in Abb.44 dargestellte Größenverteilung drei Partikelgrößenpopulationen, welche zu groß für Lipidmizellen sind. Bereits die kleinste Partikelgrößenpopulation weist einen Radius zwischen 40 nm und 50 nm auf.

Das thermotrope Verhalten von **DiTT-VI**-Dispersionen bei pH 10 ähnelt dem der Lipide vom Kopfgruppentyp-**VIII**, welche unter den DSC-Bedingungen ein thermodynamisch instabiles Aggregationsverhalten aufweisen. Folglich hat die Volumenvergrößerung des lipophilen Molekülteils die Lipidstruktur von **DiTT-VI** so verändert, dass das Aggregationsverhalten eher mit Lipiden vom Kopfgruppentyp-**VIII**, als mit den zweikettigen Lipiden vom Kopfgruppentyp-**VI**, übereinstimmt. Diese Aussage lässt sich mit dem Molekülformkonzept von ISRAELACHVILI erklären: so scheint die Einführung der dritten Tetradecylkette den Packungsparameter zu vergrößern, wodurch die Mizellbildung verhindert wird. Diese These muss jedoch noch experimentell über die Ermittlung der Molekülabmessungen bestätigt werden.

Betrachten wir nun das thermotrope Verhalten wässriger **DiTT-IV**-Dispersionen. Die DSC-Kurven für das Lipid **DiTT-IV** in Abhängigkeit vom pH-Wert sind in Abb.45 dargestellt. Des Weiteren ist als Vergleich die DSC-Kurve von **TT-IV** in Carbonatpuffer (pH 10) dargestellt. Es ist offensichtlich, dass die zusätzliche Tetradecylkette die Phasenübergangstemperatur senkt: $T_m(\text{TT-IV}) > T_m(\text{DiTT-IV})$ bei pH 10 (Vergleich Tab. 11 und Tab. 14). Auch diese Beobachtung lässt sich mit Hilfe der Molekülform erklären. So erhöht die zusätzliche Alkylkette das Volumen des lipophilen Lipidbereichs. Eine gestörte Alkylkettenpackung, verursacht durch den Raumbedarf der dritten Alkylkette, kann die starke T_m -Absenkung erklären.

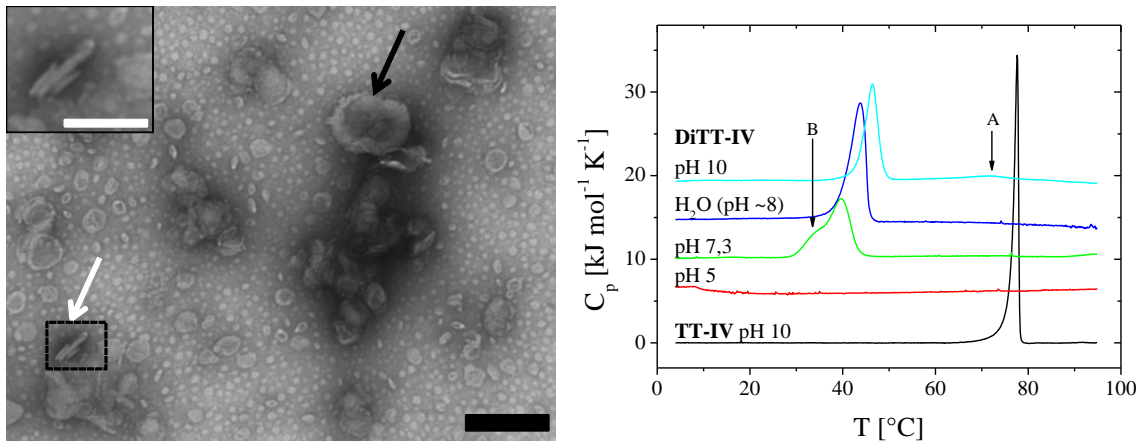


Abb. 45: Links: TEM-Aufnahme einer Dispersion von **DiTT-IV** ($c = 0,05 \text{ mg ml}^{-1}$ in HEPES-Puffer pH 7,3). Schwarzer Pfeil: kollabiertes Vesikel, weißer Pfeil: schichtartige Strukturen, welche auch in der Vergrößerung links oben dargestellt sind. (schwarzer Balken = 200nm, weißer Balken = 100nm) Rechts: DSC-Heizkurven der wässrigen Dispersionen von **DiTT-IV** ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$) in Carbonatpuffer (pH 10), H₂O (pH ~8), HEPES-Puffer (pH 7,3) und Acetatpuffer (pH 5) im Vergleich zu einer **TT-IV**-Dispersion in Carbonatpuffer (pH 10). Die Heizrate betrug 60 K h^{-1} . Für nähere Erläuterungen siehe Text.

Wässrige **DiTT-IV**-Dispersionen wurden auf die pH-Abhängigkeit des thermotropen Verhaltens untersucht. Diese Versuche fanden im Rahmen für Untersuchungen zum Mischungsverhalten verschiedener Phospholipide mit **DiTT-IV** statt, auf welche hier aber nicht weiter eingegangen werden soll.²⁶⁴

Tab. 14: Phasenübergangstemperatur (T_m), -enthalpie (ΔH) und Halbwertsbreite ($T_{0,5}$) sowie extrapolierte Anfangs- (T_{on}) und extrapolierten Endtemperatur (T_{off}) von **DiTT-IV**-Dispersionen ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$) in verschiedenen wässrigen Dispersionsmedien.

Dispersionsmedium	pH-Wert	T_m [°C]	ΔH [kJ mol ⁻¹]	$T_{0,5}$ [°C]	T_{on} [°C]	T_{off} [°C]
Carbonatpuffer	10,0	46,5	42,9	3,2	42,5	48,8
Wasser	~8 ^[a]	43,9	61,7	3,8	38,8	45,7
HEPES-Puffer	7,3	39,8	50,0	6,8	30,0	43,5
Acetatpuffer	5,0	7,6	_ ^[b]	_ ^[b]	_ ^[b]	12,5

[a] Mit pH-Elektrode ermittelt.

[b] Werte nicht ermittelbar, da Phasenübergang bei 2 °C noch nicht beendet ist.

Bei Betrachtung von Abb.45 sowie Tab.14 fällt auf, dass sich T_m von pH 10 nach pH 5 kontinuierlich zu niedrigeren Temperaturen verschiebt. $T_{0,5}$ nimmt mit sinkendem pH-Wert zu, die Peaks der Umwandlung werden breiter und flacher. Die Umwandlungsenthalpie hat ein Maximum von $61,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ in Wasser (siehe Tab.14). Die Verschiebung von T_m zu niedrigeren Temperaturen und die Zunahme von $T_{0,5}$ mit sinkendem pH-Wert sind auf die zunehmende Protonierung der Aminogruppen im Lipid zurückzuführen. So nimmt mit steigendem Protonierungsgrad die elektrostatische Abstoßung im Kopfgruppenbereich zu, was zu einer Destabilisierung der Gelphase führt.²⁶⁵⁻²⁶⁷

In den DSC-Kurven fallen zwei weitere pH-abhängige Charakteristika auf, welche in Abb.45 mit Pfeilen gekennzeichnet sind: (A) Bei pH 10 ist neben der Hauptumwandlung eine breite Nachumwandlung zu erkennen, mit $T_{post} \approx 70^\circ\text{C}$, deren Ursache nicht geklärt ist. (B) Die Hauptumwandlung bei pH 7,3 weist eine Schulter auf, welche durch unterschiedlich protonierte Formen von **DiTT-IV** verursacht werden kann. Dadurch kann es zur Entmischung im Lipidsystem kommen. Abb.46 zeigt das

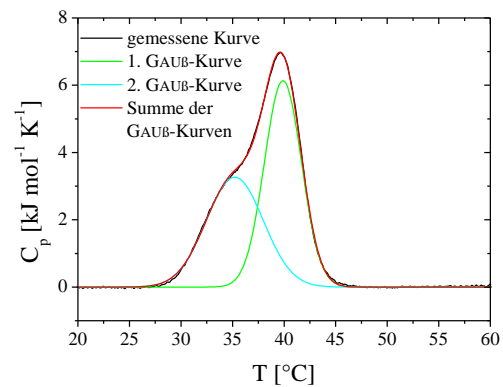


Abb.46: Ergebnis einer nicht-linearen Kurvenanpassung (nach GAUß) für die DSC-Heizkurve einer Dispersion von **DiTT-IV** in HEPES-Puffer ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$). Die rote Kurve ist die Summe der beiden über die Kurvenanpassung ermittelten GAUß-Kurven.

Ergebnis der nicht-linearen Kurvenanpassung (Fit nach GAUß)^{268,269} für die DSC-Kurve der **DiTT-IV**-Dispersion in HEPES-Puffer (pH 7,3), wobei die Summe der 2 GAUß-Funktionen deckungsgleich mit der gemessenen DSC-Kurve ist. Dies unterstützt die Hypothese der zwei unterschiedlich protonierten Lipidspezies. Bei pH 7,3 sind in den TEM-Aufnahmen zwei verschiedene Strukturen zu erkennen, wobei es sich um vesikuläre und schichtartige Aggregate handelt (siehe Abb.45). Möglicherweise sind die unterschiedlichen protonierten **DiTT-IV**-Spezies für die Ausbildung unterschiedlicher Aggregatstrukturen verantwortlich.

3.3.3 Erste Betrachtungen des Aggregationsverhaltens von Lipiden mit reinen Oyleylketten, sowie der Ersatz von Doppelbindungen durch Methylverzweigungen – Alkylkettentyp-RTO und -THM, sowie Lipid XV und XVp

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war die Bereitstellung von ungesättigten Lipiden mit hoher Alkylkettenreinheit. So wurde seit der Etablierung der Malonamide durch I. SCHULZE⁸⁰ Oyleylamin (tech.) und Oyleylalkohol (tech.) als Edukt für die Synthese genutzt. Nachfolgende Arbeiten resultierten in einer Reihe von effektiven Transfektionslipiden, welche Oyleylketten von einem Reinheitsgrad zwischen 70 % und 80 % aufwiesen.^{80,81,88,176,179,180,270} Der Reinheitsgrad der Alkylketten ist dabei auf die Reinheit der erworbenen Ausgangsstoffe zurückzuführen (*Sigma Aldrich*: Oyleylamin (70 %), Oyleylalkohol (85 %); GC-MS-Spektren beider Edukte siehe Anhang). Reines Oyleylamin ist bei *Sigma Aldrich* nicht erhältlich. Oyleylalkohol (99 %) wäre kommerziell verfügbar, jedoch um den Faktor 200 preisintensiver als Oyleylalkohol (85 %).²⁷¹

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals Malonamide mit kettenreinem Oleylamin (pur) dargestellt (Lipide **XVp**, **RTO-IV**, **RTO-X** und **RTO-XIV**) um den Einfluss der Kettenreinheit auf das Gentransfer- und das Aggregationsverhalten der Cytofektine untersuchen zu können.

Als weiteres Ziel dieser Arbeit galt es, einen Ersatz für die oxidationsempfindliche Doppelbindung zu etablieren. So wurden erstmalig Malonamide mit Methyl-verzweigten Alkylketten synthetisiert. Methylverzweigungen in Alkylketten erhöhen die Kettenfluidität, da sie eine Störung in der Alkylkettenpackung der Lipiddoppelschicht verursachen.^{272,273} Natürlich vorkommende

Methyl-verzweigte Alkylketten in Lipiden findet man in Membranen von Mikroorganismen (siehe Abb. 47). Dabei sind Iso- und Anteiso-Fettsäuren, d.h. Fettsäuren mit Verzweigungen am Methyl-

ende der Alkylketten, am häufigsten anzutreffen.^{274,276} In Archaeobakterien treten Lipide mit isoprenoid verzweigten Alkylketten auf.^{277,278} In Lipiden tierischer Herkunft sind Methyl-verzweigte Fettsäuren eher selten anzutreffen,²⁷⁹ da hier die Kettenfluidität von Lipiden bevorzugt über den Sättigungsgrad gesteuert wird. Dennoch sind Methyl-verzweigte Lipide für die technologische Anwendung von Interesse, da sie, im Gegensatz zu ungesättigten Lipiden, nicht oxidationsempfindlich sind.

In Untersuchungen zum Aggregationsverhalten Methyl-verzweigter Lipide konnte gezeigt werden, dass der Betrag der Absenkung der Phasenübergangstemperatur im Vergleich zu den unverzweigten Gegenstücken entscheidend von der Position der Methylverzweigung in der Alkylkette abhängt. So zeigte sich ein Minimum der Phasenübergangstemperatur, wenn die Methylverzweigung in der Kettenmitte positioniert war. Die Ergebnisse dieser Arbeiten sind in Abb. 48 dargestellt (Werte sind der Literatur entnommen)²⁸⁰⁻²⁸³ und dienen im Rahmen dieser Arbeit als Basis für die Auswahl der 10-Methylhexadecylkette als Ersatz für die Oleylkette. MENER et al. zeigten in Untersuchungen von Lipiden mit Methyl-verzweigten Octadecansäuren ein T_m -Minimum für die Methylverzweigung in C10-Position.²⁸³ Die Untersuchungen von Lipiden mit Methyl-verzweigten Hexadecansäuren durch NUHN et al. lassen das T_m -Minimum ebenfalls in der C10-Position vermuten.²⁸² Da der Phasenübergang von 1,2-Di(10-methylpalmitoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholin unter -20°C liegt, konnte er

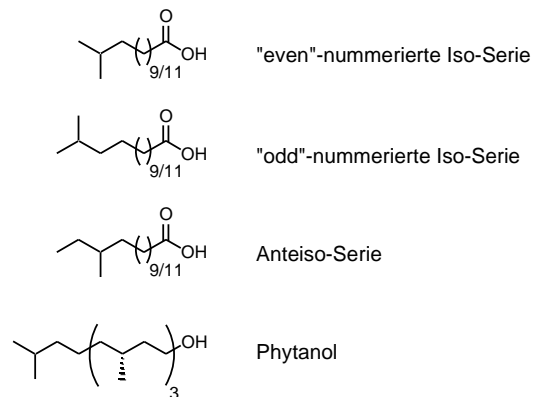


Abb. 47: Beispiele für natürlich vorkommende Methyl-verzweigte Fettsäuren oder Fettalkohole. Die dargestellten Fettsäureserien sind Vertreter aus Membranlipiden von Bakterien des Genus *Bacillus*. Phytanol kommt in Etherlipiden von Archaeobakterien vor.^{274,275}

nicht mittels DSC bestimmt werden, sondern wurde durch Extrapolation als Minimum ermittelt. Der Phasenübergang des Ölsäure-haltigen Analogons DOPC liegt ebenfalls unter -20 °C ($T_m = -21\text{ °C}$).²⁸⁴ Des Weiteren unterstützten theoretische Betrachtungen die Wahl der 10-Methylhexadecylkette als Ersatz für die Oleylkette. CEVS diskutierte für die Oleylkette eine effektive Kettenlänge von neun C-Atomen.²⁴⁴ Die Ursache dafür ist

ein „Abknicken“ der Alkylkette, verursacht durch die Doppelbindung, wodurch die Anzahl der VAN-DER-WAALS-Kontakte abnimmt. MENGER et al. postulierten ebenfalls ein „Abknicken“ der Alkylkette in Position der Methylverzweigung,²⁸³ woraus für die 10-Methylhexadecylkette ebenfalls eine effektive Kettenlänge von neun C-Atomen resultiert. Für die folgende Betrachtung des Einflusses der Oleylkettensubstitution (Reinheitsgrad und Austausch gegen 10-Methylhexadecyl) auf das thermotrope Verhalten der Substanzen mittels DSC wurde der Carbonatpuffer pH 10 gewählt, da unter diesen Bedingungen im betrachteten Temperaturbereich Phasenübergänge detektiert wurden (siehe Kap. 3.3.1).

Zunächst soll Lipid **XV** mit **XVp** verglichen werden. Die Testung im Zellkulturmodell zeigte, dass die alkyllkettenreine Verbindung Lipid **XVp** keinen effektiven Gentransfer ermöglicht, während die alkyllkettenunreine Substanz Lipid **XV** zur Transfektion von pDNA befähigt ist.¹⁸⁰ Diese überraschende Beobachtung führt zu einer wichtigen Frage: Wo liegt der Grund für den Effektivitätsunterschied? Ein Unterschied kommt im thermotropen Verhalten der beiden betrachteten Lipide zum Ausdruck (siehe Abb.49a). So ist die Umwandlung für Lipid **XV** breiter und flacher als die Umwandlung für Lipid **XVp**. Die zugehörigen ΔH -Werte sind für Lipid **XV** geringer, die T_m - und $T_{0,5}$ -Werte dagegen höher (siehe Tab.15). Der Einfluss der als Verunreinigung enthaltenen gesättigten Alkylketten des Lipid **XV** wird deutlich sichtbar. $T_{0,5}$ ist, verglichen mit der reinen Substanz (Lipid **XVp**), größer – ein typisches Phänomen für Lipidmischungen.^{243,261} Des Weiteren ist der höhere T_m -Wert von Lipid **XV** den gesättigten Lipidkomponenten in der Mischung, welche höhere T_m -Werte aufweisen, zuzuschreiben. Bei genauerer Betrachtung des Kurvenverlaufs der Umwandlung von Lipid **XV** sind zusätzliche Peaks zu erkennen, was auf eine Entmischung des Lipidsystems hindeutet (siehe Pfeile Abb. 49a). Ob diese Entmischungerscheinungen mit der

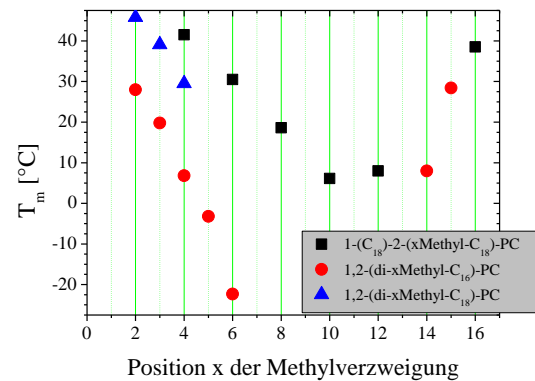


Abb.48: Abhängigkeit der Phasenübergangstemperatur von der Position der Methylverzweigung in den Alkylketten von verschiedenen 1,2-Diacyl-*sn*-glycero-3-phosphocholinen.

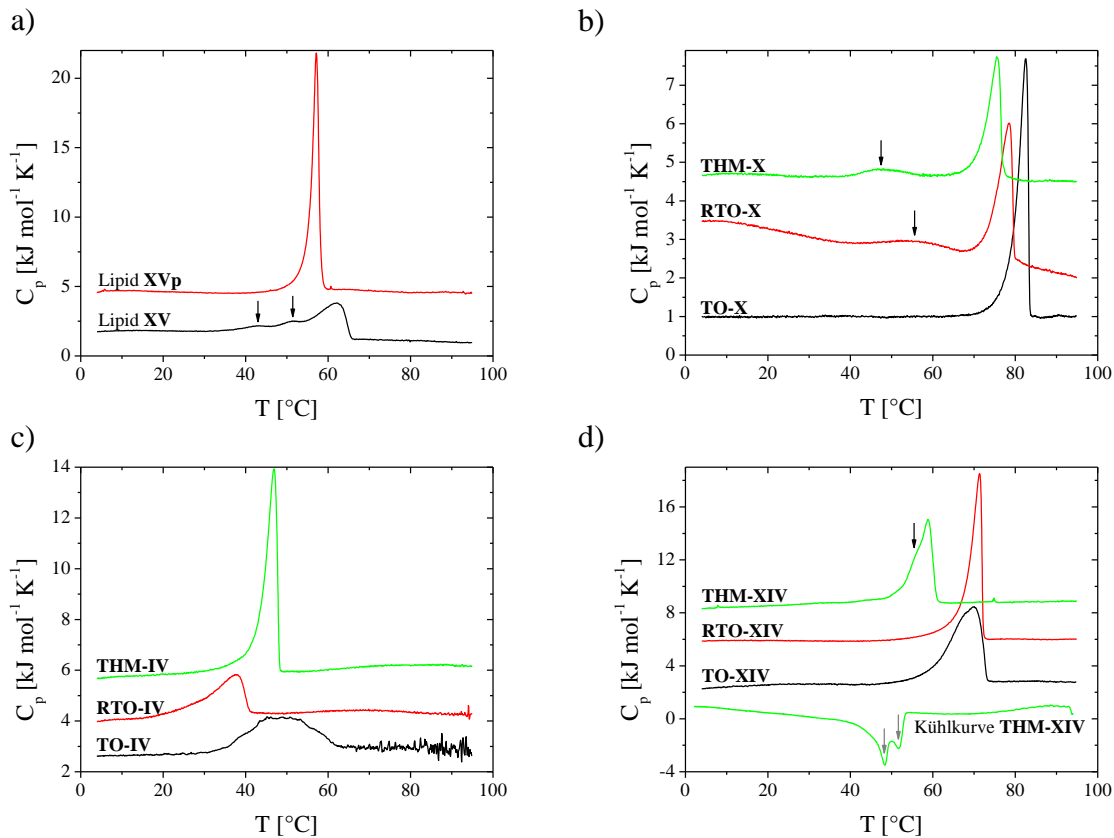


Abb. 49: DSC-Heizkurven von verschiedenen homologen Malonamiden der 1. und 2. Generation mit speziellen Alkylkettenvariationen (unreine Oleylketten – schwarz –, reine Oleylketten – rot –, und racemische 10-Methylhexadecylketten als Oeylersatz – grün –) in Carbonatpuffer pH 10 ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$): a) Lipid **XVp** im Vergleich mit Lipid **XV**. b) **THM-X** und **RTO-X** im Vergleich zu **TO-X**. c) **THM-IV** und **RTO-IV** im Vergleich zu **TO-IV**. d) **THM-XIV** und **RTO-XIV** im Vergleich zu **TO-XIV**. Kühlkurven sind gesondert beschriftet. Die Kurven sind aus Gründen der Veranschaulichung vertikal verschoben. Markierungen mit Pfeilen werden im Text näher erläutert.

höheren Transfektionseffizienz des Lipids **XV**, verglichen mit Lipid-**XVp**, zusammenhängen, gilt es in nachfolgenden Arbeiten zu klären.

Im folgenden Abschnitt wird die Substitution der Oleylkette (tech.) gegen die Oleylkette (rein) sowie die Methyl-verzweigte Alkylkette an ausgewählten Beispielen der Malonamide der 2. Generation betrachtet. Dabei soll jede einzelne Alkylkettenvariation gesondert behandelt werden um Übersichtlichkeit zu bewahren.

Zu Beginn wird der Austausch der unreinen Oleylkette mit dem reinen Analogon (**TO**→**RTO**) betrachtet. Der Vergleich der Heizkurven in Abb.49b-d zeigt, dass die Phasenübergänge der alkylkettenreinen Lipide schärfer sind als die der alkylkettenunreinen Analoga. Dies spiegelt sich auch in den $T_{0,5}$ -Werten wieder (siehe Tab. 15). Eine Ausnahme bildet der Kopfgruppentyp-**X**, bei dem $T_{0,5}$ mit steigender Alkylkettenreinheit zunimmt. Der Einfluss der Oleylkettenreinheit auf ΔH ist kopfgruppenabhängig: So steigt ΔH für den Kopfgruppentyp-**IV** mit steigender Oleylkettenreinheit, sinkt jedoch für die Kopfgruppentypen-**X** und **-XIV**. T_m nimmt mit steigender Kettenreinheit ab. Ausnahme bildet der Kopf-

gruppentyp-**XIV**, bei dem die T_m -Werte der Phasenübergänge vergleichbar sind: $T_m(\mathbf{TO-XIV}) = 70,0\text{ }^\circ\text{C}$; $T_m(\mathbf{RTO-XIV}) = 71,3\text{ }^\circ\text{C}$.

Tab. 15: Übersicht über die DSC-Kenngrößen T_m , $T_{0,5}$, T_{on} , T_{off} und ΔH für die in Abb. 49 dargestellten DSC-Heizkurven in Carbonatpuffer pH 10. Die roten Werte markieren die gute Übereinstimmung zwischen den Parametern der Umwandlungen von **RTO-X** und **THM-X**.

Lipid	T_m [$^\circ\text{C}$]	ΔH [kJ mol^{-1}]	$T_{0,5}$ [$^\circ\text{C}$]	T_{on} [$^\circ\text{C}$]	T_{off} [$^\circ\text{C}$]
Lipid XV	62,1	30,7	8,6	34,4	65,5
Lipid XVp	57,1	41,6	1,8	54,3	58,5
TO-X	82,5	24,2	2,7	77,7	83,5
RTO-X	78,5	14,9	3,7	72,7	79,8
THM-X	75,5	12,3	3,3	70,2	77,0
TO-IV	50	11,8	14,8	38,0	60,5
RTO-IV	37,5	15,3	8,5	23,3	41,1
THM-IV	46,9	31,7	2,3	42,2	48,3
TO-XIV	70,0	51,7	8,4	58,8	73,2
RTO-XIV	71,3	49,0	2,8	66,6	72,3
THM-XIV	58,8	31,0	4,4	52,9	61,7

Somit konnte gezeigt werden, dass die Oyleykettenreinheit bei den Malonamiden der 2. Generation überwiegend vergleichbare Auswirkungen auf das thermotrope Verhalten hat: $T_{0,5}$ der Lipide mit unreinen Oyleyketten ist größer verglichen mit den kettenreinen Analoga, ein typisches Phänomen für Lipidmischungen.^{243,261} Des Weiteren führen die gesättigten Lipidkomponenten (Verunreinigung), welche höhere T_m -Werte aufweisen als die Komponente mit Oyleykette, zu höheren T_m -Werten: $T_m(\mathbf{TO-X}) > T_m(\mathbf{RTO-X})$ und $T_m(\mathbf{TO-IV}) > T_m(\mathbf{RTO-IV})$. Es ist auch ersichtlich, dass der Einfluss der Kettenreinheit auf den Phasenübergang für die Malonamide der 1. Generation ausgeprägter ist als für die Malonamide der 2. Generation (siehe Abb.49). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung bietet folgender Sachverhalt: Bei der 2. Generation der Malonamide mit 2 Alkylketten handelt es sich um ein Diastereomerenpaar. Da Diastereomere unterschiedliche physikalische Eigenschaften haben, können sie sich in der DSC wie ein Stoffgemisch verhalten. So zeigten MANNOCK et al., dass Diastereomerenpaare je nach Art des Phasenübergangs ein unterschiedliches oder identisches Phasenübergangsverhalten im Vergleich mit den Reinkomponenten aufwiesen.²⁸⁵ Die Malonamide der 1. Generation sind, aufgrund der racemischen Alkylierung am Malonbaustein, ein Enantiomerenpaar. Diese verhalten sich in DSC-Experimenten wie eine Substanz. Verunreinigungen können sich hier stärker auf die Peakbreite auswirken.

Der Austausch der Oleylkette (unrein) gegen die racemisch methylierte 10-Methylhexadecylkette (**TO**→**THM**) äußerte sich wie folgt: T_m wurde zu kleineren Werten verschoben. Die abgewandelte Alkylkettenstruktur resultiert somit in einem abweichenden Aggregationsverhalten. Der Einfluss auf die Umwandlungsenthalpie variiert je nach Kopfgruppe (siehe Tab.15). $T_{0,5}$ sinkt durch die Substitution mit der 10-Methylhexadecylkette – einzige Ausnahme: $T_{0,5}(\mathbf{TO-X}) < T_{0,5}(\mathbf{THM-X})$. Die steigende Kooperativität der Umwandlung der **THM**-Lipide gegenüber den Lipiden der **TO**-Reihe lässt sich durch die Verunreinigungen im **TO**-System erklären, welche die Alkylkettenpackung stören und zu Entmischungerscheinungen führen können.^{246,261,286-288}

Einige Alkylkettenvariationen weisen Besonderheiten im thermotropen Verhalten der Lipiddispersionen auf. So zeigt sich bei dem Kopfgruppentyp-**X**, dass die Verbindungen **RTO-X** und **THM-X** eine breite Vorumwandlung besitzen (siehe Pfeile Abb.49b). Die Umwandlung des Lipids **THM-XIV** zeigt hingegen eine Schulter an der Hauptumwandlung (siehe schwarzer Pfeil Abb.49d). Bei der Betrachtung der Kühlkurve fällt auf, dass sich zwei Umwandlungen überschneiden (siehe graue Pfeile in Abb.49d). Die Ursachen für die Vorumwandlungen von **RTO-X** und **THM-X** sowie für die zwei Umwandlungen des Lipids **THM-XIV** müssen durch weitere Untersuchungen, wie beispielsweise RÖNTGEN-Beugungsexperimente, aufgeklärt werden.

Zusammenfassend soll an dieser Stelle noch einmal hervorgehoben werden, dass durch die Einführung der Methylverzweigung in 10-Position einer Hexadecylkette Lipide synthetisiert wurden, deren Phasenübergänge im Bereich homologer Lipide mit einer Oleylkette anstelle der 10-Methylhexadecylkette liegen. Eine sehr gute Übereinstimmung konnte zwischen den Lipiden **RTO-X** und **THM-X** festgestellt werden (siehe Abb.49b und rote Markierung Tab.15). Ob die Einführung von Methylgruppen in Alkylketten als Ersatz für die ungesättigten Alkylketten dienen kann, muss jedoch noch durch Testung der Gentransferaktivität der Lipide vom **THM**-Typ im Vergleich zum **RTO**- und **TO**-Typ bestimmt werden.

3.4 Untersuchungen zum Aggregationsverhalten der Lipide vom Kopfgruppentyp-VI

3.4.1 Lipide vom Kopfgruppentyp-VI – Mizellbildner

Wie in den vorangegangenen DSC-Untersuchungen bei pH 10 gezeigt wurde, weisen die Lipide vom Kopfgruppentyp-VI keine detektierbare Phasenumwandlung im untersuchten Temperaturbereich sondern lediglich einen langsamen Drift in der molaren Wärmekapazität

auf (siehe Abb.40). Zudem waren die Lipiddispersionen klar ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$). Durch diesen Sachverhalt lassen sich zwei Thesen aufstellen:

- i) Die Lipide, welche sechs primäre Aminogruppen aufweisen, sind aufgrund ihrer Hydrophilie in Carbonatpuffer pH 10 unter den experimentellen Bedingungen der DSC löslich oder,
- ii) die Lipide bilden unter den DSC-Bedingungen mizellare Aggregate, welche keine Umwandlung im betrachteten Temperaturbereich zeigen.

Tab.16: Partikelgröße der Aggregate, welche in wässrigen Dispersionen der Lipide vom Kopfgruppentyp-**VI** gebildet werden (Carbonatpuffer pH 10, $c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$). Es sind die Maxima und die Peakflächen der zwei kleinsten Größenpopulationen in der intensitäts- und massengewichteten Partikelgrößenverteilung angegeben. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung für eine Versuchsanzahl von 3 angegeben.

Lipid	intensitätsgewichtet		massengewichtet	
	Peak 1: r [nm] (Fläche [%])	Peak 2: r [nm] (Fläche [%])	Peak 1: r [nm] (Fläche [%])	Peak 2: r [nm] (Fläche [%])
TT-VI	$4,4 \pm 0,1$ ($22,2 \pm 1,7$)	$196,2 \pm 160,3$ ($68,8 \pm 14,4$)	$3,8 \pm 0,3$ ($99,1 \pm 0,3$)	$155,6 \pm 76,2$ ($0,9 \pm 0,3$)
HT-VI	$4,4 \pm 0,1$ ($17,9 \pm 0,6$)	$46,9 \pm 2,1$ ($76,1 \pm 4,5$)	$4,1 \pm 0,2$ ($99,2 \pm 0,1$)	$34,6 \pm 2,8$ ($0,7 \pm 0,1$)
TO-VI	$6,1 \pm 0,2$ ($10,7 \pm 0,5$)	$85,9 \pm 1,3$ ($85,7 \pm 1,4$)	$5,4 \pm 0,2$ ($97,7 \pm 0,1$)	$95,6 \pm 3,6$ ($2,2 \pm 0,1$)
HO-VI	$5,0 \pm 0,1$ ($60,5 \pm 0,7$)	$22,3 \pm 2,2$ ($18 \pm 0,1$)	$4,4 \pm 0,1$ ($99,5 \pm 0,1$)	$18,7 \pm 1,3$ ($0,4 \pm 0,1$)
OO-VI	$3,6 \pm 0,1$ ($1 \pm 0,1$)	$31,6 \pm 0,9$ ($96,0 \pm 1,2$)	$3,4 \pm 0,1$ ($63,7 \pm 4,9$)	$14,4 \pm 1,1$ ($35,4 \pm 4,8$)

Um diese Thesen zu stützen oder zu widerlegen wurden DLS-Untersuchungen in wässrigen Dispersionen ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$ Lipid in Carbonatpuffer pH 10) durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Radien der Größenpopulationen der intensitäts- und massengewichteten Partikelgrößenverteilungen in Tab.16 zusammengefasst. Bei der Betrachtung der Daten ist zu berücksichtigen, dass die massengewichtete Partikelgrößenverteilung für polydisperse Proben, in Bezug auf die tatsächlichen Mengenverhältnisse der verschiedenen Größenspezies, aussagekräftiger ist als die intensitätsgewichtete Verteilung.²⁶³ Alle 5 Lipide zeigen reproduzierbar 2 Größenspezies, wodurch die These (i), dass die Lipide gelöst vorliegen, widerlegt ist. Die dominierende Partikelgrößenspezies liegt für alle 5 Lipide bei einem Radius von 4-6nm. Diese Partikelgröße ist ein Indiz für die Existenz von Mizellen. Des Weiteren ist eine zweite Partikelgrößenspezies in den Lipiddispersionen vorhanden (siehe Tab. 16), welche zu groß für Mizellen ist und etwa 0,4-2,0% der Gesamtmenge in der massengewichteten Verteilung

ausmacht (Ausnahme **OO-VI**). Die Vermutung liegt nahe, dass es sich hierbei um agglomerierte Mizellen handelt.

Die Bildung von Mizellen bei einer Lipidkonzentration von 1 mg ml^{-1} konnte auch in Wasser, HEPES-Puffer pH 7,3 und Acetatpuffer pH 5 für die Lipide vom Kopfgruppentyp-**VI** nachgewiesen werden. Abb.50a zeigt hierzu die massen- und intensitätsgewichtete Größenverteilung von **TO-VI**-Dispersionen in Carbonatpuffer pH 10 und HEPES-Puffer pH 7,3.

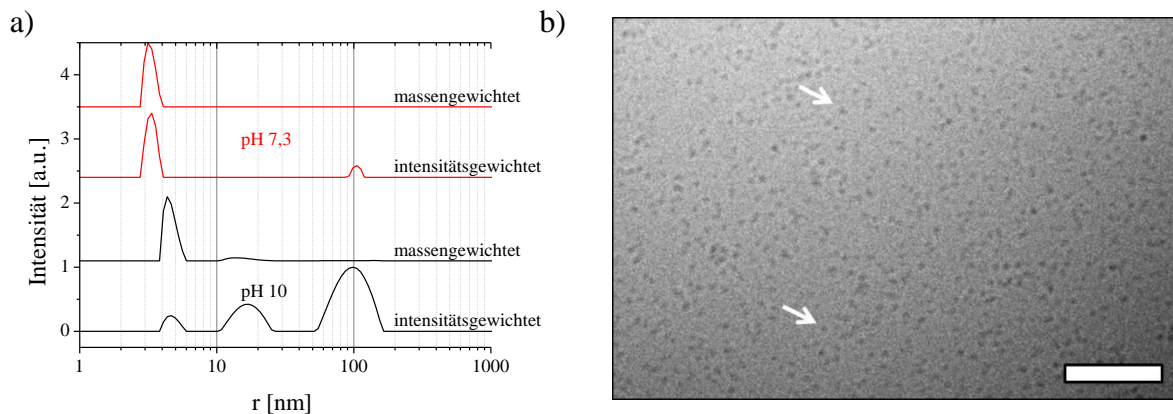


Abb. 50: a) Massen- und intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilungen als Ergebnis der DLS-Messungen von **TO-VI**-Dispersionen ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$) in Carbonatpuffer pH 10 und HEPES-Puffer pH 7,3. r entspricht dem hydrodynamischen Radius einer Kugel. Die Kurven wurden zur Veranschaulichung vertikal verschoben. b) Cryo-TEM-Aufnahme einer **TO-VI**-Dispersion ($c = 2 \text{ mg ml}^{-1}$) in Carbonatpuffer pH 10. Die weißen Pfeile markieren kleine Aggregate, welche als Mizellen interpretiert werden können. Der Balken entspricht 100 nm.

Betrachtet man zunächst die intensitätsgewichteten Größenverteilungen, so ist eine Größenspopulation mit Radien kleiner als 10 nm zu erkennen, welche den Mizellen zugeschrieben wird. Zusätzlich treten Populationen mit größeren Radien (10-200 nm) auf, welche von aggregierten Mizellen verursacht werden könnten. Bei pH 10 nehmen diese Populationen einen größeren Anteil ein (größere AUC) als bei pH 7,3. Diese Beobachtung ist mit einer verringerten Aggregationstendenz der Mizellen bei pH 7,3, aufgrund der höheren elektrostatischen Stabilisierung durch protonierte Aminogruppen, erklärbar. Die massengewichtete Größenverteilung bei pH 7,3 zeigt lediglich den Peak bei $\sim 4 \text{ nm}$, welcher den Mizellen zuschreibbar ist.

Zur Absicherung der Mizell-Hypothese wurden Cryo-TEM-Aufnahmen angefertigt. Die Aufnahmen einer **TO-VI**-Dispersion bei pH 10 zeigen lediglich sehr kleine Aggregate mit Radien unter 10 nm, welche als Mizellen interpretiert werden können (siehe Abb. 50b). Diese Beobachtung stimmt mit der massengewichteten Größenverteilung von **TO-VI**-Dispersionen bei pH 10 überein (Abb. 50a und Tab. 16), in der Partikel mit Radien unter 10 nm dominieren.

3.4.2 Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) bei pH 7,3

Da Mizellbildner nur oberhalb der CMC zu Mizellen aggregieren, galt es diese charakteristische Kenngröße für die Lipide vom Kopfgruppentyp-**VI** zu ermitteln. Für die CMC-Bestimmung kamen drei verschiedene Methoden zum Einsatz. Bei Methode A handelt es sich um die Bestimmung mit Hilfe der ITC. Diese Methode basiert auf der Erfassung der Demizellisationswärmen:²⁸⁹⁻²⁹² Wird eine Mizelldispersion in reines Lösungsmittel titriert, so wird bis zum Erreichen der CMC die Wärmeänderung des Mizellzerfalls (Demizellisation) gemessen. Nach dem Erreichen der CMC im Reaktionsgefäß werden lediglich Wärmeänderungen durch Verdünnungseffekte detektiert (Abb.51a). Die CMC wird mit Hilfe einer nicht-linearen Kurvenanpassung aus den detektierten Wärmemengen ermittelt (Abb.51b). Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass eine Bestimmung der CMC ohne den Einbau von Fremdmolekülen möglich ist. Sie kann jedoch nur angewendet werden, wenn die Demizellisationswärme und die Verdünnungswärme der Mizellen sich ausreichend unterscheiden, was nur für die Lipide **TT-VI** und **TO-VI** zutrifft. Für die Lipide **HT-VI**, **HO-VI** und **OO-VI** konnte die ITC-Titration zur CMC-Bestimmung nicht angewendet werden – hier wurden zwei weitere Methoden herangezogen.

Die Methoden B und C basieren auf dem Einschluss von lipophilen Farbstoffen in Mizellen, da die Farbstoffe eine höhere Affinität für die lipophile Umgebung im Mizellinneren besitzen. Für Methode B kam Fluorescein zum Einsatz. Fluorescein wird in der Literatur als geeignetes Agens für die CMC-Bestimmung kationischer Tenside beschrieben.²⁹³ Das Absorptionsmaximum des Farbstoffs ändert sich bei dem Transfer aus der wässrigen Umgebung des

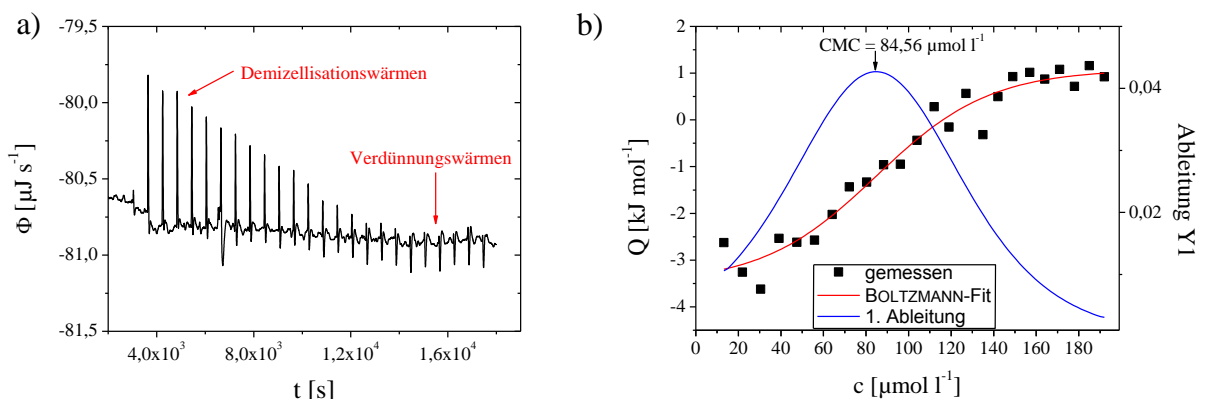


Abb. 51: Bestimmung der CMC mit Hilfe der ITC (Methode A) am Beispiel des Lipids **TO-VI**. a) Wärmestrom/Zeit-Profil für die Titration einer Lipiddispersion ($c = 0,84 \text{ mM}$, HEPES-Puffer pH 7,3) in reinen HEPES-Puffer mit Titrationsinkrementen von $10 \mu\text{l}$ in Intervallen von 600 s. Positive Signale resultieren aus exothermen Prozessen. b) Molare Prozesswärmen der Demizellisation als Funktion der Lipidkonzentration in der Messzelle. Die rote sigmoide Kurve wurde durch Kurvenanpassung nach BOLTZMANN aus den experimentellen Daten generiert ($R^2 = 0,9542$). Das Maximum der ersten Ableitung der BOLTZMANN-Funktion entspricht der CMC.

Dispersionsmediums in die lipophile Umgebung der Mizelle, so dass über die Ermittlung der Absorption als Funktion der Lipidkonzentration die CMC ermittelt werden kann. Diese ist durch eine Anstiegsänderung in der resultierenden Kurve gekennzeichnet (Abb. 52a).

Die Methode C basiert hingegen auf der Abhängigkeit des Fluoreszenzverhaltens des Fluorophors 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) von der Polarität des umgebenden Mediums.²⁹⁴ So verschiebt sich das Emissionsmaximum beim Transfer des Fluorophors von der wässrigen Umgebung des Dispersionsmediums in die lipophile Umgebung des Mizellinneren nach Erreichen der CMC. Die CMC ergibt sich dabei aus dem Knickpunkt des Fluoreszenz/Lipidkonzentrations-Profiles (Abb. 52b).

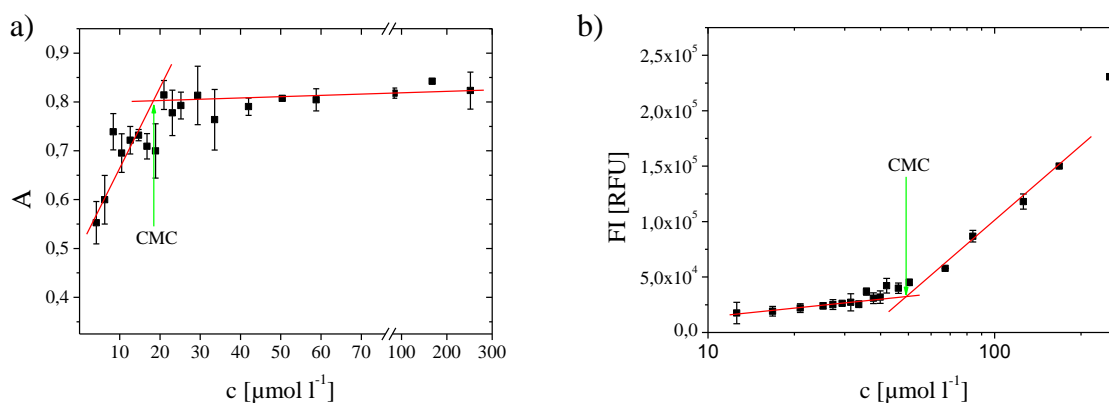


Abb. 52: Ermittlung der CMC mit Hilfe von Farbstoffeinschlussmethoden am Beispiel des Lipids **TO-VI**. Die dargestellten Ergebnisse sind die Mittelwerte aus drei Einzelmessungen. a) Ermittlung der CMC nach Methode B (Fluorescein). Dargestellt ist die Absorption einer 10^{-5} M Fluoresceinlösung in HEPES-Puffer pH 7,3 als Funktion der Lipidkonzentration. b) Ermittlung der CMC nach Methode C (DPH). Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität einer 5×10^{-6} M DPH-Lösung in HEPES-Puffer pH 7,3 als Funktion der Lipidkonzentration. Die CMC wird für beide Methoden durch die Interpolation des initialen und terminalen Abschnitts der Funktion ermittelt, wobei der Schnittpunkt als CMC angegeben wird.

Die Ergebnisse der CMC-Bestimmungen in HEPES-Puffer sind in Tab. 17 zusammengefasst. HEPES-Puffer wurde aufgrund des physiologischen pH-Werts (7,3) als Dispersionsmedium ausgewählt, da dieser für die Lipid/DNA-Komplexbildung sowie der Inkubation von Zellen mit Lipoplexen relevant ist. Es muss jedoch beachtet werden, dass das Aggregationsverhalten und somit auch die CMC stark pH-Wert abhängig sein kann, vor allem, wenn das Amphiphil protonierbare funktionelle Gruppen, wie in diesem Fall Aminofunktionen, aufweist.

Die ermittelten CMC-Werte liegen für alle Lipide im Bereich zwischen 10 μM und 100 μM und sind somit relativ niedrig. Sie befinden sich im unteren Bereich der typischen CMC-Werte für Mizell-bildende Lipide (10 μM -10 mM).⁴¹ Bilayer-bildende Lipide besitzen niedrigere CMC-Werte (1 μM -0,1 nM).⁴¹

Die Werte, welche mit den Farbstoffeinschlussmethoden (Methode B und C) ermittelt wurden, sind für jedes einzelne Lipid vergleichbar (Tab.17). Die etwas stärkeren Abweichungen zwischen Methode B und C, welche im Falle der Lipide **TT-VI** und **TO-VI** auftraten, sind in der Auswertungsmethode begründet. So variiert, je nachdem welche

Tab. 17: CMC-Werte der Lipide vom Kopfgruppentyp-**VI**. Die angegebenen Werte sind mit drei verschiedenen Methoden ermittelt worden: Methode A (ITC), Methode B (Fluorescein-Einschluss) und Methode C (DPH-Einschluss).

<i>Lipid</i>	<i>CMC [μM] (CMC [μg ml⁻¹])</i>		
	<i>Methode A</i>	<i>Methode B</i>	<i>Methode C</i>
TT-VI	54 (61)	32 (36)	15 (17)
HT-VI	_ ^[a]	51 (59)	58 (67)
TO-VI	85 (101)	20 (24)	49 (58)
HO-VI	_ ^[a]	47 (57)	44 (53)
OO-VI	_ ^[a]	45 (56)	35 (44)

[a] CMC-Bestimmung mit ITC nicht möglich.

Messwerte bei der Ermittlung der Geraden für die Extrapolation mit berücksichtigt werden, die ermittelte CMC (Abb.52). Die CMC-Werte, welche mit der ITC-Methode (Methode A) ermittelt wurden, sind tendenziell höher als die mit Methode B/C ermittelten Werte (Tab. 17). Für diesen Unterschied gibt es mehrere mögliche Erklärungen: 1) Die Auswertungsmethode bietet eine Erklärung: Mit dem BOLTZMANN-Fit, welcher für die Auswertung der Methode A Anwendung fand, wird der Mittelpunkt der Umwandlung zum mizellaren System ermittelt (Wendepunkt der sigmoidalen Kurve). Die lineare Extrapolation (Methode B und C) bestimmt eher den Beginn des Mizellbildungsprozesses. 2) Die verwendeten Farbstoffe unterstützen die Mizellbildung. Normalerweise würde man für Methode B und C eine Verschiebung der CMC zu höheren Lipidkonzentrationen erwarten, da Fremdsubstanzen (z.B. Farbstoffe) die Lipidaggregation zu Mizellen stören. Die ansteigende DPH-Fluoreszenz (Methode C) vor Erreichen der CMC (Abb.52b) weist jedoch auf die Bildung prä-mizellarer Aggregate zwischen Tensid und Farbstoff hin. Diese prä-mizellaren Aggregate können mit einer Aggregation zu Mizellen bei geringerer Tensidkonzentration (verglichen mit reinem Tensid) verbunden sein.

3.4.3 Untersuchungen des DNA-Komplexierungsverhaltens des Lipids TO-VI

In-vitro Versuche am Zellkulturmodell zeigten, dass die Lipide vom Kopfgruppentyp-**VI** befähigt sind, bei hoher Viabilität, DNA in Zellen zu schleusen (siehe Kap.4.2). Somit stehen mit diesen Substanzen mizellare Lipidformulierungen für die Gentransfektion zur Verfügung. Diese Formulierungen sind von Interesse, da sie im Vergleich zu Liposomen einfacher herzustellen sind und in der Regel eine höhere Lagerstabilität aufweisen. Im folgenden Abschnitt soll ausführlich auf das Lipid **TO-VI** als Vertreter dieser Gruppe eingegangen werden. Es wurde die Komplexbildung zwischen **TO-VI** und einem Modellpolynukleotid

(sspDNA) ausführlich, unter Anwendung eines breiten Spektrums an biophysikalischen Methoden, untersucht. Weiterhin konnte die Struktur des **TO-VI**/sspDNA-Komplexes mittels RÖNTGEN-Beugungsexperimenten aufgeklärt werden.

3.4.3.1 ITC-Experimente

Im Verlauf der Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurde versucht die Komplexierung von DNA durch kationische Liposomen, bestehend aus verschiedenen Malonamiden der 1. Generation in Mischung mit DOPE, unter Verwendung der ITC zu untersuchen. Ausgewählte Ergebnisse dieser Titrationsexperimente wurden bereits veröffentlicht.²⁹⁵ Die dafür verwendeten Lipide („**lipid 1-6**“) wurden im Rahmen einer Diplomarbeit⁸¹ synthetisiert und in Arbeiten zu dieser Dissertation hinsichtlich des Aggregationsverhaltens charakterisiert. Für weiterführende Informationen sei auf die entsprechende Veröffentlichung von WÖLK et al. verwiesen.²⁷⁰

In ITC-Experimenten unter Verwendung der Malonamide der 1. Generation stellte sich heraus, dass für zahlreiche vesikuläre Lipofektionssysteme Probleme hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auftraten. So zeigten verschiedene Liposomenchargen bei gleicher Lipidzusammensetzung unterschiedliche Reaktionswärmen und Titrationsendpunkte bei der Untersuchung der Komplexierung von DNA (siehe Anhang Abb.S-8). Diese Beobachtung kann mit Hilfe des Vesikeltyps begründet werden: So entstehen bei der verwendeten Liposomenbildungsmethode (Filmbildungsmethode mit anschließender Ultraschallbehandlung) Mischungen aus MLV, LUV und SUV.^{36,39,296} Folglich werden durch Entmischungserscheinungen sowie durch Unterschiede in der Membrananzahl (Lamellarität) der Liposomen in verschiedenen Liposomenchargen gleicher Lipidkonzentration unterschiedliche Mengen an positiver Ladung an den Vesikeloberflächen präsentiert. Dies kann wiederum Einfluss auf das Komplexierungsverhalten haben. Zusätzlich finden bei der DNA-Komplexierung durch unterschiedliche Vesikeltypen auch Umlagerungs- und Reorganisationsprozesse in den Lipidaggregaten in verschieden starkem Ausmaß statt, welche auch mit detektierbaren Wärmeänderungen einhergehen.²²⁷ Folglich können unterschiedliche Prozesswärmen durch Verwendung verschiedener Vesikeltypen für die DNA-Komplexierung detektiert werden.

Die Herstellung von einheitlichen unilamellaren Vesikeln, wie z.B. durch Extrusion, könnte zu einer besseren Reproduzierbarkeit der ITC-Experimente führen. Extrusionsversuche zeigten jedoch, dass die verwendeten Cytofektine stark an Polycarbonatmembranen binden, wodurch diese Methode der Vesikelpräparation nicht genutzt werden konnte.

Im Gegensatz zu vesikulären Systemen sind mizellare Transfektionssysteme reproduzierbar herstellbar. So aggregieren Mizellbildner (wie **TO-VI**) bei gleicher Konzentration im selben Dispersionsmedium oberhalb der CMC reproduzierbar zu Mizellen, wobei bei gleicher Lipidkonzentration die Oberfläche der dispergierten Phase geringeren Schwankungen als bei Dispersionen von multilamellaren Liposomen unterworfen ist. Folglich bietet sich die ITC als Werkzeug für die Untersuchung des Komplexierungsverhaltens zwischen kationischen Mizellen und DNA an. Für die folgenden Untersuchungen wurde beispielhaft **TO-VI** verwendet. Analoge Untersuchungen wurden mit **TT-VI** durchgeführt und in WÖLK et al. veröffentlicht.²⁹⁷

Zunächst wird die **TO-VI**-zu-DNA-Titration in HEPES-Puffer (pH 7,3) betrachtet (Abb.53a,b). Zu Beginn der Titration werden ausschließlich exotherme Prozesse detektiert. Die Reaktionsenthalpie ist hier deutlich negativer als die Enthalpie des Titrationsprozesses einer **TO-VI**-Dispersion gleicher Konzentration in reinen Puffer (vergleiche Abb.51, Kap.3.4.2). Bei $n_{\text{TO-VI}}/n_{\text{Nuk}}$ -Werten kurz vor dem Titrationsendpunkt (*TEP*, Ermittlung siehe Anhang Abb.S-9 und Abb.S-10) treten endotherme Prozesse auf. Betrachtet man nun die DNA-zu-**TO-VI**-Titration, so ergibt sich für diesen Titrationsprozess eine stark veränderte Titrationskurve (Abb.53c,d). Bis zum Erreichen des *TEP* treten endotherme Signale auf, welche von exothermen Prozessen überlagert sind. Wie sind diese Unterschiede bei der Umkehr des Titrationsprozesses zu interpretieren?

Bei beiden Titrationsprozessen treten zu Beginn des Experiments unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse zwischen Lipid und DNA in der Reaktionszelle auf. Dies führt zu einem unterschiedlichen Ausmaß der DNA-Komplexierung in den einzelnen Titrations-schritten. Im ersten Fall, wenn das Lipid zu einer in der Messzelle vorgelegten DNA-Lösung titriert wird, interagiert zu Beginn eine kleine Anzahl an Lipidmolekülen mit einem großen Überschuss an DNA, so dass das Cytofektin nur eine geringe Anzahl der freien Bindungsstellen an der DNA besetzt. Mit fortschreitender Titration werden weitere freie Cytofektinbindungsstellen an der DNA besetzt, was in einem kontinuierlichen Lipoplexaufbau bis zum Erreichen des *TEP* resultiert. Dem gegenüber interagiert bei der DNA-zu-**TO-VI**-Titration eine geringe Menge an DNA-Molekülen mit einem großen Überschuss an Cytofektinen (Monomere und Mizellen). Als Konsequenz wird die gesamte DNA in einem Titrations-schritt komplexiert. Bei dieser Titrationsvariante wird im Vergleich zur **TO-VI**-zu-DNA-Titration weniger kationisches Lipid benötigt (siehe *TEP* Tab. 19).

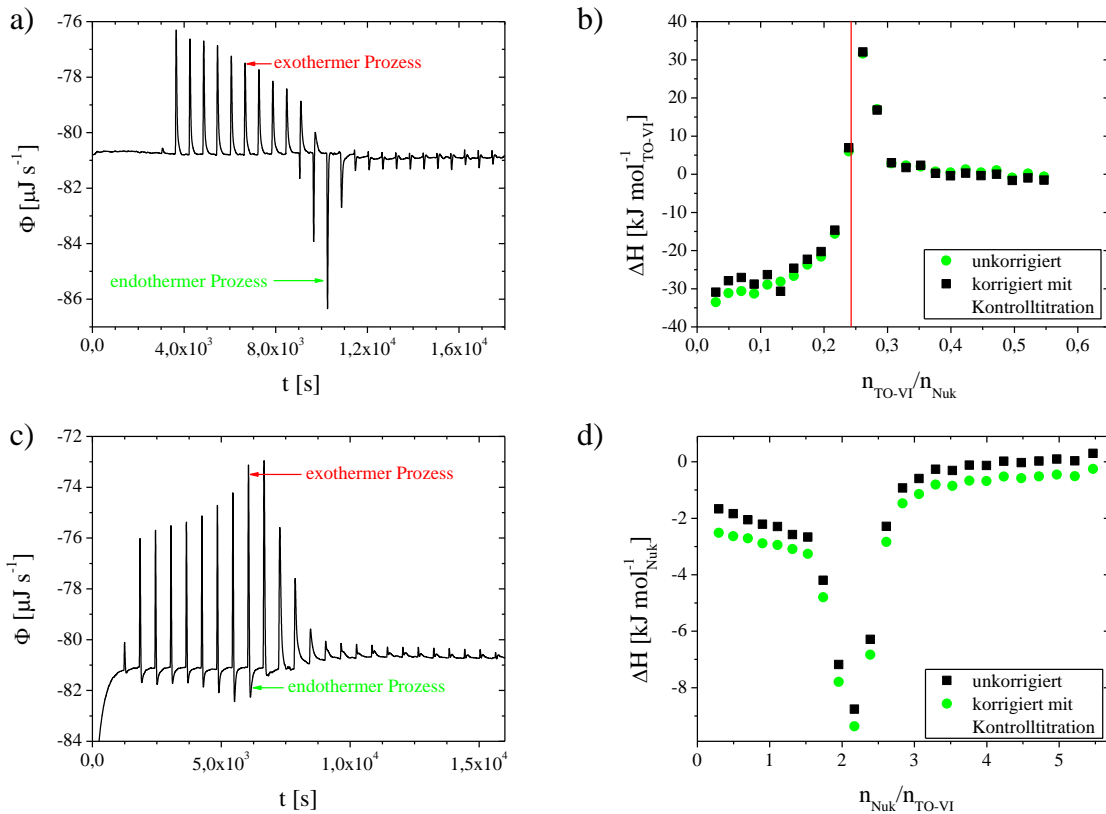


Abb.53: a) Wärmestrom/Zeit-Profil und b) Prozesswärmernormalisiert auf die Stoffmenge des injizierten **TO-VI** als Funktion von $n_{\text{TO-VI}}/n_{\text{Nuk}}$ in der Reaktionszelle für die **TO-VI**-zu-DNA-Titration ($c_{\text{spDNA}} = 0,45 \text{ mM}_{\text{Nuk}}$, $c_{\text{TO-VI}} = 0,84 \text{ mM}$) in HEPES-Puffer pH 7,3. Die rote Linie markiert den Punkt, an dem die für **TO-VI** zuvor ermittelte CMC in der Reaktionszelle theoretisch erreicht ist. c) Wärmestrom/Zeit-Profil und d) Prozesswärmernormalisiert auf die Stoffmenge der injizierten DNA als Funktion von $n_{\text{Nuk}}/n_{\text{TO-VI}}$ in der Reaktionszelle für die DNA-zu-**TO-VI**-Titration ($c_{\text{TO-VI}} = 0,26 \text{ mM}$, $c_{\text{spDNA}} = 4,85 \text{ mM}_{\text{Nuk}}$) in HEPES-Puffer pH 7,3. Im Wärmestrom/Zeit-Profil treten exotherme Prozesse durch positive Peaks in Erscheinung.

Wie sind nun die biphasischen Peaks bei der DNA-zu-**TO-VI**-Titration zu interpretieren? Ein ähnliches Phänomen wurde bereits von PECTOR et al. beschrieben.²²⁹ Hier wird das biphasische Verhalten wie folgt erklärt: Der exotherme Prozess reflektiert die elektrostatische Komponente der Komplexbildung (Interaktion der Phosphatgruppen der DNA mit den protonierten Aminogruppen der Lipide), während der endotherme Prozess aus der Lipid/DNA-Reorganisation resultiert. In den Experimenten dieser Arbeit äußert sich dieser Reorganisationsprozess als Präzipitation der Lipoplexe – eine Beobachtung, welche auch in der Literatur beschrieben ist.²²⁷⁻²²⁹ Aufgrund der fehlenden elektrostatischen Stabilisierung tendieren vor allem neutrale Lipoplexe zur Koagulation und Präzipitation (siehe Kap. 3.4.3.2). Die Komplexbildung ist vermutlich für die exotherme Prozesswärme verantwortlich, welche von der endothermen Prozesswärme des Koagulationsprozesses überlagert wird. Beide Prozesse finden bei der DNA-zu-**TO-VI**-Titration in einem Titrationsschritt statt. Die Theorie kann auch auf die **TO-VI**-zu-DNA-Titration übertragen werden. Neutrale Komplexe und somit Koagulationsprozesse treten lediglich am *TEP* auf, an welchem in der ITC-Titrationskurve endotherme Prozesswärmernormalisiert beobachtet werden (Abb. 53a).

Vergleicht man die in der Literatur beschriebenen ITC-Untersuchungen von Lipoplexbildungsprozessen, so werden überwiegend endotherme Prozesswärmen erwähnt.^{77,227,228,231,232}

Eine Ausnahme bildet die Komplexierung von DNA durch DOTAP/DOPE-Vesikel.⁷⁷ In diesem Fall wird die exotherme Prozessenthalpie für die Lipoplexbildung der Protonierung der PE-Aminogruppe in DOPE zugeschrieben. Die in der Arbeit beobachteten Prozessenthalpien für die Lipoplexbildung mit **TO-VI** sind ebenfalls exotherm. Um Änderungen im Protonierungsstatus während der Lipoplexbildung zu ermitteln, wurden ergänzende ITC-Experimente in MES- und TRIS-Puffer durchgeführt.

MES, HEPES und TRIS besitzen unterschiedliche Dissoziationsenthalpien (MES: $\Delta H_{\text{Diss}} = 12,7 \text{ kJ mol}^{-1}$, HEPES: $\Delta H_{\text{Diss}} = 16,4 \text{ kJ mol}^{-1}$, TRIS: $\Delta H_{\text{Diss}} = 47,3 \text{ kJ mol}^{-1}$).²⁹⁸ Die Gegenüberstellung der ITC-Titrationskurven in den verschiedenen Puffersystemen ist in Abb.54 dargestellt. Der *TEP* wird durch die Puffersubstitution für beide Titrationsrichtungen nicht beeinflusst. Dem gegenüber variieren die Prozesswärmen (Tab.18) in Abhängigkeit vom Puffersystem, was auf einen Protonenübergang während des Lipoplexbildungsprozesses hinweist. Die Protonenaktivität des Lösungsmittels wird durch den Puffer konstant gehalten, wodurch zusätzlich zu der Wärme, welche der Komplexbildung zuzuschreiben ist, die Wärme der Pufferaktivität erfasst wird.

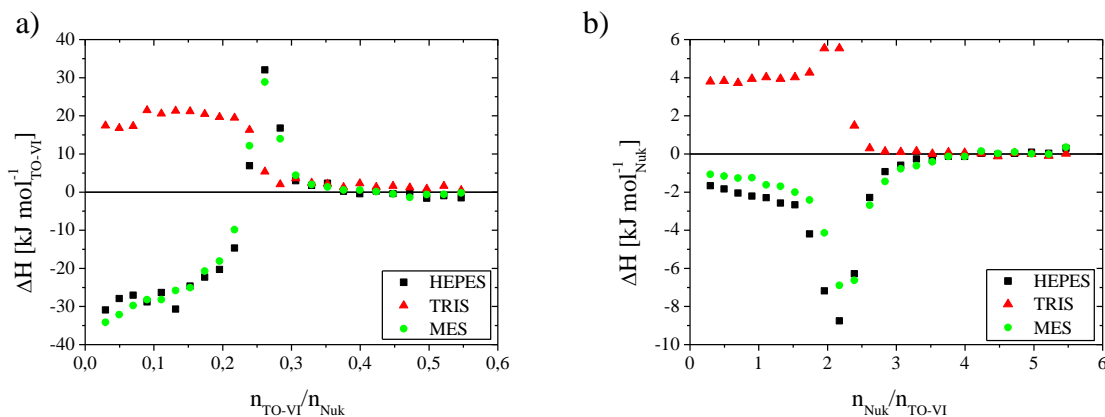


Abb.54: Prozesswärmen (korrigiert mittels Kontrolltitration) für den Komplexbildungsprozess zwischen sspDNA und **TO-VI** in drei Puffersystemen (HEPES, TRIS und MES) bei pH 7,3. a) Prozesswärmen normalisiert auf die Stoffmenge des injizierten Lipids für die **TO-VI**-zu-DNA-Titration ($c_{\text{sspDNA}} = 0,45 \text{ mM}_{\text{Nuk}}$, $c_{\text{TO-VI}} = 0,84 \text{ mM}$). b) Prozesswärmen normalisiert auf die Stoffmenge der injizierten DNA für die DNA-zu-**TO-VI**-Titration ($c_{\text{TO-VI}} = 0,26 \text{ mM}$, $c_{\text{sspDNA}} = 4,85 \text{ mM}_{\text{Nuk}}$).

An dieser Stelle soll der Ursprung von Protonierungsreaktionen während der Lipoplexbildung diskutiert werden. Ein Transfer der Aminogruppen in **TO-VI** bzw. der Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats aus einer wässrigen Umgebung in ein Milieu mit niedrigerer Dielektrizitätskonstante, wie beispielsweise das des Lipoplexinneren, destabilisiert die geladene und stabilisiert die ungeladene Form solcher (de)protonierbaren funktionellen Gruppen. Dies geht mit einer Änderung des apparenten pK_a -Werts (pK_a^{app}) einher.²⁹⁹ Eine weitere Erklärung liefert

der Sachverhalt, dass negativ geladene Oberflächen (DNA-Moleküle) Protonen akkumulieren, wodurch der lokale pH-Wert an der Oberfläche sinkt. Bei Bindung von aminofunktionalisierten Lipiden an DNA kann sich somit der Protonierungsgrad der Cytosine ändern.²⁹⁹

Tab. 18: Vergleich der mit Hilfe der ITC ermittelten TEP - und ΔH_{Tot} -Werte in Abhängigkeit vom Puffersystem. Es sind sowohl die Ergebnisse für die **TO-VI**-zu-DNA- als auch die DNA-zu-**TO-VI**-Titration dargestellt. Der jeweilige Puffer (20 mM) wies einen pH-Wert von 7,3 auf. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde der TEP in N/P-Verhältnisse umgerechnet ($N/P = 6n_{TO-VI}/n_{Nuk}$)

Puffer	TO-VI-zu-DNA		DNA-zu-TO-VI	
	TEP	$\Delta H_{Tot} \pm s [kJ mol^{-1}_{TO-VI}]$	TEP	$\Delta H_{Tot} \pm s [kJ mol^{-1}_{Nuk}]$
HEPES	N/P 1,9	$-26,5 \pm 3,6$	N/P 2,2	$-2,2 \pm 0,4$
MES	N/P 1,9	$-29,0 \pm 3,3$	N/P 2,2	$-1,9 \pm 0,9$
TRIS	N/P 1,7	$19,6 \pm 1,8$	N/P 2,4	$3,9 \pm 0,1$

Die Enthalpie des Gesamtprozesses (ΔH_{Tot}) und die Dissoziationsenthalpie des Puffers (ΔH_{Diss}) stehen in folgendem linearen Zusammenhang:²⁹⁹

$$\Delta H_{Tot} = p \times \Delta H_2 + \Delta H_1 + p \times \Delta H_{Diss} \quad (\text{Gl. 10}).$$

Diese Gleichung erlaubt es die Anzahl der migrierten Protonen (p) während des Komplexbildungsprozesses zu bestimmen. Dabei ist ΔH_2 die Dissoziationsenthalpie des Reaktanden, welcher das Proton aufnimmt/abgibt, und ΔH_1 die Assoziationsenthalpie der Komplexbildung. Bei Anwendung auf das Pufferexperiment wurde eine Protonenaufnahme (positives p) für die Lipoplexbildung ermittelt, wobei während der **TO-VI**-zu-DNA-Titration 1,5 Protonen pro zutitriertem Lipidmolekül und während der DNA-zu-**TO-VI**-Titration 0,2 Protonen pro zutitriertem Nukleotid aufgenommen werden (vergleiche Tab. 19).

Welche funktionellen Gruppen können für die Protonenaufnahme verantwortlich sein? Die basischen Funktionen der DNA-Purine/Pyrimidine sind in Wasserstoffbrückenbindungen im DNA-Inneren involviert und stehen theoretisch nicht für den Protonierungsprozess zur Verfügung. Die Phosphatgruppen der DNA (pK_a -Wert der OH-Funktion des Phosphorsäure-diesters ist ~ 2) sind unter den gewählten experimentellen Bedingungen bei pH 7,3 deprotoniert. Die ϵ -Aminogruppe des Lipid-gebundenen Lysins (pK_a -Wert ~ 10) ist bei pH 7,3 protoniert. Demgegenüber ist der Protonierungsgrad der α -Aminogruppe dieses Lysinbausteins in **TO-VI** ($pK_a \sim 9$) am wahrscheinlichsten für geringe pH-Wert-Änderungen der Mikroumgebung anfällig, so dass diese Aminogruppe für die Protonenaufnahme verantwortlich ist. Zusätzlich ist nicht auszuschließen, dass ein unbekannter Anteil der 6 primären Aminogruppen von **TO-VI** in intra- bzw. intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen involviert ist. Konformationsänderungen im Lipid während des Komplexbildungsprozesses

können zum Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen führen, wodurch Aminofunktionen für Protonierungsreaktionen zugänglich werden.

ANTIPINA et al. beschrieben ebenfalls Protonierungseffekte während der Lipoplexbildung.^{300,301} So konnte am LANGMUIR-Film gezeigt werden, dass das unprotonierte monovalente Cytoskelettfektin AHHP in der Lage war DNA zu binden. Dieses Verhalten indiziert lokale pH-Veränderungen oder pK_a^{app} -Verschiebungen während der DNA-Bindung, wodurch das Cytoskelettfektin protoniert und in Folge dessen die DNA-Bindung forciert wird.

Abschließend soll das komplexe Zusammenspiel verschiedener Prozesse während der Lipoplexbildung im Hinblick auf die Auswertung der ITC-Experimente diskutiert werden.

(1) Wird Lipid schrittweise zur DNA gegeben, tritt zu Beginn der Titration zusätzlich zum Komplexbildungsprozess der Demizellisationsprozess auf. Es stellt sich nun die Frage, ob nur Mizellen oder auch Lipidmonomere die DNA komplexieren. Das Titrationsprofil der **TO-VI**-zu-DNA-Titration zeigt deutlich, dass **TO-VI**-Monomere befähigt sind DNA zu komplexieren (Abb. 53b). Wären nur Mizellen dazu befähigt, so würden bis zum Erreichen der CMC in der Messzelle lediglich die Demizellisationswärmen ermittelt und Komplexbildungswärmen erst mit Erreichen der CMC detektiert werden. Die Interaktion von Mizellen mit der DNA konnte nicht bewiesen werden, ist aber aus elektrostatischer Sicht anzunehmen. Bei pH 7,3 besitzen **TO-VI**-Mizellen eine hohe Ladungsdichte: Unter Verwendung von $A_{KG} = 120 \text{ \AA}^2$ (siehe Kap. 3.4.3.5) und der Annahme, dass lediglich die ϵ -Aminogruppen protoniert sind, ergibt sich eine Ladungsdichte von $\rho = e(40 \text{ \AA}^2)^{-1}$. DNA hat eine deutlich geringere Ladungsdichte von $\rho = e(110 \text{ \AA}^2)^{-1}$.⁶⁰

(2) Ein wichtiger Schritt in der Lipoplexbildung ist die elektrostatische Anziehung zwischen der negativ geladenen DNA und den kationischen Lipiden. Des Weiteren wird der Entropiegewinn durch Freisetzung von Gegenionen als wichtige treibende Kraft für die Lipoplexbildung diskutiert.^{60,227,232} Im Rahmen der ITC-Experimente dieser Arbeit gelang es nicht die Prozessentropie zu ermitteln. Grund hierfür ist der multifaktorielle Charakter der Lipoplexbildung, wodurch kein einfaches thermodynamisches Modell für die Auswertung der Titrationskurven angewendet werden konnte (die Gleichgewichtskonstante, welche mit Hilfe solcher Modelle ermittelt wird, ist für die Berechnung der Entropie notwendig). DNA besitzt verschiedene Bindungsstellen für Cytoskelettfektine:

- i) Phosphatgruppen in Nachbarschaft zu unbesetzten Bindungsstellen (isolierte Phosphatgruppen) und
- ii) Phosphatgruppen in Nachbarschaft zu bereits besetzten Bindungsstellen.²³³

Für den zweiten Fall (ii) muss, zusätzlich zu der Wechselwirkung zwischen Phosphat und Cytofektin, die Interaktion benachbarter Cytofektine für die Entwicklung eines Bindungsmodells berücksichtigt werden. Zu diesen Lipid/Lipid-Interaktionen zählen z.B. Wasserstoffbrückenbindungen im Bereich des Rückgrats, elektrostatische Abstoßung und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Alkylketten. Des Weiteren wird der Komplexierungsprozess durch die helikale DNA-Struktur mit „kleiner und großer Furche“ und der konformationellen Flexibilität der **TO-VI**-Kopfgruppe wesentlich vielschichtiger, was eine Aufstellung eines realistischen thermodynamischen Bindungsmodells erschwert.

(3) Die Wechselwirkungen zwischen den Lipidalkylketten führen zu der finalen kompakten Lipoplexstruktur. Je mehr Cytofektine an einem DNA-Strang binden, desto häufiger kommt es zu Wechselwirkungen zwischen den Alkylketten verschiedener Lipidmoleküle, welche am selben oder an anderen DNA-Strängen gebunden sind. Dies führt zu einer Kompaktierung der DNA-Stränge, wobei durch die Abschirmung der Phosphatgruppen durch die Cytofektine auch verschiedene DNA-Stränge zusammengeführt werden. Es kommt zur Ausbildung der finalen Lipoplexstruktur, auf welche in Kap. 3.4.3.4 eingegangen wird.

Tab. 19: Gegenüberstellung der für den Komplexbildungsprozess zwischen sspDNA und **TO-VI** mit Hilfe der ITC ermittelten Enthalpie- und *TEP*-Werte mit den ermittelten isoelektrischen Punkten (*IEP*, Kap. 3.4.3.2) und den effektivsten N/P-Verhältnissen im ONPG-Assay (Kap. 4.2). Es werden sowohl die **TO-VI**-zu-DNA- als auch die DNA-zu-**TO-VI**-Titration betrachtet. Zusätzlich sind die während der Lipoplexbildung aufgenommenen Protonen (*p*) mit angegeben. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden sowohl *TEP* als auch *IEP* in N/P-Verhältnisse umgerechnet ($N/P = 6n_{TO-VI}/n_{Nuk}$).

ITC						ζ -Potential	effektivstes N/P-Verhältnis in-vitro ^[f]
<i>c</i> in Spritze [mM]	<i>c</i> in Zelle [mM]	$\Delta H_{Tot} \pm s$ [kJ mol ⁻¹] ^[a]	ΔH_{Komp} [kJ mol ⁻¹] ^{[a][b]}	<i>p</i> ^[c]	<i>TEP</i> ^[d]	<i>IEP</i> ^[e]	
TO-VI: 0,84	Nukleotid: 0,45	-26,5 ± 3,6	-48,6	1,5	N/P 1,9	N/P 2,0	N/P 4
Nukleotid: 4,85	TO-VI : 0,26	-2,2 ± 0,4	-4,6	0,2	N/P 2,2	N/P 1,9	N/P 4

[a] kJ mol⁻¹_{TO-VI} wenn die Spritze mit Lipid gefüllt ist und kJ mol⁻¹_{Nuk} wenn die Spritze mit DNA gefüllt ist.

[b] Prozessenthalpien ohne Pufferdissoziationsenthalpien (Komp = Komplexbildungsprozess) über Gl. 12 berechnet.

[c] Über Gl. 10 berechnet: *p* = gebundene Stoffmenge an Protonen in mol pro mol Titrationsagenz.

[d] Bestimmung des Titrationsendpunkts siehe Abb. S-9 und Abb. S-10 Anhang.

[e] Mittels sigmoigaler Kurvenanpassung des ζ -Potential/Konzentrations-Profiles nach BOLTZMANN ermittelter isoelektrischer Punkt (siehe Abb. S-11 und Abb. S-12 Anhang).

[f] Siehe Kap. 4.2.

Der multifaktorielle Charakter des Komplexierungsprozesses, welcher in den vorangegangenen drei Punkten beschrieben wurde, erlaubt lediglich eine Modell-freie Methode für die Auswertung der in dieser Arbeit beschriebenen ITC-Experimente (Ermittlung von ΔH_{Tot} und *TEP*). Die durch Integration des Wärmestrom/Zeit-Profiles ermittelten Prozesswärmern

ΔH_{Tot} beinhalten auch die Wärmebeiträge der Pufferdissoziation. Gl. 12 ermöglicht es, unter Annahme von Gl. 11, die Enthalpie der Komplexbildung ΔH_{Komp} von ΔH_{Diss} zu separieren:

$$\Delta H_{Komp} = p \times \Delta H_2 + \Delta H_1 \quad (\text{Gl. 11}),$$

$$\Delta H_{Tot} = \Delta H_{Komp} + p \times \Delta H_{Diss} \quad (\text{Gl. 12}).$$

Die im Rahmen der ITC-Experimente zur Lipoplexbildung ermittelten ΔH_{Komp} -Werte sind in Tab. 19 zusammengefasst.

3.4.3.2 Zetapotential- und DLS-Messungen

Um aufzuklären, ob der Titrationsendpunkt der ITC-Experimente mit dem isoelektrischen Punkt (*IEP*) der DNA-Komplexierung übereinstimmt, wurden ζ -Potentialmessungen durchgeführt. Am *IEP* sind die negativen Ladungen der DNA durch die positiven Ladungen von **TO-VI** neutralisiert.

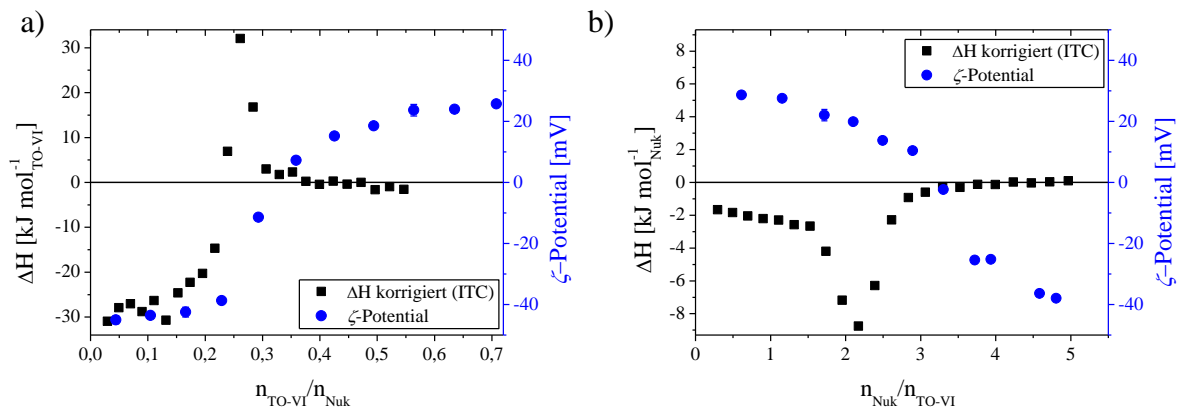


Abb. 55: Gegenüberstellung des ζ -Potentials (dreifache Bestimmung) und der Prozessenthalpie der ITC-Experimente für die Lipoplexbildung als Funktion des molaren Verhältnisses zwischen Titrand und Titrator in HEPES-Puffer pH 7,3 für die **TO-VI**-zu-DNA- (a) als auch die DNA-zu-**TO-VI**-Titration (b). Die horizontale Linie markiert den Neutralpunkt des ζ -Potentials. Die für die ζ -Potentialbestimmung verwendeten Konzentrationen wurden an die ITC-Experimente angepasst.

Das ζ -Potential, als Funktion des molaren Verhältnisses der Komplexbildungsteilnehmer im Vergleich mit den Prozesswärmern der ITC-Experimente, ist in Abb. 55 dargestellt. Für beide Versuche (**TO-VI**-zu-DNA-Titration und DNA-zu-**TO-VI**-Titration) wurden sigmoidale ζ -Potentialkurven, welche die Abszisse ($\zeta = 0$ mV) schneiden, ermittelt (siehe BOLTZMANN-Funktionen im Anhang Abb.S-11 und Abb.S-12). Bei Molenbrüchen mit Lipidüberschuss zeigen die Lipoplexe eine positive Gesamtladung, bei Molenbrüchen mit DNA-Überschuss dagegen eine negative Gesamtladung. Diese „Überladungsphänomene“ sind für die Lipoplexbildung in der Literatur bereits beschrieben.^{59,62} Des Weiteren zeigt die ζ -Potentialkurve ab einem gewissen Lipid- oder DNA-Überschuss einen Plateaubereich, in dem sich das ζ -Potential kaum verändert. Dieses Plateau liegt unter den gewählten Bedingungen bei 30 mV (Lipidüberschuss) bzw. -40 mV (DNA-Überschuss).

Die ζ -Potentialkurve gibt zudem Hinweise über die kolloidale Stabilität der Lipoplex-dispersionen. Neutrale Partikel (Partikel am *IEP*) neigen zur Aggregation. Dieses Phänomen kann mit Hilfe der DLVO-Theorie beschrieben werden.^{41,302} Ein Minimum der Partikelladung am *IEP* führt dazu, dass anziehende Kräfte (wie VAN-DER-WAALS-Kräfte), welche nur auf kurzen Distanzen wirksam werden, überwiegen. Mit steigender Partikelladung überwiegen abstoßende elektrostatische Kräfte zwischen den Partikeln. Das Dispersionssystem ist kolloidal stabilisiert. In den Plateaubereichen der ζ -Potentialkurve ist die elektrostatische Stabilisierung der Dispersion am größten, was auch in den DLS-Messungen zum Ausdruck kommt (Abb.56). So wurden in den Plateaubereichen der ζ -Potentialkurve Partikel mit Radien unter 200 nm ermittelt. Dagegen konnten im Bereich des *IEP* Partikel mit Radien über 2 μm detektiert werden.

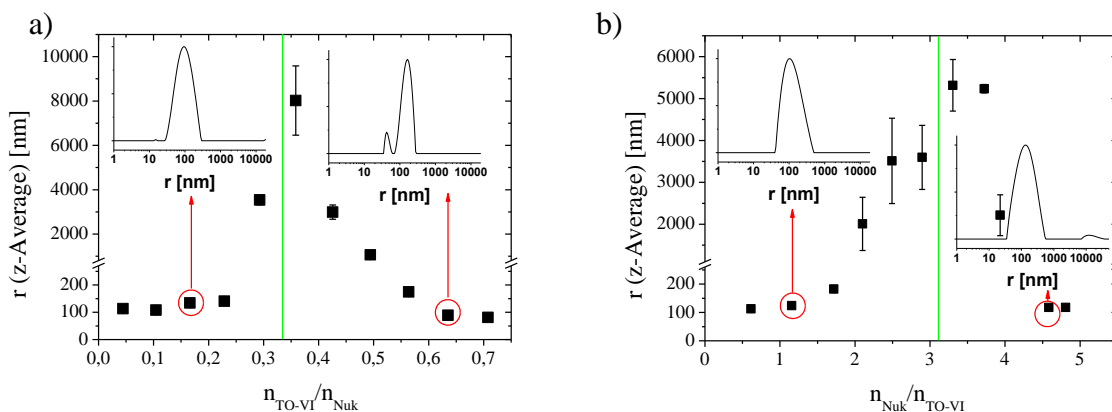


Abb.56: Partikelgröße von Lipoplexdispersionen (angegeben als z-Average-Radius) als Funktion des molaren Verhältnisses zwischen Titrand und Titrator (dreifache Bestimmung) in HEPES-Puffer pH 7,3 für die **TO-VI**-zu-DNA- (a) als auch die DNA-zu-**TO-VI**-Titration (b). Die eingefügten Diagramme stellen die intensitätsgewichtete Größenverteilung der mit Rot markierten z-Average-Werte dar (y-Achse: Intensität [a.u.]). Die grüne Linie markiert den *IEP* aus den ζ -Potentialmessungen.

Der Vergleich der ζ -Potentialkurve mit der Enthalpiekurve der ITC-Messungen zeigt, dass der *IEP* der ζ -Potentialmessung mit dem *TEP* der ITC-Experimente für beide Titrationsrichtungen identisch ist (vergleiche Abb.55 und Tab.19 Kap.3.4.3.1). Das beobachtete Phänomen der „Überladung“ zeigt, dass sowohl Lipid- als auch DNA-Überschuss zum zusätzlichen Einbau von Molekülen (**TO-VI** oder DNA) in die Lipoplexe führt, was mit einer Aufladung dieser einhergeht. Die treibende Kraft für dieses Phänomen ist der Entropiegewinn durch die Freisetzung von Gegenionen.³⁰³ Diese „Überladungsphänomene“ sind durch elektrostatische Abstoßungseffekte im Lipoplexinneren begrenzt, was in den Plateuregionen der ζ -Potentialkurven zum Ausdruck kommt. Diese elektrostatische Abstoßung tritt sowohl zwischen den inkorporierten negativ geladenen DNA-Strängen als auch zwischen den kationischen Lipiddoppelschichten auf.

Theoretisch würden die beschriebenen „Überladungseffekte“ zu folgender Beobachtung führen: $IEP \neq TEP$. Der zusätzliche Moleküleinbau über den Ladungsausgleich (IEP) hinaus müsste durch Wärmeeffekte im ITC-Experiment zu erkennen sein, wurde aber durch die Übereinstimmung von TEP und IEP nicht bestätigt. Eine Erklärung für diese Unstimmigkeit bieten Untersuchungen von CARACCILO et al.³⁰³ So wurde demonstriert, dass lediglich die Lipoplexpräparationen, welche in einem Mischungsschritt präpariert wurden, wie es bei der Lipoplexpräparation für die ζ -Potentialmessung im Rahmen dieser Arbeit praktiziert wurde (siehe Kap. 6.2.6), zu „Überladungseffekten“ führten. Voraussetzung ist der Überschuss eines Komplexbildungspartners bei der Komplexierung. Bei Lipoplexbildung durch langsame Erhöhung der Cytofektinkonzentration wird der Komplexierungsprozess mit dem Entstehen neutraler Lipoplexe beendet. Ein Einbau überschüssiger Lipide in neutrale Komplexe ist nach CARACCILO et al. nicht möglich. Die **TO-VI**-zu-DNA-Titration (ITC) ist eine Komplexbildung in mehreren Schritten und, in Übereinstimmung mit CARACCILO et al.,³⁰³ mit der Bildung des neutralen Komplexes abgeschlossen ($IEP = TEP$). Das Auftreten eines Präzipitats mit Partikelgrößen $>1 \mu\text{m}$ nach Beendigung der ITC-Experimente unterstützt diese These, da neutrale Lipoplexe zur Koagulation und Präzipitation neigen.

Demgegenüber ist die DNA-zu-**TO-VI**-Titration (ITC) zu Beginn des Experiments ein Komplexbildungsprozess in einem Mischungsschritt bei einem Überschuss an Cytofektin, wodurch positiv geladene Lipoplexe in kolloidal stabiler Dispersion erwartet werden sollten. Im Experiment entstand jedoch ein Präzipitat und der ermittelte TEP stimmte auch im Fall der DNA-zu-**TO-VI**-Titration mit dem IEP überein. Diese Beobachtung kann durch einen Lipidtransfer von positiv geladenen Lipoplexen mit **TO-VI**-Überschuss auf unkomplexierte oder unvollständig komplexierte DNA im Verlauf des Titrationsexperiments erklärt werden. Somit entstehen neutrale Lipoplexe, welche mit dem Erreichen des TEP präzipitieren.

3.4.3.3 Untersuchung der DNA-Komplexierung mittels DSC

Die Komplexierung von DNA mit **TO-VI** wurde zusätzlich mittels DSC untersucht um den Einfluss des Komplexierungsgrads auf die DNA-Denaturierung zu ermitteln. Die Ergebnisse sind in Abb.57 dargestellt. Die 1. Heizkurve der sspDNA-Lösung zeigt eine breite endotherme Umwandlung mit einem Maximum bei 60°C . Diese Umwandlung stimmt mit Literaturwerten der Denaturierungstemperatur für dsDNA₂₀₀₀ (dsDNA \rightarrow ssDNA) überein.³⁰⁴ UV-VIS-Absorptionsuntersuchungen bei 260nm unterstützen diese Annahme. In der 2.-5. Heizkurve der sspDNA-Lösung wurden keine Umwandlungen beobachtet. Dies zeigt, dass im Zeitraum der gewählten experimentellen Bedingungen der DSC-Experimente keine

Renaturierung zum DNA-Doppelstrang stattfand. Die Fähigkeit der Annelierung von ssDNA zur dsDNA in DSC-Experimenten hängt von der gewählten Kühlrate und dem Equilibrierungszeitraum vor dem folgenden Heizzyklus ab. Die im beschriebenen Experiment gewählten Einstellungen ermöglichen es sowohl Veränderungen der DNA-Denaturierung, durch den Vergleich der 1. Heizkurven verschiedener Experimente, zu erfassen, als auch Rückschlüsse auf die DNA-Renaturierung durch den Vergleich der 1. und 5. Heizkurve eines DSC-Experiments zu ziehen.

Die Zugabe von **TO-VI** zur DNA verändert das thermotrope Verhalten der DNA. Bei einem N/P-Verhältnis von 0,5 und 1 treten zwei endotherme Umwandlungen bei 60 °C und 80 °C in der 1. Heizkurve auf (Abb. 57).

Sie unterscheiden sich jedoch in den zugehörigen Prozessenthalpien. Die 5. Heizkurve zeigt in beiden Fällen eine sehr breite Umwandlung zwischen 40 °C und 90 °C mit geringer Enthalpie.

Bei einem N/P-Verhältnis von 2 verschwindet die Umwandlung bei 60 °C in der 1. Heizkurve und es ist lediglich eine Umwandlung bei 80 °C vorhanden. Die folgenden Heizkurven zeigen weiterhin die breite Umwandlung zwischen 40 °C und 90 °C. Bei einem N/P-Verhältnis von 4 und 6 ist in der 1. Heizkurve eine Umwandlung bei ~85 °C zu erkennen, welche auch in den nachfolgenden Heizkurven erscheint. Die Umwandlungsenthalpie nimmt im Vergleich zur 1. Heizkurve ab, bleibt jedoch ab dem 3. Heizzyklus konstant. Zusätzlich tritt die breite Umwandlung zwischen 40 °C und 70 °C auf, welche auch bei den niedrigeren N/P-Verhältnissen beobachtet wurde.

Die beobachteten Umwandlungen werden dem DNA-Denaturierungsprozess zugeschrieben, da **TO-VI** in HEPES-Puffer pH 7,3 keine Umwandlung im betrachteten Temperaturbereich aufweist (siehe Anhang Abb.S-14). Die breite Umwandlung zwischen 40 °C und 90 °C im 5. Heizzyklus hat vermutlich ihre Ursache im Schmelzen partiell annelierter DNA-Stränge.

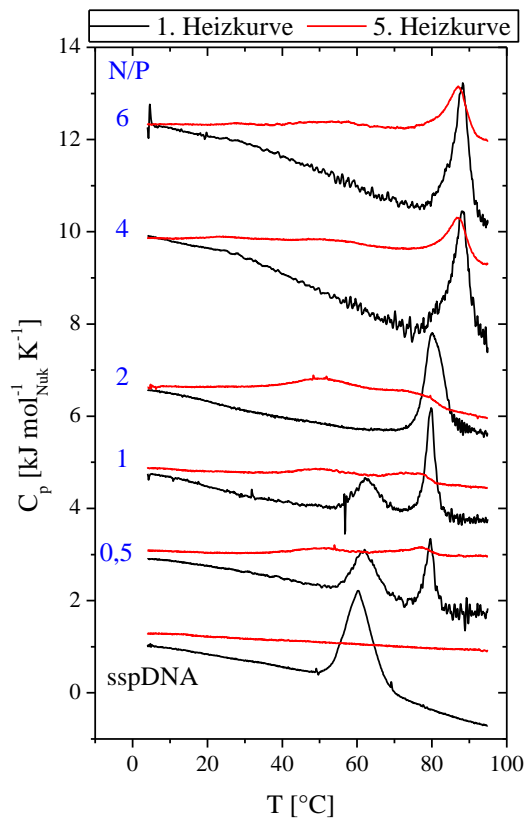


Abb. 57: DSC Heizkurven im Bereich von 2-95 °C von reiner sspDNA und sspDNA im Komplex mit **TO-VI** für verschiedene N/P-Verhältnisse (blaue Zahlen) in HEPES-Puffer pH 7,3. Die DNA-Konzentration betrug 1 mg ml⁻¹. Die Kurven wurden aus Übersichtsgründen vertikal verschoben. Die Kurven eines N/P-Verhältnisses wurden untereinander nicht verschoben. Die 5. Heizkurve repräsentiert Heizkurven 2-5 eines Experiments. Heizrate für Heiz- und Kühlzyklus: 60 K h⁻¹; Equilibrierungszeit vor Heiz- und Kühlzyklen: 10 min.

Die Komplexierung von DNA mit **TO-VI** führt zum Anstieg der Denaturierungstemperatur der DNA. So ist die 60 °C-Umwandlung bei einem N/P-Verhältnis von 0,5 und 1 der unkomplexierten DNA zuzuordnen, während die 80 °C-Umwandlung der komplexierten DNA zugewiesen werden kann. Ein Anstieg der Denaturierungstemperatur von DNA im Komplex mit kationischen Lipiden oder Polymeren ist bereits in der Literatur beschrieben.^{305,306} Die Enthalpie der Denaturierung unkomplexierter DNA nimmt mit steigendem N/P-Verhältnis ab während die Denaturierungsenthalpie der komplexierten DNA zunimmt. Das Verschwinden der beiden Umwandlungen in den nachfolgenden Heizzyklen zeigt, dass es unter den Bedingungen des DSC-Experiments nicht zur vollständigen Renaturierung der komplexierten und unkomplexierten DNA kommt. Lediglich partielle Strangannelierungen finden statt, was durch die breite Umwandlung zwischen 40 °C und 90 °C vermutet werden kann.

Bei einem N/P-Verhältnis von 2 ist die DNA-Komplexierung abgeschlossen, da lediglich die Umwandlung bei 80 °C beobachtet wird. Dies ist auch mit den Ergebnissen der ITC-Experimente und ζ -Potentialmessungen konform (siehe Tab. 19 Kap. 3.4.3.2). Auch bei diesem N/P-Verhältnis findet keine vollständige DNA-Annelierung nach dem ersten Denaturierungsprozess statt. Die Situation ändert sich bei den N/P-Verhältnissen 4 und 6. Es wird ein weiterer Anstieg der Denaturierungstemperatur der komplexierten DNA auf 85 °C ermittelt. Zusätzlich tritt diese Umwandlung mit geringerer Enthalpie in den nachfolgenden Heizzyklen auf. Folglich kann von einer vollständigen Renaturierung eines Teils der denaturierten DNA im Komplex ausgegangen werden. Die Lipoplexstruktur ermöglicht demzufolge eine schnellere Annelierung von ssDNA-Strängen nach der DNA-Denaturierung, was durch einen höheren Ordnungsgrad im Komplex erklärt werden kann.

3.4.3.4 RÖNTGEN-Untersuchungen von TO-VI-Dispersionen in An- und Abwesenheit von DNA

SAXS-Untersuchungen zur Strukturaufklärung wurden sowohl mit reinen **TO-VI** Dispersionen als auch mit **TO-VI/DNA**-Komplexen durchgeführt.

Das RÖNTGEN-Beugungsmuster einer **TO-VI**-Dispersion in HEPES-Puffer pH 7,3 im Kleinwinkelbereich ist in Abb. 58a dargestellt. Es ist lediglich ein breiter Reflex zu erkennen, welcher auf schwach zueinander korrelierte fluide Lipiddoppelschichten hinweist. Die SAXS Experimente wurden bei einer sehr hohen Konzentration von $c = 2 \text{ g ml}^{-1}$ (Faktor 2000 oberhalb der $\text{CMC}_{\text{TO-VI}}$) durchgeführt, wodurch die Ausbildung einer isotropen mizellaren Phase unwahrscheinlich ist. Die Existenz einer flüssig-kristallinen Phase ist anzunehmen, wobei es anhand des RÖNTGEN-Beugungsmusters nicht möglich ist zwischen Stapel

discoidaler Mizellen, „Bicelles“ oder anderen schwach geordneten lamellaren Phasen zu unterscheiden.

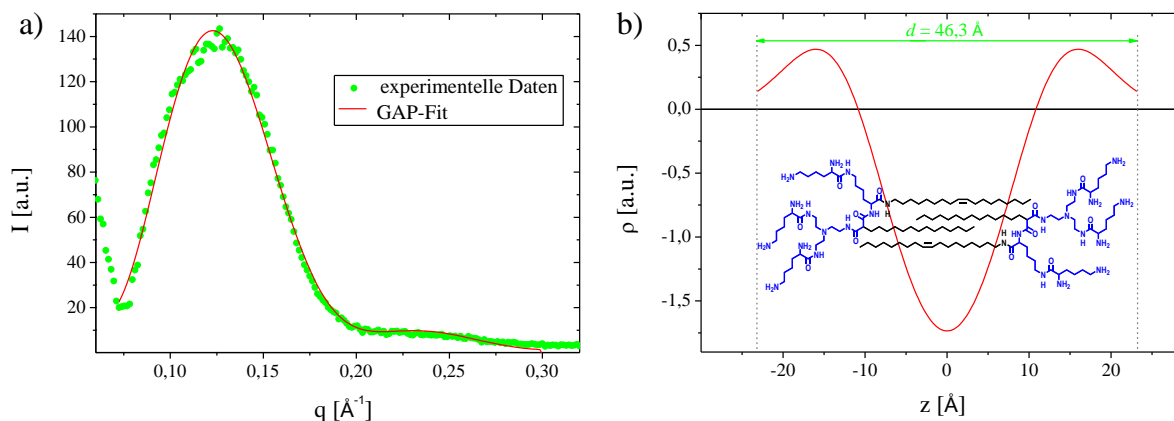


Abb. 58: a) SAXS-Diffraktogramm (experimentelle Daten und GAP-Fit) von **TO-VI** ($c = 0,2 \text{ g ml}^{-1}$) in HEPES-Puffer pH 7,3 bei 25 °C. b) Aus dem GAP-Fit resultierendes Elektronendichteprofil. z ist die Distanz in Å und ρ die Elektronendichte. Die angegebenen Strukturen stellen eine mögliche Anordnung der Lipidmoleküle in der Doppelschicht dar.

Da die Streukurve nur einen Reflex aufweist, wurde ein geeignetes Modell für die Auswertung benötigt. Für die Kurvenanpassung der Streukurve wurde der GAP-Fit (GAP 1.3 Programm von GEORG PABST)^{307,308} genutzt, welcher auf einer Abwandlung der CAILLÉ-Theorie beruht und auf L_α - und SmA -Phasen anwendbar ist. Als Ergebnis der Kurvenanpassung wird ein Elektronendichteprofil erhalten, aus dem die Dicke der Doppelschicht berechnet werden kann. Der daraus erhaltene d -Wert beträgt $46,3 \text{ Å}$ (Abb. 58b). Die neben der SAXS-Messung ermittelten WAXS-Daten waren von schlechter Qualität und ließen somit keine Auswertung bezüglich der Alkylkettenanordnung zu. Um dennoch genauere Aussagen über die Fluidität der Alkylketten in den **TO-VI**-Aggregaten machen zu können, wurden infrarotspektroskopische Untersuchungen durchgeführt. FT-IR-Messungen zeigten, dass die Alkylketten einen hohen Anteil an *gauche*-Konformeren aufweisen und sich somit im fluiden Zustand befinden (siehe Anhang Abb. S-13). Fluide Alkylketten sind kürzer als Ketten in der *all-trans*-Konformation, können aber nicht den kleinen d -Wert erklären. Die theoretische Länge der Lipidmoleküle beträgt $\sim 40 \text{ Å}$ für ein gestrecktes Lipid und $\sim 34 \text{ Å}$ für ein energieminiertes Lipid. Die einzige Erklärung für den kleinen d -Wert bietet eine Verzahnung der fluiden Alkylketten innerhalb einer Lipiddoppelschicht.

Das SAXS-Diffraktogramm einer Dispersion von **TO-VI**/sspDNA-Komplexen (N/P 1) in HEPES-Puffer pH 7,3 ist in Abb. 59a dargestellt. Das Reflexmuster ist typisch für die L_α^c -Phase. Es sind drei BRAGG-Reflexe zu erkennen, wobei die Signale bei $q_{001} = 0,115 \text{ Å}^{-1}$ und $q_{002} = 0,232 \text{ Å}^{-1}$ von der multilamellaren Anordnung der **TO-VI**-Doppelschichten mit interkalierten DNA-Strängen resultieren (L_α^c).^{58,63} Der BRAGG-Reflex bei $q_{DNA} = 0,180 \text{ Å}^{-1}$ ist

dem zweidimensionalen DNA-Gitter zuzuordnen. Die SAXS-Messungen von **TO-VI**/sspDNA-Komplexen (N/P 3) zeigen ein vergleichbares Reflexmuster mit leicht verschobenen q -Werten für die lamellare Phase ($q_{001} = 0,110 \text{ \AA}^{-1}$ und $q_{002} = 0,220 \text{ \AA}^{-1}$, $q_{DNA} = 0,180 \text{ \AA}^{-1}$, siehe Anhang Abb. S-15).

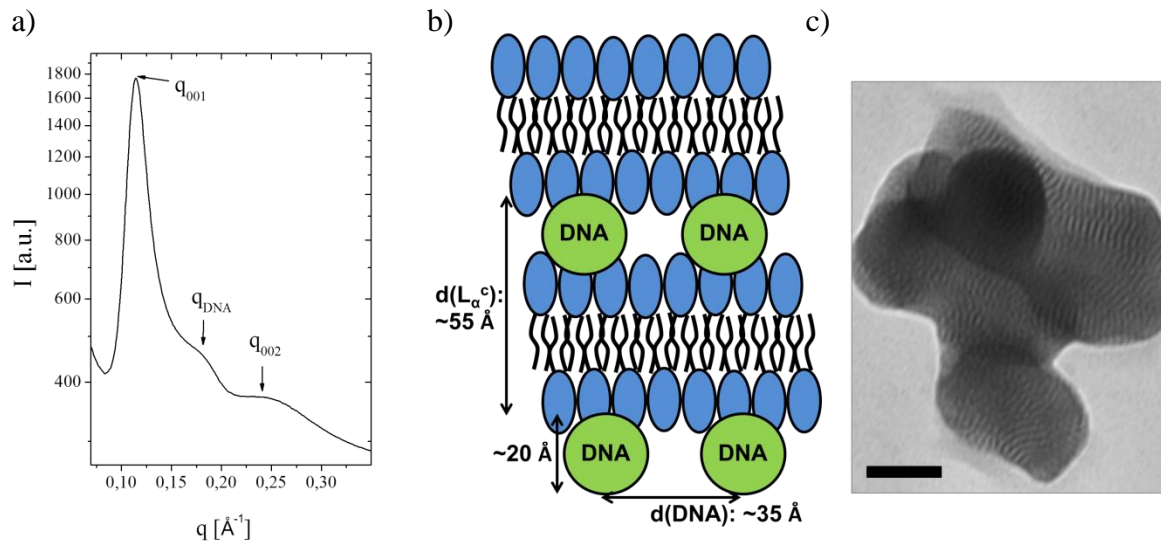


Abb. 59: a) SAXS-Diffraktogramm von **TO-VI**/sspDNA-Komplexen (N/P 1) in HEPES-Puffer pH 7,3 bei 25 °C. Die BRAGG-Reflexe bei $q_{001} = 0,115 \text{ \AA}^{-1}$ und $q_{002} = 0,232 \text{ \AA}^{-1}$ resultieren aus der multilamellaren Struktur der **TO-VI**/sspDNA-Komplexe (L_{α}^c). Der BRAGG-Reflex bei $q_{DNA} = 0,180 \text{ \AA}^{-1}$ beruht auf dem Abstand zwischen den parallel geordneten DNA-Strängen zwischen den Lipiddoppelschichten. b) Schematische Darstellung des **TO-VI**/sspDNA-Komplexes. Die Abstände $d(L_{\alpha}^c) = 55 \text{ \AA}$ und $d(DNA) = 35 \text{ \AA}$ resultieren aus dem in a) abgebildeten SAXS-Diffraktogramm. Der Durchmesser der DNA ($\sim 20 \text{ \AA}$) ist der Literatur entnommen.³⁰⁹ c) TEM-Aufnahme einer **TO-VI**/sspDNA-Komplexdispersion (N/P 3) in HEPES-Puffer ($c = 0,05 \text{ mg ml}^{-1}$). Die Probe wurde mit Uranylacetat kontrastiert. Der Balken entspricht 50 nm. Nach WÖLK et al.²⁹⁷

Die BRAGG-Reflexe der Lipoplexe bei N/P 1 ergeben folgende d -Werte ($d = 2\pi/q$): $54,6 \text{ \AA}$ für den Wiederholabstand der Lipiddoppelschicht zuzüglich einer DNA-Schicht ($d(L_{\alpha}^c)$) und $34,9 \text{ \AA}$ für den Abstand der DNA-Stränge im zweidimensionalen DNA-Gitter ($d(DNA)$) (Abb. 59b). Unter der Annahme, dass die Dicke der Lipiddoppelschicht mit den d -Werten des GAP-Fits der reinen **TO-VI**-Dispersion übereinstimmt ($46,3 \text{ \AA}$), bleiben lediglich $8,3 \text{ \AA}$ für die DNA-Schicht übrig. Dies ist jedoch zu wenig für dsDNA, welche einen Durchmesser von $\sim 20 \text{ \AA}$ aufweist.³⁰⁹ Der Sachverhalt kann nur durch eine sehr dichte Packung der DNA-Stränge zwischen den Lipiddoppelschichten erklärt werden, wobei die Wasserschicht, welche an den Lipiddoppelschichten gebunden ist, verdrängt wird. Dabei wird ein großer Teil der Hydrathülle der DNA von den Lipidkopfgruppen ersetzt. Weiterhin erlaubt die flexible Struktur der **TO-VI**-Kopfgruppe mit 3 endständigen Lysinbausteinen ein partielles Eindringen der DNA-Moleküle in den hydrophilen Bereich der Lipiddoppelschicht. Auch der $d(DNA)$ -Wert ($34,9 \text{ \AA}$) weist auf eine sehr dichte DNA-Packung hin.⁵⁹

Die Besonderheit der hier beschriebenen L_{α}^c -Phase liegt in der Verzahnung der Alkylketten innerhalb der Lipiddoppelschicht. Lamellare Lipoplexstrukturen mit verzahnten Lipiddoppel-

schichten sind selten beschrieben. KOYNOVA et al.³¹⁰ und FIELDEN et al.³¹¹ wiesen diese Struktur für Lipide in der Gelphase nach.

Der lamellare Lipoplexaufbau konnte auch elektronenmikroskopisch bestätigt werden. Abb.59c zeigt deutlich streifenförmige Strukturen in **TO-VI**/DNA-Komplexen (N/P 3). Messungen der streifenförmigen Strukturen zeigen eine Periodizität von 50 Å bis 60 Å. Diese Wiederholdistanz stimmt somit mit dem in SAXS-Experimenten ermittelten $d(L_\alpha^c)$ -Wert von 55 Å überein. TEM-Aufnahmen von **TO-VI**-Lipoplexen (N/P 1) weisen ebenfalls schichtförmige Strukturen auf, welche auf den lamellaren Lipoplexaufbau zurückzuführen sind (siehe Anhang Abb.S-16 und Abb.S-17). Es sei darauf hingewiesen, dass neben den deutlichen Schichtstrukturen auch weniger geordnete Strukturen in den TEM-Aufnahmen zu erkennen sind (siehe Anhang Abb.S-18). Vermutlich hängt dies mit der Orientierung der Probe nach der Präparation auf dem Kupfernetz zusammen.

Ein weiterer Hinweis auf eine geringe Periodizität der lamellaren Ordnung ist die breite Struktur der BRAGG-Reflexe im SAXS-Diffraktogramm (siehe Abb.59a), ein Phänomen welches auch von ZIDOVSKA et al. für oktavalente Cytoskektine beschrieben wurde.⁵⁹ Weiterhin zeigen die TEM-Aufnahmen zwar schichtförmige Wiederholeinheiten, aber keinen zwiebelschalenartigen Lipoplexaufbau, wie er in der Literatur für lamellare Lipoplexe beschrieben ist.³¹² Dies zeigt ebenso, dass der lamellare Lipoplexaufbau von geringer Periodizität ist.

3.4.3.5 Abschließende Diskussion zur Komplexierung von DNA durch TO-VI

TO-VI bildet sowohl mizellare Lipidaggregate (reines Lipid in wässrigem Lösungsmittel), als auch lamellare Mesophasen (Lipid im Komplex mit DNA in wässrigem Lösungsmittel) (siehe Abb.60). Wie ist dieses Verhalten mit dem Molekülformkonzept nach ISRAELACHVILI in Einklang zu bringen? Mizellen werden nach diesem Konzept von Lipiden mit kegelförmiger Molekülform gebildet (positive Membrankrümmung), während Lipide mit zylinderartiger Molekülform lamellare Aggregate ausbilden (vernachlässigbare Membrankrümmung).⁴¹ Ein Maß für die Molekülform bietet der Packungsparameter P (Kap. 1.2), für dessen Berechnung V_C , l_C und A_{KG} benötigt werden. l_C und V_C können für Alkylketten mit x Kohlenstoffatomen in all-*trans*-Konfiguration folgendermaßen berechnet werden:⁴¹

$$l_C = (1,54 + 1,265 \times x)[\text{Å}] \quad (\text{Gl. 13}),$$

$$V_C = (27,4 + 26,9 \times x)[\text{Å}^3] \quad (\text{Gl. 14}).$$

Aufgrund der Löslichkeit von **TO-VI** in wässrigen Lösungsmitteln konnte A_{KG} nicht über die Druck/Flächen-Isothermen mittels LANGMUIR-Filmwaage bestimmt werden. Zur Abschätzung

von A_{KG} für **TO-VI** wurde der in Monoschichtexperimenten mittels LANGMUIR-Filmwaage ermittelte A_{KG} -Wert eines Malonamids der 1. Generation (*N*-2-[(2,6-Diamino-1-oxohexyl)-amino]ethyl-2,*N'*-(dihexadecyl)propandiamid) herangezogen. Dieses Lipid enthält 2 Tetradecylketten als lipophilen Molekülteil und 1 Lysinmolekül im Kopfgruppenbereich. Es weist im kondensierten Zustand, sowohl bei pH 4 als auch pH 8, einen A_{KG} -Wert von 40 \AA^2 auf.¹⁷⁹ **TO-VI** besitzt drei terminale Lysinmoleküle, wodurch ein A_{KG} -Wert von rund 120 \AA^2 angenommen werden kann. Dieser Wert wurde durch Berechnung nach FARAGO et al. mittels Gl. 15 bestätigt, wonach zwischen A_{KG} und $d(\text{DNA})$ folgender Zusammenhang besteht:³¹³

$$d(\text{DNA}) = \frac{A_{KG}}{2 \times 1,7 \text{ \AA}} \quad (\text{Gl. 15}).$$

Unter Verwendung des in den SAXS-Experimenten für **TO-VI**-Lipoplexe (N/P 1) ermittelten $d(\text{DNA})$ -Werts (siehe Kap.3.4.3.4) ergibt sich nach Gl. 15 für A_{KG} ein Wert von 119 \AA^2 . Unter Anwendung von Gl.1 ergibt sich somit für **TO-VI** ein P von 0,32. Nach den FT-IR-Messungen befinden sich die Alkylketten im Bereich von $10\text{-}70^\circ\text{C}$ im fluiden Zustand (siehe Anhang Abb.S-13), wodurch, bei gleichbleibenden Alkylkettenvolumen, die tatsächliche Alkylkettenlänge kürzer als der berechnete l_C -Wert ist. Folglich ist der reelle Wert für P größer als 0,32. Ein Packungsparameter von $P < 0,33$ ist typisch für die Bildung sphärischer Mizellen, während ein Packungsparameter von $0,33 < P < 0,5$ typisch für nicht-sphärische Mizellen als Aggregate ist (siehe Kap.1.2 Abb.5). Demzufolge können nicht-sphärische Mizellen als bevorzugte Aggregatstruktur für **TO-VI** in wässriger Dispersion (HEPES-Puffer pH 7,3) angenommen werden.

Demgegenüber steht die Ausbildung der L_α^c -Phase von **TO-VI** im Komplex mit DNA. Lamellare Phasen werden gewöhnlich von Lipiden mit $P \approx 1$ ausgebildet. Um auch für **TO-VI** die Ausbildung lamellarer Phasen zu ermöglichen spielen zwei Faktoren eine wesentliche Rolle. Bei der Komplexbildung mit der DNA verliert der Lipidkopfbereich einen Teil der Gegenionen und der Hydrathülle, wodurch die scheinbare Fläche A_{KG} kleiner wird und folglich P größer. Zusätzlich führt die Verzahnung der Alkylketten innerhalb einer Lipiddoppelschicht zu effektiv 4 Alkylketten pro Kopfgruppe (Abb. 60).

Die bei der Untersuchung der Lipoplexbildung zwischen sspDNA und **TO-VI** ermittelten Werte für TEP und IEP zeigen, dass nicht alle 6 primären Aminogruppen des Cytosins am Komplexbildungsprozess beteiligt sind (siehe Kap.3.4.3.1 Tab.19). Die komplette DNA-Komplexierung findet erst bei einem N/P-Verhältnis von ~ 2 statt. Somit hat ein **TO-VI**-Molekül in HEPES-Puffer pH 7,3 bei der DNA-Komplexierung eine effektive Ladung von 3. Erklärungen für diese Beobachtung können sowohl Protonierungs- und Deprotonierungseffekte (wie für die α -Aminogruppe der Lysineinheiten diskutiert, siehe Kap.3.4.3.1) als auch

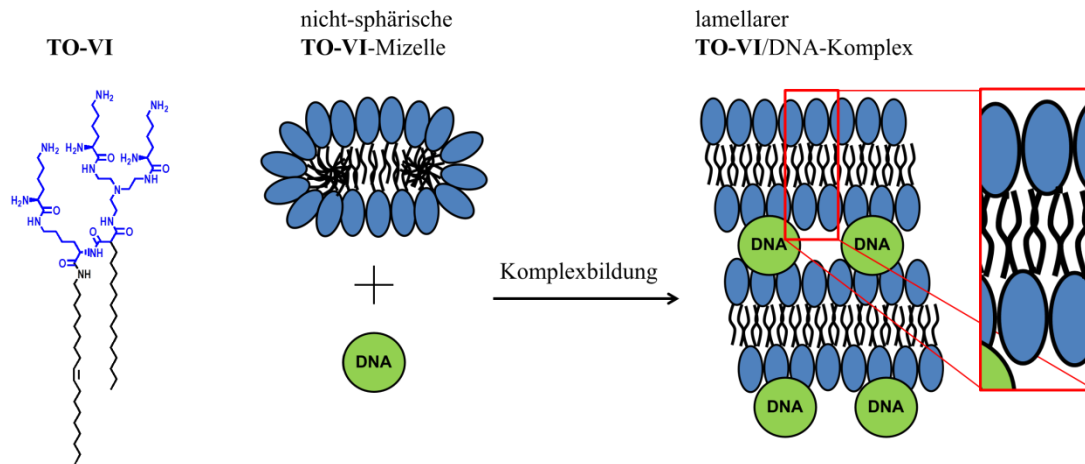


Abb. 60: Graphische Zusammenfassung der DNA-Komplexierung durch **TO-VI**. Das Lipid bildet im wässrigen Milieu Mizellen. Durch die Komplexbildung mit DNA entstehen lamellare Lipoplexe (L_{α}^C) mit einem zweidimensionalen DNA-Gitter zwischen den Lipiddoppelschichten. Der rot markierte Ausschnitt zeigt die Verzahnung der Alkylketten innerhalb der Lipiddoppelschicht.

sterisch-konformationelle Effekte liefern, wobei im zweiten Fall aus räumlichen Gründen nicht alle 6 Aminogruppen für die Komplexbildung mit DNA zur Verfügung stehen.

4 Transfektionseffizienz im Zellkultursystem – ausgewählte Ergebnisse

4.1 Einführung

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten kationischen Lipide sollen am Zellkultursystem hinsichtlich ihrer *in-vitro* Transfektionseffizienz getestet werden. Zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit wurden noch nicht alle Lipide am Zellkultursystem getestet. Da diese Experimente als Grundlage weiterführender Arbeiten dienen, ist die Veröffentlichung der Ergebnisse den durchführenden Personen vorbehalten. Demzufolge soll hier nur eine Auswahl an Ergebnissen aus den *in-vitro* Transfektionsuntersuchungen vorgestellt werden. Erste Ergebnisse welche die Effektivität der Malonamide der 2. Generation beschreiben sind in JANICH et al. publiziert.³¹⁴

Die hier dargestellten Versuche wurden von Herrn Dipl. Pharm. P. KREIDEWEIß und Frau A. MUNK in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. LANGNER durchgeführt. Die Experimente wurden an einer humanen Lungenkarzinomzelllinie (A549) nach einem in der Arbeitsgruppe etablierten Assay³¹⁵ durchgeführt.

Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe des ONPG-Assays untersucht.³¹⁶⁻³¹⁸ Der Assay basiert auf der Aktivitätsbestimmung des Enzyms β -Galactosidase, nachdem die Zellen mit dem Plasmid pCMV-SPORT- β -Gal unter Verwendung des zu untersuchenden Vektors transfiziert wurden. Das Plasmid kodiert neben Genen für die Funktion als Expressionsvektor für das Enzym β -Galactosidase. Unter Berücksichtigung der β -Galactosidaseaktivität von unbehandelten Zellen liefert die Bestimmung der Enzymaktivität einen Rückschluss auf die Menge an eingeschleuster DNA. Die Aktivität der β -Galactosidase wird durch Behandlung des Zelllysats mit *o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG), einem künstlichen Substrat, welches zu *o*-Nitrophenol und Galactose abgebaut wird, bestimmt. *o*-Nitrophenol kann durch Absorptionsmessung bei 405 nm quantifiziert werden. Die so ermittelte β -Galactosidaseaktivität wurde auf den Gesamtproteingehalt des Zelllysats normiert, welcher mittels des etablierten BCA-Assays quantifiziert wurde.³¹⁹

Die Zytotoxizität, welche für die Beurteilung eines Vehikelsystems für die Gentransfektion wichtig ist, wurde unter Verwendung des MTT-Assays bestimmt. Dieser Assay beruht auf der Umsetzung des gelben Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid zum blauen Formazanderivat, dessen Gehalt UV-Vis-spektroskopisch bei 570 nm bestimmt wird. Diese Umsetzung findet nur in lebenden Zellen statt.³²⁰

4.2 Transfektionseffizienz von TO-VI

Mit dem kationischen Lipid **TO-VI** steht ein Mizellbildner für die Lipofektion zur Verfügung. Wie in Kap.1.2 erwähnt, besitzen mizellare Formulierungen gegenüber liposomalen Formulierungen Vorteile in Bezug auf die Herstellung und der Lagerstabilität der Dispersionen. Im vorangegangenen Kap.3.4.3 wurde die Komplexbildung zwischen **TO-VI** und sspDNA ausführlich untersucht. Nachfolgend gilt es die Transfektionseffizienz und zytotoxischen Eigenschaften zu klären.

Die Ergebnisse des ONPG-Assays und des MTT-Assays sind in Abb.61 für verschiedene N/P-Verhältnisse dargestellt. Die β -Galactosidaseaktivität weist in Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis einen glockenförmigen Kurvenverlauf auf. Bei niedrigen N/P-Verhältnissen (N/P 0,5-1) ist die Enzymaktivität sehr gering und steigt bei höheren N/P-Verhältnissen an, wobei das Maximum bei N/P 4 erreicht wird. Mit einer weiteren Erhöhung des N/P-Verhältnisses sinkt die β -Galactosidaseaktivität wieder stark ab.

Die Zellviabilität zeigt ebenfalls eine deutliche Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis, wobei diese mit steigendem N/P-Verhältnis sinkt. Die Viabilität ist jedoch immer über 50 %, obwohl **TO-VI** ein Mizellbildner ist. Da Mizellbildner häufig Membranschäden und damit verbunden Zelllyse und Zelltod verursachen, sind die ermittelten Viabilitätswerte ein sehr gutes Ergebnis. Bei N/P 4, dem untersuchten N/P-Verhältnis mit der höchsten Transfektionseffizienz, beträgt die Viabilität ~80 %.

Somit steht mit **TO-VI** ein effektives Cytofektin für weitere Tests zur Verfügung. Das effektivste getestete N/P-Verhältnis (N/P 4) weist Eigenschaften auf, welche es für weitere Transfektionsuntersuchungen interessant machen. Die Lipoplexe bei N/P 4 sind kleiner als 1 μm (siehe Kap.3.4.3.2), was eine *in-vivo* Applikation aufgrund des geringen Embolierisikos erlaubt. Die Lipoplexe weisen weiterhin eine positive Gesamtladung auf (ζ -Potential +30mV, siehe Kap.3.4.3.2), was die Zelladhäsion, und damit die Aufnahme durch Endozytose, begünstigt.⁶⁶ Zusätzlich

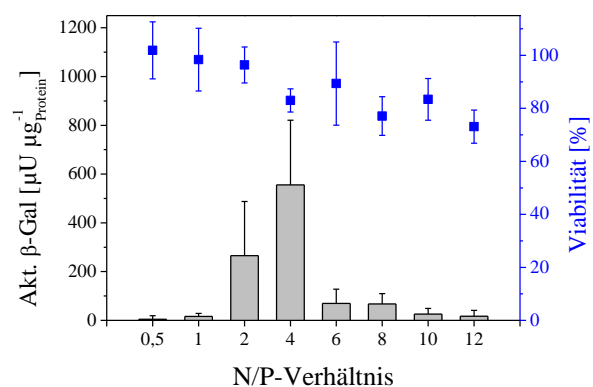


Abb.61: Ergebnisse des ONPG- (β -Galactosidaseaktivität) und MTT-Assays (Viabilität) für **TO-VI**-Lipoplexe in unterschiedlichen N/P-Verhältnissen mit pCMV-SPORT- β -Gal (Fixkonzentration: 0,15 μg DNA pro 200 μl A549-Zellsuspension mit 2×10^4 - $2,5 \times 10^4$ Zellen pro ml). Die Auswertung erfolgte 48h nach 4h serumfreien Inkubationsintervall der Zellen mit den Lipoplexen. Die Ergebnisse stellen Mittelwert und Standardabweichung aus 24 Einzelversuchen (8 Parallelversuche an 3 verschiedenen Tagen) dar.

ist aufgrund der positiven Partikelladung die Dispersion kolloidal stabilisiert. Des Weiteren ist eine vollständige Komplexierung der DNA bei einem N/P-Verhältnis von 4 anzunehmen (siehe ITC-, DSC- und ζ -Potentialuntersuchungen Kap. 3.4.3), auch wenn zu berücksichtigen ist, dass die Komplexierungsuntersuchungen mit linearer Modell-DNA (sspDNA) und die Transfektionsuntersuchungen mit Plasmid-DNA durchgeführt wurden. Es sollten jedoch keine gravierenden Unterschiede im Komplexierungsverhalten auftreten,³²¹ obwohl laut Literatur weniger kationisches Lipid für die Komplexierung von Plasmid-DNA im Vergleich zur linearen DNA benötigt wird.³²² Letztendlich bildet **TO-VI** mit DNA lamellare Lipoplexe, was als günstig für *in-vivo* Transfektionsversuche beschrieben ist.²⁷

Somit sind für die Zukunft weitere Untersuchungen von **TO-VI** an anderen *in-vitro* Modellen (andere Zellkulturen) und erste *in-vivo* Versuche als sinnvoll zu erachten, auch wenn die ersten Transfektionsuntersuchungen an A549 Zellen die Standardformulierungen Lipofectamine[®] und Lipofectamine[®] 2000 in ihrer Transfektionseffizienz nicht übertrafen.

4.3 Transfektionseffizienz ausgewählter Lipidformulierungen mit weiteren Lipiden der TO-Reihe.

Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit der *in-vitro* Transfektionseffizienz einer Auswahl von Lipiden der **TO-Reihe**. Dabei wird die Transfektionseffizienz und Viabilität am Zellkultursystem (A549-Zellen) sowohl in Abwesenheit als auch Anwesenheit von Serum (10% FBS) während der 4h Inkubation der Zellen mit den Lipoplexen betrachtet. Für die Versuche wurden die Cytofektine mit dem Helferlipid DOPE unter Anwendung der Filmbildungsmethode und anschließender Ultraschallbehandlung nach einem in der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll zu Liposomendispersionen formuliert.^{315,323} Die Lipoplexbildung erfolgte durch Inkubation der pDNA mit den kationischen Liposomen.^{315,323} Die Untersuchungen der Transfektionseffizienz in Serum liegen darin begründet, dass die Transfektionseffizienz nicht-viraler Vektoren durch unspezifische Wechselwirkungen von Serumbestandteilen mit den Vektor/DNA-Komplexen in der Regel verringert wird. Daher sind *in-vitro* Untersuchungen des Serumeinflusses auf die Gentransferleistung wichtig um Aussagen über mögliche *in-vivo* Experimente treffen zu können. An dieser Stelle soll dennoch darauf hingewiesen werden, dass für bestimmte therapeutische Fragestellungen *in-vitro* Anwendungen von Vektoren vorteilhaft sind (siehe Kap. 1.1). Des Weiteren finden *in-vitro* Transfektionssysteme für Laborarbeiten in den Biowissenschaften eine breite Anwendung. Die Transfektionseffizienz des effektivsten Cytofektin/DOPE-Verhältnisses sowie N/P-Verhältnisses mit pDNA ist für die Lipide **TO-IV**, **TO-X**, **TO-XII** und **TO-XIV** in Abb. 62 für

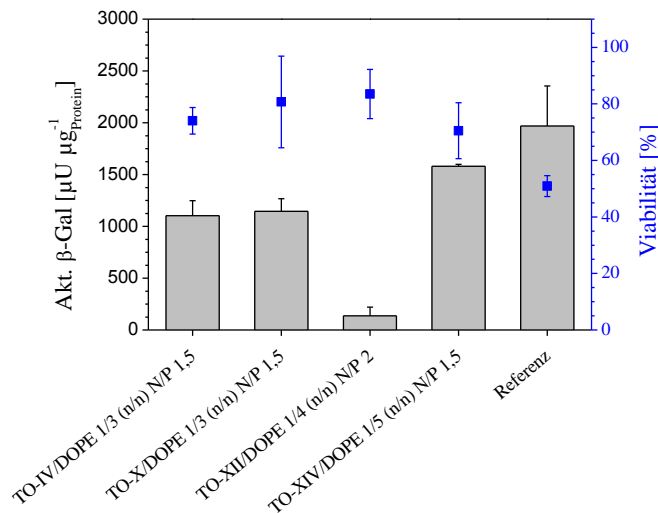


Abb. 62: Ausgewählte Ergebnisse des ONPG- (β -Galactosidaseaktivität) und MTT-Assays (Viabilität) für die Lipoplexe der Lipide **TO-IV**, **TO-X**, **TO-XII** und **TO-XIV** im effektivsten Cytofektin/DOPE-Verhältnis (n/n) sowie im effektivsten N/P-Verhältnis mit pCMV-SPORT- β -Gal (Fixkonzentration: 0,1 μg DNA pro 200 μl A549-Zellsuspension mit 2×10^4 Zellen pro ml). Die Auswertung erfolgte 24h nach 4h serumfreien Inkubationsintervall der Zellen mit den Lipoplexen. Die Ergebnisse stellen Mittelwert und Standardabweichung aus 36 Einzelversuchen (12 Parallelversuche an 3 verschiedenen Tagen) dar. Referenz = Lipofectamine® 2000 im optimierten Ladungsverhältnis.

serumfreie Transfektionsversuche dargestellt. Als Referenzsubstanz diente Lipofectamine® 2000, ein effektives und häufig verwendetes Transfektionsreagenz der Firma Invitrogen™ mit unbekannter Zusammensetzung.³²⁴ Lipofectamine® 2000 kann als aktueller Standard der nicht-viralen Transfektionsreagenzien angesehen werden.³²⁵ Bei Betrachtung von Abb. 62 fällt auf, dass die dargestellten Cytofektinformulierungen dem Lipofectamine® 2000 in dessen Transfektionseffizienz unterlegen sind, wobei die Formulierungen **TO-IV/DOPE 1/3 (n/n) N/P 1,5** und **TO-X/DOPE 1/3 (n/n) N/P 1,5** dennoch sehr effektive Gentransferaktivitäten aufweisen. Die Lipoplexformulierung **TO-XIV/DOPE 1/5 (n/n) N/P 1,5** erreicht annähernd das Niveau der Transfektionseffizienz von Lipofectamine® 2000, wobei es in der Aktivität dennoch signifikant unterlegen ist aber signifikant bessere Viabilitätswerte aufwies (p-Wert < 0.05, einseitiger ANOVA-Test und BONFERRONIS multipler Paarvergleich-Test). Im Allgemeinen ist die Viabilität der 4 dargestellten Cytofektinformulierungen besser als die Viabilität der Referenzformulierung Lipofectamine® 2000.

Betrachtet man die Transfektionseffizienz der Serumversuche (Abb. 63) im Vergleich mit den serumfreien Transfektionsversuchen (Abb. 62), so ist ersichtlich, dass die Anwesenheit von Serum die Transfektionseffizienz aller dargestellten Formulierungen verringert. Eine Ausnahme bildet die Lipidformulierung **TO-XII/DOPE 1/4 (n/n) N/P 2**, welche in Anwesenheit und Abwesenheit von Serum vergleichbare Ergebnisse liefert. Aufgrund der geringen Transfektionseffizienz ist diese Lipoplexformulierung jedoch für weiterführende Untersuchungen der Gentransferaktivität uninteressant. Bei den Lipiden **TO-IV** und **TO-X** hat sich das effektivste Lipid/DOPE-Verhältnis und/oder N/P-Verhältnis verschoben. Die Effektivität

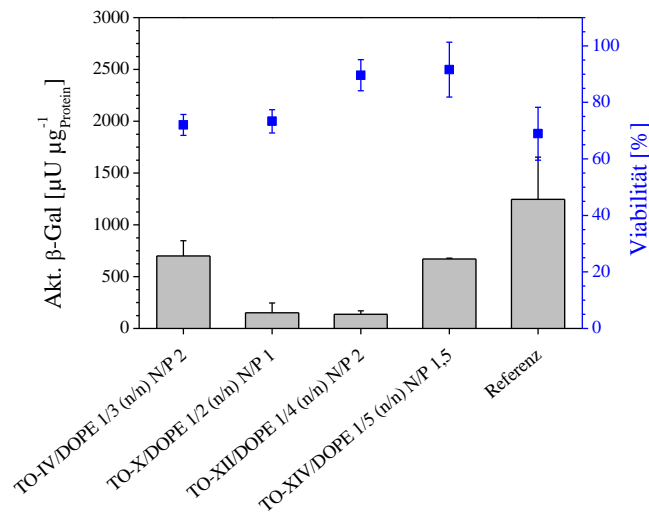


Abb. 63: Ausgewählte Ergebnisse des ONPG- (β -Galactosidaseaktivität) und MTT-Assays (Viabilität) für die Lipoplexe der Lipide **TO-IV**, **TO-X**, **TO-XII** und **TO-XIV** im effektivsten Cytofektin/DOPE-Verhältnis (n/n) sowie im effektivsten N/P-Verhältnis mit p-CMV-SPORT- β -Gal (Fixkonzentration: 0,1 μg DNA pro 200 μl A549-Zellsuspension mit 2×10^4 Zellen pro ml). Die Auswertung erfolgte 24h nach 4h Inkubationsintervall der Zellen mit den Lipoplexen unter Anwesenheit von 10% Serum. Die Ergebnisse stellen Mittelwert und Standardabweichung aus 36 Einzelversuchen (12 Parallelversuche an 3 verschiedenen Tagen) dar. Referenz = Lipofectamine[®] 2000 im optimierten Ladungsverhältnis.

der Lipoplexformulierung **TO-X/DOPE 1/2 (n/n) N/P 1** sinkt in Anwesenheit von Serum sehr stark ab (β -Galactosidaseaktivität $151 \pm 96 \mu\text{U } \mu\text{g}^{-1} \text{Protein}$). Die Lipoplexformulierungen **TO-IV/DOPE 1/3 (n/n) N/P 2** und **TO-XIV/DOPE 1/5 (n/n) N/P 1,5** erreichen annähernd die Effektivität der Referenz in Anwesenheit von Serum. Dabei ist die Lipoplexformulierung **TO-XIV/DOPE 1/5 (n/n) N/P 1,5** interessanter für weiterführende Untersuchungen *in-vivo*, da sie im Vergleich zu Lipofectamine[®] 2000 eine signifikant bessere Viabilität von $92 \pm 10\%$ aufweist (p-Wert < 0.05, einseitiger ANOVA-Test und BONFERRONIS multipler Paarvergleich-Test), während die Formulierung **TO-IV/DOPE 1/3 (n/n) N/P 2** mit $72 \pm 4\%$ lediglich mit Lipofectamine[®] 2000 vergleichbare Werte liefert (Abb. 63).

Zusammenfassend kann für die ersten Transfektionsuntersuchungen von 4 Stellvertretern der Malonamide der 2. Generation ein positives Resümee gezogen werden. Mit der Lipoplexformulierung **TO-XIV/DOPE 1/5 (n/n) NP 1,5** wurde ein nicht-virales Transfektionssystem entwickelt, welches in serumfreien Tests an A549 Zellen sehr effektiv transfizierte und dabei signifikant bessere Viabilitätswerte als Lipofectamine[®] 2000 aufwies. Auch bei Anwesenheit von Serum ist die Transfektionseffizienz ausreichend um *in-vivo* Untersuchungen in Erwägung zu ziehen, wobei die gegenüber Lipofectamine[®] 2000 signifikant bessere Viabilität einen großen Vorteil bei der *in-vivo* Applikation bietet.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Synthese neuer kationischer Lipide für die Gentransfektion. Dabei galt es die Synthese nachvollziehbar zu beschreiben und sowohl die Zwischen- als auch die Endprodukte analytisch zu charakterisieren. Weiterhin sollten ausgewählte physiko-chemische Fragestellungen bearbeitet werden.

Dabei gelang es die Synthese eines neuen Lipidrückgrats für die bereits beschriebene Klasse der Malonamide (Malonamide der 1. Generation) zu etablieren. Dieses neue Rückgrat, welches das Charakteristikum der Malonamide der 2. Generation darstellt, besteht aus einem Lysinbaustein, dessen α -Aminogruppe über eine Amidbindung mit einem Malonsäurebaustein verbunden ist. Sowohl der Lysinbaustein als auch der Malonamidbaustein bilden dabei Anknüpfungspunkte für die Alkylketten des lipophilen Molekülteils sowie die aminofunktionalisierten Kopfgruppen.

Die Synthesestrategie für die Darstellung der Malonamide der 2. Generation wurde optimiert und in der vorliegenden Arbeit ausführlich beschrieben. Sie zeichnet sich durch einen modularen Aufbau aus. So kann z.B. durch unterschiedliche Kombination der Lipidvorstufen das Alkylierungsmuster variiert werden. Die Vorschriften der optimierten Syntheseschritte sowie die analytischen Daten der Zwischen- und Endprodukte sind im Kap. 6.4 aufgeführt.

Es wurden 2 Strukturtypen der Malonamide der 2. Generation etabliert: Die Lipide vom Tris(2-aminoethyl)amin-Typ und vom Ethylendiamin-Typ. Von den Malonamiden vom Tris(2-aminoethyl)amin-Typ wurden 3 unterschiedliche Kopfgruppenstrukturen synthetisiert, welche sich in der Größe und der Anzahl an primären Aminogruppen unterscheiden: Kopfgruppentyp-**IV** ($3 \times \text{NH}_2$), **-VI** ($6 \times \text{NH}_2$) und **-VIII** ($5 \times \text{NH}_2$). Auch von den Malonamiden vom Ethylendiamin-Typ wurden 3 unterschiedliche Kopfgruppenstrukturen dargestellt: Kopfgruppentyp-**X** ($2 \times \text{NH}_2$), **-XII** ($4 \times \text{NH}_2$) und **-XIV** ($3 \times \text{NH}_2$).

Von den 6 neuen Kopfgruppenstrukturen wurden homologe Lipide synthetisiert, welche sich lediglich in der Alkylkettenkombination unterscheiden. Dabei wurden folgende 5 Alkylkettenkombinationen synthetisiert: 2 Tetradecylketten (**TT**), eine Hexadecyl- und eine Tetradecylkette (**HT**), eine Tetradecyl- und eine Oleylkette (**TO**), eine Hexadecyl- und eine Oleylkette (**HO**) sowie 2 Oleylketten (**OO**).

Insgesamt wurden unter Anwendung des modularen Synthesekonzepts 30 neue Malonamide der 2. Generation mit systematischen Variationen, sowohl im aminofunktionalisierten Kopfbereich (Anzahl der primären Aminogruppen sowie Kopfgruppengröße und Grad der Verzweigung) als auch im lipophilen Molekülteil (Sättigungsgrad und Länge der Alkylketten), synthetisiert, charakterisiert und für die Testung der Transfektionseffizienz bereitgestellt. Die

neuen Lipide bieten damit die Möglichkeit Struktur/Effektivitäts-Untersuchungen durchzuführen. Weiterhin ist die modulare Synthesestrategie auch für die Synthese von Malonamiden mit weiteren Alkylkettenmustern oder mit anderen Kopfgruppen anwendbar.

Die Testung der Transfektionseffizienz der neuen Lipide war zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen. Im Rahmen dieser Dissertationsschrift wurden ausgewählte Daten der Transfektionsuntersuchungen am Zellkultursystem für die Lipide **TO-IV**, **TO-VI**, **TO-X**, **TO-XII** und **TO-XIV** vorgestellt. Die guten Ergebnisse im Vergleich mit der Standardsubstanz Lipofectamine® 2000 lassen das Potential der Malonamide der 2. Generation erkennen.

Das Aggregationsverhalten der 30 Lipide in wässrigen Dispersionen – alle 6 Kopfgruppentypen der **TT**-, **HT**-, **TO**-, **HO**- und **OO**-Reihe – wurde in Abhängigkeit vom pH-Wert mittels DSC untersucht. Die hohen Umwandlungstemperaturen bei pH 10 lassen dabei auf starke intermolekulare Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, schließen. Die ergänzenden Untersuchungen mittels SAXS und WAXS bleiben noch offen. Diese sind jedoch Gegenstand aktueller Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. BREZESINSKI.

Im Laufe der Arbeiten zur Anfertigung der vorliegenden Dissertationsschrift ergaben sich unterschiedliche Fragestellungen, welche in der Synthese der Lipide mit 3 Tetradecylketten (**DiTT-IV** und **DiTT-VI**) resultierten:

1. Welchen Einfluss hat die Einführung der dritten Alkylkette auf das Aggregationsverhalten der Lipide?
2. Handelt es sich bei den Malonamiden der 2. Generation um ein Diastereomerenpaar?

Chromatographieexperimente in Kombination mit ESI-MS-Spektrometrie zeigten, dass jedes Malonamid der 2. Generation, welches eine Lysin-gebundene und eine Malonsäure-gebundene Alkylkette aufweist, ein Diastereomerenpaar darstellt. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Diastereomere ineinander überführbar sind, wobei ein Mechanismus über die Keto/Enol-Tautomerie an der Malonsäure als Ursache postuliert wird. Die These der Diastereomerenpaare konnte durch die Darstellung von **DiTT-IV** und **DiTT-VI** synthetisch bewiesen werden. Das Aggregationsverhalten der beiden dreikettigen Lipide wurde mittels DSC und DLS untersucht. SAXS- und WAXS-Untersuchungen bleiben noch offen.

Des Weiteren wurden mit Lipid **XVp**, **RTO-IV**, **RTO-X** und **RTO-XIV** Verbindungen synthetisiert, welche einen hohen Reinheitsgrad der Oleylketten aufweisen. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wiesen Lipide mit Oleylketten, welche im Rahmen dieser und vorangegangener Arbeiten in der Arbeitsgruppe synthetisiert wurden, bedingt durch die kommerziell

erhältlichen Reinheitsgrade von Oleylalkohol und Oleylamin, einen Reinheitsgrad der olefinischen Alkylkette zwischen 70 % und 80 % auf. Durch DSC-Untersuchungen der 4 kettenreinen Lipide und vergleichende Untersuchungen mit den kettenunreinen Analoga (Lipid **XV**, **TO-IV**, **TO-X** und **TO-XIV**) konnten erste Einflüsse der Kettenreinheit der Lipide auf das Aggregationsverhalten ermittelt werden. Untersuchungen des Aggregationsverhaltens mittels SAXS und WAXS, sowie des Einflusses auf das Transfektionsverhalten, sind Teil weiterführender Arbeiten.

Mit den Lipiden **THM-IV**, **THM-X** und **THM-XIV** wurde erstmals eine Methyl-verzweigte Alkylkette ((10*R,S*)-10-Methylhexadecylkette) als Ersatz für die Oleylkette in Cytofektinen mit Malonamidgrundgerüst eingeführt. Der Einfluss dieser Substitution auf das Aggregationsverhalten der Lipide wurde mittels DSC-Experimente, durch Vergleich mit den Lipiden **RTO-IV**, **RTO-X** und **RTO-XIV**, untersucht. Die Zellkulturergebnisse der Auswirkungen dieser Alkylkettensubstitution auf die Transfektionseffizienz sind noch offen und sind Thema weiterführender Arbeiten.

Es konnte gezeigt werden, dass Malonamide vom Kopfgruppentyp-**VI** in wässrigen Dispersionsmitteln Mizellen bilden. Die CMC wurde mit 3 verschiedenen Methoden (ITC, Fluorescein-Einschluss und DPH-Einschluss) bestimmt.

Des Weiteren wurde, exemplarisch für diese neue Klasse mizellarer Transfektionssysteme, die Komplexbildung zwischen **TO-VI** und DNA mit verschiedenen Methoden untersucht. Wichtige Resultate aus diesen Untersuchungen sind:

- nicht alle Aminogruppen des Lipids sind an der Komplexbildung beteiligt,
- während der Lipoplexbildung werden Protonen aufgenommen,
- **TO-VI** bildet lamellare Lipoplexe mit DNA (L_{α}^c), wobei die Alkylketten innerhalb einer Lipiddoppelschicht verzahnt sind.

Transfektions- und Viabilitätsuntersuchungen konnten zeigen, dass **TO-VI** bei geringer Zytotoxizität befähigt ist, genetisches Material in Zellen zu schleusen. Somit steht mit den mizellbildenden Malonamiden eine interessante Alternative zu liposomalen Cytofektin-formulierungen zur Verfügung.

Letztendlich ist es gelungen mit den Lipiden **XVI** und **XVII** 2 Glycolipide als funktionalisierte Lipide für die Zelltargetierung zu synthetisieren. Die Synthese bedarf für zukünftige Arbeiten jedoch einer Optimierung der Anknüpfung der Zuckerreste. Dennoch stellen die etablierten Ethylenglycol-basierten Linkerstrukturen interessante Zwischenverbindungen für weitere Modifikationen dar.

6 Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Chemikalien

Kommerziell erworbene Substanzen

Falls nicht anders angegeben, wurden folgende Chemikalien von *Sigma-Aldrich Co LLC.* (Deutschland) bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Acetonitril (99 %) [<i>Grüssing</i>]	Kaliummethylat (95 %)
Ammoniakgas [<i>Air Liquide</i>]	Kupfer-(I)-acetat (97 %)
Ammoniaklösung (32 %) [<i>Grüssing</i>]	Kupfer-(II)-chlorid (99,999 %)
Ammoniumchlorid (>99 %) [<i>Roth</i>]	Lithiumaluminiumhydrid (95 %)
Bortrifluorid-Diethylether Komplex (>46,5 % BF ₃)	Lithiumbromid (≥99 %)
BOC-Lys(BOC)-OSu (≥98 %)	Lithiumchlorid (99,99 %)
α-Bromessigsäure- <i>tert.</i> -butylester (98 %)	Magnesium (≥99,5 %)
2-Bromethanol (95 %)	Malonsäurediethylester (99 %)
Chloroform-d1 (99,8 %) [<i>Euriso-top</i>]	MES (≥99,5 %)
Deuteriumoxid (100 %) [<i>ARMAR chemicals</i>]	Methanol-d4 (99,8 %) [<i>Euriso-top</i>]
Di- <i>tert.</i> -Butyldicarbonat (99 %)	Methansulfonsäurechlorid (98 %)
3,4-Dihydro-2 <i>H</i> -pyran (97 %)	Methylmalonsäurediethylether (99 %)
<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin (≥98 %)	Natriumacetat Trihydrat (≥99,5 %) [<i>Merck</i>]
4-Dimethylaminopyridin (99 %)	Natriumazid (>99,5 %) [<i>Merck</i>]
1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (98 %)	Natriumcarbonat (99,5 %) [<i>Grüssing</i>]
Na ₄ EDTA (≥99,5 %)	Natriumchlorid (99,5 %) [<i>Grüssing</i>]
Essigsäure (99,5 %) [<i>Grüssing</i>]	Natriumhydrid 60 % (m/m) in Paraffinöl
Ethanol, absolut (99,8 %)	Natriumhydrogencarbonat (≥99,5 %) [<i>Merck</i>]
Ethylchloroformiat (>99 %) [<i>Fluka</i>]	Natriumhydroxid (98 %) [<i>Grüssing</i>]
Ethylendiamin (99 %)	Natriumsulfat, wasserfrei (99 %) [<i>Grüssing</i>]
Fluorescein (BioReagent)	1,8-Octandiol (98 %)
β-D-Galactose-pentaacetat (98 %)	Oleylalkohol (tech.) (85 %)
Glutarsäureanhydrid (98 %)	Oleylamin (tech.) (70 %)
HEPES (≥99,5 %)	Ölsäure (99 %)
Hexadecylbromid (97 %)	Piperidin (99 %)
Kaliumbromid (≥99 %)	Propargylalkohol (99 %)
Kaliumhydroxid (≥85 %) [<i>Roth</i>]	Propargylbromid 80 % (m/m) in Toluol
Kaliumiodid (≥99,5 %)	PyBOP [®] (≥97 %) [<i>Sigma-Aldrich</i>] oder

(99 %) [<i>Carbolution</i>]	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure ($\geq 98,5$ %)
Salzsäure (37 %) [<i>Grüssing</i>]	<i>p</i> -Toluolsulfonsäurechlorid (≥ 98 %)
Schwefelsäure (95-97 %) [<i>Grüssing</i>]	Triethylamin (≥ 99 %)
Silbernitrat (≥ 99 %) [<i>Roth</i>]	Trifluoressigsäure (99 %)
Tetradecylbromid (97 %)	TRIS (99,9 %) [<i>Roth</i>]
Tetraethylglycol (99 %)	Tris(2-aminoethyl)amin (96 %)

Alle weiteren verwendeten Lösungsmittel sowie Pyridin wurden nach anerkannter Vorschrift gereinigt, getrocknet und vor Gebrauch destilliert.⁸⁹

2-Bromethanol wurde vor der Umsetzung frisch destilliert.

6.2 Physiko-chemische Methoden

6.2.1 Dispersionsmedien

Wasser: Für die Herstellung der verwendeten wässrigen Medien wurde deionisiertes Wasser, welches mit einer *Milli Q Advantage A10* Anlage mit *Q-Pod* der Firma *Merck Millipore* (Billerica, MA, USA) aufbereitet wurde, verwendet.

Carbonatpuffer pH 10 (10 mM):	5,5 mmol Na ₂ CO ₃	
	4,5 mmol NaHCO ₃	ad 1 l mit Wasser
Acetatpuffer pH 5 (10 mM):	2,69 mmol Essigsäure	
	7,31 mmol Natriumacetat	ad 1 l mit Wasser
HEPES-puffer pH 7,3 (20 mM):	20 mmol HEPES	
	0,1 mmol Na ₄ EDTA	ad 1 l mit Wasser
MES-puffer pH 7,3 (20 mM):	20 mmol MES	
	0,1 mmol Na ₄ EDTA	ad 1 l mit Wasser
TRIS-puffer pH 7,3 (20 mM):	20 mmol TRIS	
	0,1 mmol Na ₄ EDTA	ad 1 l mit Wasser

Die Puffer wurden vor ihrer Verwendung mit 1 M Natronlauge bzw. 1 M Salzsäure auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt. Alle wässrigen Lösungsmittel wurden vor der Nutzung steril filtriert (0,2 μ m Celluloseacetat Filter, *VWR International GmbH* (Dresden)).

6.2.2 Probenpräparation

Lipiddispersionen - Reinsubstanzen:

Das entsprechende Lipid wurde in dem entsprechenden Dispersionsmittel suspendiert. Wenn nicht anders angegeben, betrug die Endkonzentration $c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$. Anschließend wurde die Probe 2× für 5 min auf 80 °C temperiert und gevortext. Die erhaltene Lipiddispersion wurde im Ultraschallbad bei 60 °C für 10-30 min (je nach Lipid) bei 37 kHz und 80% Leistung beschallt. Die Lipiddispersionen wurden vor der weiteren Verwendung 24 h bei 7 °C gelagert. Dispersionen mit Konzentrationen $c < 1 \text{ mg ml}^{-1}$ wurden durch Verdünnung der Stammdispersion ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$) erhalten.

DNA-Dispersion:

Als DNA wurde „salmon sperm DNA“ (sspDNA) der Firma *Invitrogen™ life technologies™* (Darmstadt, Deutschland) verwendet (Produktnummer: 15632-011). Es handelte sich um eine wässrige Lösung mit einer Konzentration von $c = 10 \text{ mg ml}^{-1}$. Für die Verwendung wurde die Stammlösung mit dem entsprechenden Lösungsmittel auf die benötigte Endkonzentration verdünnt. Die Konzentration der Stammlösung wurde durch UV-Absorptionsmessungen bei 260 nm ($A_{260} = 1$ für $c = 50 \mu\text{g ml}^{-1}$ dsDNA und 1 cm Schichtdicke) überprüft.³¹⁶

Lipoplexpräparation für ζ -Potential- und DLS-Messungen:

Die Proben wurden in einem Mischungsschritt präpariert. Die Endkonzentrationen wurden den Konzentrationen in der Messzelle der entsprechenden ITC-Titration angepasst. Folgende Mischungssequenzen wurden angewendet, wobei sich die eingesetzten Volumina aus den gewünschten Endkonzentrationen ergaben. **TO-VI-zu-DNA-Titration:** 1. sspDNA-Stammlösung ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$) 2. HEPES-Puffer 3. **TO-VI-Stammlösung** ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$). **DNA-zu-TO-VI-Titration:** 1. **TO-VI-Stammlösung** ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$) 2. HEPES-Puffer 3. sspDNA-Stammlösung ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$).

6.2.3 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Die DSC-Messungen wurden mit einem *VP-DSC*-Gerät der Firma *MicroCal Inc.* (Northampton, MA, USA) durchgeführt. Die verwendeten Heizraten betragen 60 K h^{-1} bzw. 20 K h^{-1} , wobei zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit mehrere Heiz- und Kühlzyklen aufgenommen wurden. Mit Ausnahme der Messungen mit DNA wurde der 1. Heizzyklus eines jeden DSC-Experiments verworfen. Wenn nicht anders angegeben, betrug der betrachtete Temperaturbereich 2-95 °C. Die Referenzzelle wurde mit reinem Dispersionsmedium gefüllt. Die erhaltenen Thermogramme wurden durch Subtraktion der Dispersionsmedium/Dispersionsmedium-Basislinie korrigiert und mit der *MicroCal Origin 8.0 Software* ausgewertet. Alle Proben wurden vor der Messung 10 min entgast

Für die Analyse der reinen Lipide wurden Lipiddispersionen in dem entsprechenden Dispersionsmittel ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$) verwendet.

Für die Untersuchungen der Lipoplexe wurde eine gleichbleibende sspDNA-Konzentration von $c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$ verwendet. Die Menge an Lipid ergab sich aus dem zu untersuchenden N/P-Verhältnis. Die Lipiddispersion wurde in $810 \mu\text{l}$ HEPES-Puffer präpariert und 24 h bei 7°C gelagert. Anschließend wurden $90 \mu\text{l}$ sspDNA-Lösung ($c = 10 \text{ mg ml}^{-1}$) ergänzt und 15 min bei RT inkubiert.

6.2.4 ITC-Experimente

Die Experimente wurden in verschiedenen Puffersystemen (HEPES, MES, TRIS) mit einer *CSC Model 5300 Nano-ITC III* der Firma *TA Instruments* (New Castle, DE, USA) durchgeführt. Das Volumen der Probenzelle betrug $950 \mu\text{l}$, das Volumen der Spritze $250 \mu\text{l}$. Die Experimente wurden bei 25°C und einer Rührgeschwindigkeit von 200 rpm durchgeführt. Die Proben wurden vor der Titration 10 min entgast. Folgende Konzentrationen fanden Anwendung. **TO-VI**-zu-DNA-Titration: sspDNA – $0,45 \text{ mM}_{\text{Nuk}}$; **TO-VI** – $0,84 \text{ mM}$. DNA-zu-**TO-VI**-Titration: sspDNA – $4,85 \text{ mM}_{\text{Nuk}}$; **TO-VI** – $0,26 \text{ mM}$. Die Referenzzelle wurde mit reinem Puffer gefüllt. $10 \mu\text{l}$ Lipiddispersion bzw. DNA-Lösung wurde in Intervallen von 600 s (in diesem Zeitraum wurde das Niveau der Basislinie wieder erreicht) in die Probenzelle injiziert. Des Weiteren wurden Verdünnungswärmen (Kontrolltitration) durch die Titration von Lipiddispersion bzw. die DNA-Lösung in die mit Puffer gefüllte Probenzelle ermittelt. Diese Kontrolltitrationen wurden für die Korrektur der ermittelten Titrationswärmen genutzt. Die Daten wurden mit der *NanoAnalyze Software 2.2.0* der Firma *TA-Instruments* ausgewertet. Die Titrationsen wurden zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit zweifach durchgeführt.

6.2.5 DLS-Messungen

Partikelgrößen und Partikelgrößenverteilungen wurden mit dem *Zetasizer Nano ZS ZEN3600* der Firma *Malvern Instruments* (Worcestershire, UK) ermittelt. Das Gerät besitzt einen He/Ne-Laser welcher monochromatisches Licht der Wellenlänge $\lambda = 633 \text{ nm}$ erzeugt. Der Streuwinkel θ betrug 173° , die Messtemperatur betrug 25°C . Es wurden 3 Messungen bestehend aus jeweils 15 Einzelmessungen mit einer Messdauer 20 s je Einzelmessung durchgeführt. Für die Berechnungen wurde eine Viskosität von $\eta = 0,8872 \text{ mPas}$ und ein Brechungsindex von 1,33 angenommen. Die erhaltenen Autokorrelationsfunktionen wurden sowohl mit der *Zetasizer Software 6.34* der Firma *Malvern Instruments* für die Bestimmung des z-Average mittels Kumulantenanalyse, als auch mit der *ALV-Correlation Software 3.0* der Firma *ALV-Laser Vertriebsgesellschaft m.b.H.* (Langen, Deutschland) für die Berechnung der Größenverteilungsfunktionen mittels „exponential regularized fit ($g_2(t)$)“ ausgewertet.

6.2.6 ζ -Potential-Messungen

Die Messungen der elektrophoretischen Beweglichkeit wurden auf Basis der Laser-Doppler Elektrophorese Technik mittels *Zetasizer Nano ZS ZEN3600* der Firma *Malvern Instruments* (Worcestershire, UK) durchgeführt. Die Messtemperatur betrug 25 °C. Es wurden 3 Messungen, bestehend aus jeweils 30 Einzelmessungen unter Anwendung einer Spannung von 50 V, durchgeführt. Für die Berechnungen wurde eine Viskosität von $\eta = 0,8872 \text{ mPa s}$ und eine Dielektrizitätskonstante von $\varepsilon = 78,5 \text{ Fm}^{-1}$ zu Grunde gelegt. Die Auswertung erfolgte mittels *Zetasizer Software 6.20* der Firma *Malvern Instruments*. Die elektrophoretische Mobilität μ_e der Partikel wurde mit Hilfe der SMOLUCHOWSKI-Gleichung (Gl. 8) in das ζ -Potential umgerechnet: $\zeta = (\mu_e \times \eta) \times \varepsilon^{-1}$.

6.2.7 TEM und cryo-TEM

TEM:

Präparation und Vermessung erfolgten durch Frau PD. Dr. A. MEISTER und Herrn Dr. S. DRESCHER. Lipid- und Lipoplexdispersionen wurden mit einer Konzentration von $c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$ präpariert (die Lipoplexherstellung erfolgte analog der Präparation der DSC-Proben (Kap. 6.2.3)) und mit dem entsprechendem Dispersionsmedium auf eine Endkonzentration von $c = 0,05 \text{ mg ml}^{-1}$ verdünnt. Die negativ-kontrastierten Proben wurden durch Spreiten von $5 \mu\text{l}$ der entsprechenden Dispersion auf ein Kupfernetz der Firma *PLANO* (Wetzlar, Deutschland), welches mit einem *Formvar-Film* beschichtet ist, präpariert. Nach 1 min wurde die Flüssigkeit mit einem Filterpapier entfernt und $5 \mu\text{l}$ einer 1%igen wässrigen Uranylacetatlösung hinzugefügt, welche wiederum nach 1 min entfernt wurde. Die getrockneten Proben wurden an einem *EM 900 TEM* der Firma *Carl Zeiss Microscopy GmbH* (Oberkochen, Deutschland) untersucht. Die Bilder wurden mit einer *SSCCD SM-1k-120 Kamera* der Firma *TRS* (Moorenweis, Deutschland) aufgenommen.

cryo-TEM:

Präparation und Mikroskopie erfolgten durch Frau PD. Dr. A. MEISTER. Die Lipiddispersion wurde mit einer Konzentration von $c = 2 \text{ mg ml}^{-1}$ in Carbonatpuffer pH 10 hergestellt. Die Proben wurden mit der „blotting procedure“ für Cryo-TEM präpariert. Dabei wurde in einer Kammer mit konstanter Temperatur und Luftfeuchtigkeit unter Verwendung eines „*EM GP grit plunger*“ der Firma *LEICA* (Wetzlar, Deutschland) gearbeitet. Ein Tropfen der Lipiddispersion wurde auf ein *C-flatTM* (ein mit einem löchrigen Kohlenstofffilm überzogenes EM-Netz) der Firma *Protochips Inc.* (Raleigh, NC, USA) aufgetragen und überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier entfernt, wobei ein dünner Film zurückbleibt, welcher die Löcher des EM-Netzes durchspannt. Durch schnelles Eintauchen in flüssiges Ethan wurde die

wässrige Probe eingefroren und bei Temperaturen unter 108 K gelagert, transportiert und mikroskopiert. Die Proben wurden an einem *LIBRA 120 PLUS TEM* der Firma *Carl Zeiss Microscopy GmbH* (Oberkochen, Deutschland) bei 120 kV untersucht. Das Mikroskop ist mit einem *Gatan 626 Cryotransfersystem* ausgestattet. Die Bilder wurden mit einer *BM-2k-120 Dual-Speed on axis SSCCD-Kamera* der Firma *TRS* (Moorenweis, Deutschland) aufgenommen.

6.2.8 SAXS-Messungen

Die Lipide bzw. Lipoplexe wurden als 20%ige Dispersion (m/m) in HEPES-Puffer dispergiert. Um eine komplette Hydratisierung zu gewährleisten, wurden die Lipiddispersionen 3× auf 90 °C erhitzt und gevortext. Die Lipoplexe wurden analog der Lipoplexproben für die DSC-Experimente (Kap. 6.2.3), wobei die Konzentrationen angepasst wurden. Für die Vermessung wurden die Dispersionen in Glaskapillaren (\varnothing 2 mm) überführt und 3 Tage bei 4 °C gelagert.

Die SAXS-Messungen wurden am Elektronenspeicherring *BESSY II* (Berlin, Deutschland), welcher Synchrotronstrahlung im THz-Bereich bis hin zur RÖNTGEN-Strahlung liefert,³²⁶ von Frau M. Sc. D. PAWLOWSKA durchgeführt. Die Wellenlänge des Strahls betrug $\lambda = 0,826 \text{ \AA}$ und wurde mittels „*MoBC Multilayer*“ Monochromator generiert. Die Strahlenbreite wurde durch eine Lochblende mit einem Durchmesser von 100 μm gefolgt von einer Lochblende mit einem Durchmesser von 150 μm bestimmt. Die SAXS-Beugungsmuster wurden von einem *MarMosaic 225 Detektor* der Firma *MarUSA Inc.* (Evanston, IL, USA) bestehend aus 9 unabhängigen 16-bit CCD Chips, welche über Lichtfaserkabel mit einem Phosphorbildschirm mit einer Kantenlänge von 225 mm (Pixel Größe 73,24 μm) verbunden waren, aufgenommen. Der Abstand zwischen Probe und Detektor betrug 794 mm. Die Daten wurden mit Hilfe der *Fit2D Software* ausgewertet.³²⁷

6.2.9 CMC-Bestimmungsmethoden

Methode A – CMC-Bestimmung durch ITC: Die ITC-Experimente wurden wie unter 6.2.4 beschrieben durchgeführt, wobei die Probenzelle mit HEPES-Puffer pH 7,3 und die Spritze mit einer 0,8 mM Lipiddispersion in HEPES-Puffer pH 7,3 gefüllt waren.

Methode B – CMC-Bestimmung mittels Fluorescein: Eine Lipidverdünnungsreihe in HEPES-Puffer pH 7,3 wurde in 96-Well Platten (F-bottom) der Firma *Greiner Bio-One GmbH* (Frickhausen, Deutschland) pipettiert und mit Fluorescein versetzt, so dass eine Endkonzentration $c(\text{Fluorescein}) = 10^{-5} \text{ mM}$ und ein Füllvolumen von 200 μl erhalten wurden. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 25 °C unter Lichtausschluss wurde die Absorption

bei 503 nm mittels *Polastar Omega* der Firma *BMG LABTECH GmbH* (Ortenberg, Deutschland) vermessen. Die Experimente wurden dreifach durchgeführt.

Methode C – CMC-Bestimmung mittels DPH: In 96-Well Platten (clear-plate, black, F-bottom) der Firma *Greiner Bio-One GmbH* (Frickenhausen, Deutschland) wurden 199 μ l Lipiddispersion steigender Konzentration in HEPES-Puffer pH 7,3 mit 1 μ l DPH-Lösung (1 mM in THF) versetzt und für 30 min bei 25 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität mittels *Polastar Omega* der Firma *BMG LABTECH GmbH* (Ortenberg, Deutschland) gemessen (λ_{ex} : 355 nm, λ_{em} : 460 nm). Die Experimente wurden dreifach durchgeführt.

6.3 Analysenmethoden und Reinigungsverfahren

6.3.1 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie diente zur Kontrolle von Reaktionsverläufen, zur Prüfung der Reinheit von Zwischen- und Endprodukten sowie zur Charakterisierung der einzelnen Verbindungen durch Bestimmung der R_f -Werte. Die angegebenen R_f -Werte stellen unkorrigierte Werte dar. Es wurden mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Aluminiumplatten der Firma *Merck* (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Substanz wurde in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst, auf die Platten aufgetragen und in Chromatographiekammern unter Kammersättigung entwickelt. Als mobile Phase dienten Standardlaufmittel folgender Zusammensetzungen (V/V/V):

LM 1: CHCl₃/MeOH/NH₃ 90/10/0,5

LM 2: CHCl₃/MeOH/NH₃ 80/20/2

LM 3: CHCl₃/MeOH/NH₃ 65/35/5

LM 4: CHCl₃/MeOH/NH₃ 50/50/10

LM 5: CHCl₃/MeOH/NH₃ 35/65/15

LM 6: CHCl₃/MeOH 95/5

LM 7: CHCl₃/MeOH 9/1

LM 8: CHCl₃/MeOH 8/2

LM 9: CHCl₃/Et₂O 1/1

LM 10: CHCl₃/Heptan 6/4

LM 11: CHCl₃/Heptan 8/2

LM 12: Ethylacetat

LM 13: Ethylacetat/Heptan 1/1

LM 14: Acetonitril/NH₃ 9/1

Folgende Detektionsverfahren kamen zum Einsatz:

- UV-Licht der Wellenlänge 254 nm. Dieses Verfahren der Detektion mittels Fluoreszenzlöschung kam bei Substanzen mit aromatischen Ringsystemen zum Einsatz.
- Bromthymolblau-Lösung (0,1 g Bromthymolblau und 0,2 g KOH in 10 ml Ethanol lösen und mit destilliertem Wasser auf 0,5 l auffüllen): Sensitiver Nachweis für

Verbindungen mit lipophilem Charakter. Die Empfindlichkeit wird durch das Bedampfen mit Ammoniak erhöht.

- wässrige KMnO_4 -Tauchlösung (1 % m/m): Durch Tauchen der DC-Platten mit anschließendem Erwärmen für 5 min bei 80°C im Trockenschrank werden reduzierende Substanzen durch Bildung von Braunstein sichtbar. Die Methode fand bei Substanzen mit aliphatischen Alkoholfunktionen Anwendung, welche als gelbe Flecken auf rosa Grund sichtbar werden.
- $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ -Mischung (10 % V/V): Wurde für die Detektion von Kohlenhydratderivaten verwendet. Die entwickelte DC-Platte wurde in die Mischung getaucht und anschließend bei 80°C 5 min im Trockenschrank erwärmt. Die Substanz erscheint durch Oxidationsprozesse als schwarzer Fleck.
- Iodkammer (Iodbedampfung): Iod lagert sich unspezifisch an eine Vielzahl lipophiler Strukturen an, welche als brauner Fleck sichtbar werden. Das Verfahren wurde für die Detektion der Verbindungen **25a/b** und **26** genutzt.

Säulenchromatographie (SC)

Die Säulenchromatographie diente zur Reinigung der Zwischen- und Endprodukte. Als Trennmittel diente Kieselgel 60 (Korngröße: 0,063-0,200 mm) der Firma *Merck* (Darmstadt, Deutschland). Als Elutionsmittel dienten Heptan/ CHCl_3 -, Heptan/ Et_2O -, $\text{CHCl}_3/\text{Et}_2\text{O}$ -, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ -, $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ - und $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ -Mischungen unterschiedlicher Zusammensetzung. In der Regel wurde die Polarität der Elutionsmittel während der Chromatographie diskontinuierlich erhöht. Die Detektion erfolgte dünnschichtchromatographisch. Es kamen vier verschiedene SC-Methoden zum Einsatz:

- Methode 1 – trocken gepackte Säulen: Die benötigte Kieselgelmenge wurde für ein Verhältnis von 10/1 ($m_{\text{Kieselgel}}/m_{\text{Substanzgemisch}}$) berechnet, trocken in die Säule eingefüllt und anschließend mit dem Elutionsmittel konditioniert.
- Methode 2 – eingeschwemmte Säulen: Die benötigte Kieselgelmenge wurde für ein Verhältnis von 100/1 ($m_{\text{Kieselgel}}/m_{\text{Substanzgemisch}}$) berechnet, mit dem Elutionsmittel suspendiert und unter kontinuierlichem Elutionsmittelstrom in die Säule eingeschwemmt.
- Methode 3 – Frontchromatographie: Die benötigte Kieselgelmenge wurde für ein Verhältnis von 5/1 ($m_{\text{Kieselgel}}/m_{\text{Substanzgemisch}}$) berechnet und trocken in die Säule eingefüllt. Das zu trennende Substanzgemisch wurde in 5 ml Elutionsmittel gelöst auf das trockene unkonditionierte Kieselgel aufgetragen. Anschließend wurde isokratisch eluiert.
- Methode 4 – DMAP-Methode: Das zu reinigende Hydrochloridsalz der Lipide wurde in einer Mischung aus 4 ml CHCl_3 und 1 ml MeOH gelöst und mit DMAP ($n_{\text{DMAP}}/n_{\text{Substanz}}$ 6/1) versetzt. Die benötigte Kieselgelmenge wurde für ein Verhältnis

von 15/1 ($m_{\text{Kieselgel}}/m_{\text{Substanzgemisch}}$) berechnet, trocken in die Säule eingefüllt und anschließend mit dem Elutionsmittel konditioniert.

6.3.2 Schmelzpunktbestimmung

Die Bestimmung der Schmelzpunkte bzw. Schmelzbereiche erfolgte an einem *Boetius* Heitzschmikroskop. Die angegebenen Schmelzpunkte stellen unkorrigierte Werte dar.

6.3.3 Elementaranalyse (EA)

Die Bestimmung des Gehalts an Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff in den Verbindungen erfolgte im automatischen Mikroverfahren an einem *CHNS-932* der Firma *Leco-Corporation* (St. Joseph, MI, USA).

6.3.4 Massenspektrometrie (MS)

Elektronenstoßionisation-Massenspektrometrie (EI-MS)

Die Aufnahme der Massenspektren durch Elektronenstoßionisation erfolgte an einem *AMD 402* (70 eV) der Firma *AMD Intecta GmbH* (Harpstedt, Deutschland).

Gaschromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie (GC-MS)

Die Proben wurden mittels *HP 5890 II-GC* der Firma *Hewlett-Packard* unter Verwendung einer *DB5* 30 m × 0,25 mm (Innendurchmesser) Säule mit 0,25 µm Innenbeschichtung gaschromatographisch getrennt. Die Injektionstemperatur betrug 250 °C, die Temperatur am Detektor betrug 280 °C. Als Detektor diente ein *MS 5971 A*-Massenspektrometer der Firma *Hewlett-Packard*, an welchem das Eluat mittels Elektronenstoßionisation massenspektrometrisch vermessen wurde.

Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die Proben wurden in einer $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ -Mischung (unterschiedliche Zusammensetzung) gelöst und über eine Spritzenpumpe *Havard Apparatus 22* injiziert ($20 \mu\text{l min}^{-1}$). Die Ionisation wurde sowohl positiv als auch negativ im Elektronenspray bei 5,0 kV durchgeführt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einem *Ionenfallen-Massenspektrometer Finnigan LCQ-Classical* der Firma *Thermo Electron* (Egelsbach, Deutschland). Das Gerät verfügt über eine beheizbare Kapillare (220 °C) und weist eine Flussrate von $20 \mu\text{l min}^{-1}$ auf.

Hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS)

Für die Identitätsbestimmung der Endprodukte wurden Massenspektren mit hoher Auflösung aufgenommen. Die Proben wurden in einer $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ -Mischung (unterschiedliche Zusammensetzung) gelöst und mittels *Proxeon-Nano-ESI-Quelle* der Firma *Thermo Fisher Scientific* (Bremen, Deutschland) bei 1,3 kV ionisiert. Die Aufnahme der Spektren erfolgte

mit einem *LTQ-Orbitrap-XL-Massenspektrometer* der Firma *Thermo Fisher Scientific* (Bremen, Deutschland).

6.3.5 NMR-Spektroskopie

^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren wurden an einem *Varian Gemini 2000* (400 MHz für ^1H -NMR und 100 MHz für ^{13}C -NMR) und an einem *Varian Inova 500* (500 MHz für ^1H -NMR und 125 MHz für ^{13}C -NMR) aufgenommen. Als interner Standard diente das verwendete Lösungsmittel. Für die Kalibrierung der ^1H -NMR-Spektren in D_2O wurde die Temperaturabhängigkeit des HDO Peaks berücksichtigt.³²⁸ ^1H -NMR-Spektren wurden in CDCl_3 aufgenommen, bei Löslichkeitsproblemen in D_2O und $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ -Mischungen (unterschiedliche Zusammensetzung in Abhängigkeit der Substanzlöslichkeit). Bei den ^{13}C -NMR-Spektren wurden je nach Löslichkeit in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ -Mischungen, CDCl_3 und D_2O verwendet.

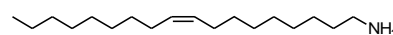
Die chemische Verschiebung δ ist in ppm angegeben und für Signale mit definierten Multiplizitäten auf die Symmetrieachse bezogen. Für Multipletts wurde ein Bereich der chemischen Verschiebung angegeben. Die Signale im ^1H -NMR-Spektrum werden wie folgt zugeordnet: [Multiplizität, Kopplungskonstante J in Hz, Protonenzahl; zugeordnetes Proton (fett, kursiv)]. Für die Multiplizitäten wurden folgende Abkürzungen verwendet: s (Singulett), d (Duplett), t (Triplett), dd (Duplett vom Duplett), ddd (Duplett vom Duplett vom Duplett), dt (Duplett vom Triplett), m (Multiplett).

6.4 Synthese und analytische Charakterisierung der Verbindungen

6.4.1 Synthese der Vorstufen

6.4.1.1 Synthese der Alkylamine

(9Z)-Octadec-9-enylamin - Oleylamin (rein)



Method 1: 18 mmol (5 g) Ölsäure (>99 %) und 18 mmol (1,8 g) TEA wurden in 20 ml THF gelöst. Anschließend wurde unter Rühren 20 ml eine Lösung, bestehend aus 18 mmol (1,95 g) Ethylchloroformiat in THF, langsam bei -5°C zugetropft und 1 h bei -5°C gerührt. Die erhaltene Lösung der aktivierten Carbonsäure wurde nach Filtration unter Inertbedingungen (Entfernung des Triethylammoniumchlorids) mit NH_3 (gelöst in THF) umgesetzt. Dafür wurden 20 ml THF auf -40°C abgekühlt und für 5 min NH_3 -Gas eingeleitet. Anschließend wurde die aktivierte Ölsäure zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde innerhalb von 1 h auf 0°C und anschließend innerhalb von 1 h auf 10°C erwärmt und 5 h bei 10°C gerührt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

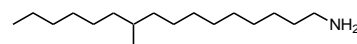
Das so erhaltene Oleylamid wurde in 30 ml THF gelöst und unter Rühren und Eiskühlung tropfenweise mit einer Suspension aus 25 mmol (0,95 g) LiAlH_4 in 40 ml THF versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 8 h bei 55°C gerührt und anschließend unter Eiskühlung mit 5 ml Wasser versetzt. Im Anschluss wurden 20 ml einer NH_4Cl -Lösung (ges.) zugesetzt und 3× mit 50 ml Et_2O extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit NaCl -Lösung (ges.) neutral gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene (9Z)-Octadec-9-enylamin wurde säulenchromatographisch (SC Methode 2) mittels $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ -Gradient gereinigt.

Method 2: Die Reaktionsabläufe wurden analog der Methode 1 durchgeführt, wobei als Abwandlung mit wässrigem konzentrierten NH_3 (33 % m/m) bei 0°C , statt mit der THF/ NH_3 -Lösung bei -40°C , gearbeitet wurde.

Method 3: 18 mmol (5 g) Ölsäure (>99 %) wurde in 20 ml Et_2O gelöst und unter Rühren und Eiskühlung tropfenweise mit einer Suspension aus 25 mmol (0,95 g) LiAlH_4 in 30 ml Et_2O versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 24 h unter Rückfluss gerührt und anschließend unter Eiskühlung mit 5 ml Wasser versetzt. Im Anschluss wurden 20 ml einer NH_4Cl -Lösung (ges.) zugesetzt und 3× mit 50 ml Et_2O extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit NaCl -Lösung (ges.) neutral gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der so erhaltene Oleylalkohol wurde, analog des (10R,S)-10-Methylhexadecylalkohols in der Vorschrift der Synthese des (10R,S)-10-Methylhexadecylamins (siehe unten), weiter zum Oleylamin umgesetzt.

<i>Aussehen:</i>	farblose ölige Flüssigkeit	<i>Summenformel:</i>	$C_{18}H_{37}N$
<i>Ausbeute:</i>	39 % (Methode 1)	<i>Molare Masse:</i>	$267,49 \text{ g mol}^{-1}$
	22 % (Methode 2)	<i>R_f:</i>	0,67 (LM 2)
	53 % (Methode 3)	<i>ESI-MS:</i>	268,2 [M+H] ⁺
¹ H-NMR:	siehe Anhang	¹³ C-NMR:	siehe Anhang

(10*R,S*)-10-Methylhexadecylamin



Die Verbindung wurde in einer Mehrschrittsynthese aus Methylmalonsäurediethylester synthetisiert. Dabei erfolgte die Synthese von (10*R,S*)-10-Methyl-1-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl-oxy)hexadecan nach MARKOWSKI.³²⁹

Für die Abspaltung der THP-Schutzgruppe wurde der THP-Ether in Methanol mit katalytischen Mengen *p*-Toluolsulfonsäure für 3 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel auf die Hälfte eingeeengt und der Ansatz mit 20 ml Wasser versetzt. Die wässrige Mischung wurde 3× mit 50 ml $CHCl_3$ extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene (10*R,S*)-10-Methylhexadecylalkohol wurde säulenchromatographisch (SC Methode 1) mittels $CHCl_3$ /Heptan-Gradient gereinigt (*Ausbeute*: 98 %).

Für die Synthese des Azids wurden 20 mmol (5,0 g) des Alkohols und 25 mmol (2,52 g) TEA in 50 ml $CHCl_3$ gelöst. Anschließend wurde eine Lösung aus 24 mmol (2,75 g) Methansulfonsäurechlorid in 10 ml $CHCl_3$ unter Rühren und Eiskühlung zugetropft und für 7 h bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurden unter Eiskühlung 10 ml Wasser zum Ansatz gegeben. Die abgetrennte organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Im Anschluss wurde das erhaltene Mesylat ohne Reinigung mit 80 mmol (5,15 g) Natriumazid in 30 ml DMF suspendiert und für 24 h auf 60 °C erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz mit 30 ml Wasser versetzt und 3× mit 100 ml $CHCl_3$ extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene (10*R,S*)-10-Methylhexadecylazid wurde säulenchromatographisch (SC Methode 1) mittels $CHCl_3$ /Heptan-Gradient gereinigt (*Ausbeute*: 96 %).

Für die Synthese des Amins wurden 7,1 mmol (2,0 g) des erhaltenen Azids in 50 ml Et_2O gelöst. Anschließend wurden 11,2 mmol (424 mg) $LiAlH_4$ in 5 ml Et_2O suspendiert, unter Rühren und Eiskühlung zum Ansatz zugetropft und 4 h unter Rückfluss gerührt. Zur Aufarbeitung wurden unter Eiskühlung 5 ml Wasser zugetropft. Anschließend wurden 20 ml NaOH-Lösung (7,5 % m/m) zugesetzt und 2× mit 50 ml Et_2O extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit NaCl-Lösung (ges.) neutral gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene (10*R,S*)-10-Methyl-

hexadecylamin wurde säulenchromatographisch (SC Methode 1) mittels $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ -Gradient gereinigt (Ausbeute: 93 %).

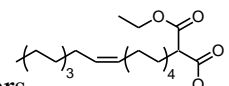
Aussehen:	farblose ölige Flüssigkeit	Molare Masse:	255,48 g mol^{-1}
Summenformel:	$\text{C}_{17}\text{H}_{37}\text{N}$	R _f :	0,31 (LM 1)
Ausbeute:	87 %	ESI-MS:	256,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$
¹ H-NMR:	siehe Anhang	¹³ C-NMR:	siehe Anhang

6.4.1.2 Synthese der alkylierten Malonsäurediethylester

Die Alkylierung des Malonsäurediethylesters mit den entsprechenden Alkylbromiden /Alkylmesylaten erfolgte in Anlehnung an Literaturangaben mit der Abwandlung, dass Toluol als Lösungsmittel genutzt wurde.¹⁴⁴ Das entsprechende Produkt wurde säulenchromatographisch (SC Methode 1) mittels Heptan/ Et_2O -Gradient gereinigt.

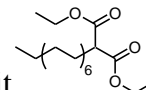
Oeylmalonsäurediethylester (1a)

Die Verbindung wurde durch die Umsetzung des Malonsäurediethylesters mit Oeylmesylat erhalten. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.^{148,330}



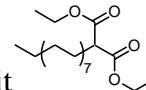
Tetradecylmalonsäurediethylester (1b)

Die Verbindung wurde durch die Umsetzung des Malonsäurediethylesters mit Tetradecylbromid erhalten. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.^{143-145,331}



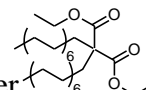
Hexadecylmalonsäurediethylester (1c)

Die Verbindung wurde durch die Umsetzung des Malonsäurediethylesters mit Hexadecylbromid erhalten. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.^{143,146,331}



Ditetradecylmalonsäurediethylester (1d)

Die Verbindung wurde durch die Umsetzung von **1b** mit Tetradecylbromid unter Substitution von Toluol durch Xylol (Isomerengemisch) erhalten.



Aussehen:	weißer kristalliner Feststoff		
Ausbeute:	81 %	Fp:	25-27 °C
Summenformel:	$\text{C}_{35}\text{H}_{68}\text{O}_4$	R _f :	0,58 (LM 10)
Molare Masse:	552,91 g mol^{-1}	ESI-MS:	575,6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$
EA:	ber.: C 76,03	H 12,40	
	gef.: C 75,95	H 12,38	
¹ H-NMR:	siehe Anhang		

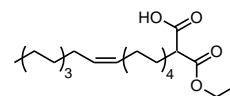
6.4.1.3 Synthese der alkylierten Malonsäuremonoethylester durch Monoverseifung

Die Verbindungen **2a-d** wurden nach der Vorschrift der Monoverseifung von Alkylmalonsäurediethylestern nach BRESLOW synthetisiert.¹⁴⁹ Eine Abwandlung erfolgte durch die

säulenchromatographische Aufreinigung (SC Methode 1) der Produkte mittels CHCl₃/EtOH Gradient.

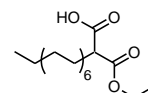
Oleylmalonsäuremonoethylester (tech.) (2a)

Die Verbindung wurde durch Monoverseifung von **1a** erhalten. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.⁸⁸



Tetradecylmalonsäuremonoethylester (2b)

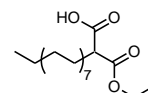
Die Verbindung wurde durch Monoverseifung von **1b** erhalten.



<i>Aussehen:</i>	weißer kristalliner Feststoff		
<i>Ausbeute:</i>	81 %	<i>Fp:</i>	44-46 °C
<i>Summenformel:</i>	C ₁₉ H ₃₆ O ₄	<i>R_f:</i>	0,37 (LM 7)
<i>Molare Masse:</i>	328,5 g mol ⁻¹	<i>ESI-MS:</i>	327,0 [M-H] ⁻
<i>EA:</i>	ber.: C 69,47	H 11,05	
	gef.: C 69,34	H 10,87	
¹ H-NMR:	siehe Anhang		

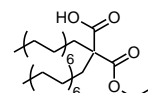
Hexadecylmalonsäuremonoethylester (2c)

Die Verbindung wurde durch Monoverseifung von **1c** erhalten. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.³³²



Ditetradecylmalonsäuremonoethylester (2d)

Die Verbindung wurde durch Monoverseifung von **1d** erhalten.



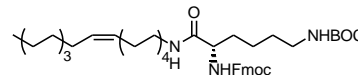
<i>Aussehen:</i>	weißer kristalliner Feststoff		
<i>Ausbeute:</i>	54 %	<i>Fp:</i>	33-35 °C
<i>Summenformel:</i>	C ₃₃ H ₆₄ O ₄	<i>R_f:</i>	0,20 (LM 7)
<i>Molare Masse:</i>	524,9 g mol ⁻¹	<i>ESI-MS:</i>	1047,6 [2M-H] ⁻
<i>EA:</i>	ber.: C 75,52	H 12,29	
	gef.: C 75,56	H 12,04	
¹ H-NMR:	siehe Anhang		

6.4.1.4 Synthese der BOC-Fmoc-geschützten Lysinalkylamide

10 mmol des entsprechenden Alkylamins und 10 mmol (1,29 g) DIPEA wurden in 10 ml CH₂Cl₂ gelöst und bei RT gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus 10 mmol (4,69 g) Fmoc-Lys(BOC)-OH und 10 mmol (5,20 g) PyBOP[®] in 50 ml CH₂Cl₂ zugetropft und 3 h unter Argonatmosphäre gerührt. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz mit 20 ml CH₂Cl₂ verdünnt und mit NaHCO₃-Lösung (ges.) gewaschen. Die abgetrennte organische Phase wurde mit NaCl-Lösung (ges.) neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lö-

sungsmittel unter Vakuum entfernt. Das entsprechende Produkt wurde säulenchromatographisch (SC Methode 1) mittels CHCl₃/MeOH-Gradient gereinigt.

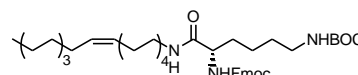
(2S)-6-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)]amino-2-[(9H-fluoren-9-yl)methoxycarbonyl]amino-N-[(9Z)-octadec-9-enyl]hexanamid (tech.) (3a)



Die Verbindung **3a** wurde aus Oleylamin (tech.) synthetisiert.

Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.

(2S)-6-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)]amino-2-[(9H-fluoren-9-yl)methoxycarbonyl]amino-N-[(9Z)-octadec-9-enyl]hexanamid (rein) (3b)



Die Verbindung **3b** wurde aus Oleylamin (rein) synthetisiert.

Aussehen: farbloser kristalliner Feststoff

Ausbeute: 98 % *Fp:* 112-114 °C

Summenformel: C₄₄H₆₇N₃O₅ *R_f:* 0,78 (LM 7)

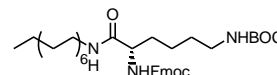
Molare Masse: 718,02 g mol⁻¹ *ESI-MS:* 740,4 [M+Na]⁺

EA: ber.: C 73,60 H 9,41 N 5,85

gef.: C 73,52 H 9,68 N 5,91

¹H-NMR: siehe Anhang

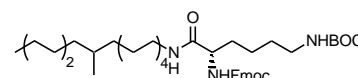
(2S)-6-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)]amino-2-[(9H-fluoren-9-yl)methoxycarbonyl]amino-N-tetradecylhexanamid (3c)



Die Verbindung **3c** wurde aus Tetradecylamin synthetisiert.

Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.

(2S)-6-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)]amino-2-[(9H-fluoren-9-yl)methoxycarbonyl]amino-N-[(10R,S)-10-methylhexadecyl]hexanamid (3d)



Die Verbindung **3d** wurde aus (10R,S)-10-Methylhexadecylamin synthetisiert.

Aussehen: farbloser kristalliner Feststoff

Ausbeute: 79 % *Fp:* 118-120 °C

Summenformel: C₄₃H₆₇N₃O₅ *R_f:* 0,77 (LM 6)

Molare Masse: 706,01 g mol⁻¹ *ESI-MS:* 728,5 [M+Na]⁺

EA: ber.: C 73,15 H 9,57 N 5,95

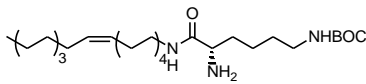
gef.: C 73,11 H 9,91 N 5,95

¹H-NMR: siehe Anhang

6.4.1.5 Fmoc-Schutzgruppenspaltung – Synthese der ϵ -BOC-geschützten Lysinalkylamide

10 mmol der Fmoc-geschützten Verbindung **3a-d** wurde in 55 ml DMF gelöst und mit 64,6 mmol (4,2 g) Piperidin versetzt. Der Ansatz wurde 3 h bei RT gerührt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 50 ml Wasser verdünnt und 3× mit 100 ml Heptan extrahiert. Die organische Phasen wurden vereinigt, mit NaCl-Lösung (ges.) neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das entsprechende Produkt wurde säulenchromatographisch (SC Methode 1) mittels CHCl₃/MeOH/NH₃-Gradient gereinigt.

(2S)-2-Amino-6-[(*tert.*-butoxycarbonyl)]amino-N-[(9Z)-octadec-9-enyl]hexanamid (tech.) (4a)

Die Verbindung wurde aus **3a** synthetisiert und enthält  Oleylamin (tech.) als Baustein. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.

(2S)-2-Amino-6-[(*tert.*-butoxycarbonyl)]amino-N-[(9Z)-octadec-9-enyl]hexanamid (rein) (4b)

Die Verbindung wurde aus **3b** synthetisiert und enthält  Oleylamin (rein) als Baustein.

Aussehen: farbloser wachsartiger Feststoff

Ausbeute: 94 % *Fp:* 51-56 °C

Summenformel: C₂₉H₅₇N₃O₃ *R_f:* 0,87 (LM 7)

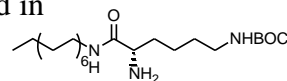
Molare Masse: 495,78 g mol⁻¹ *ESI-MS:* 518,4 [M+Na]⁺

EA: ber.: C 70,25 H 11,59 N 8,48
gef.: C 70,19 H 11,41 N 8,54

¹H-NMR: siehe Anhang

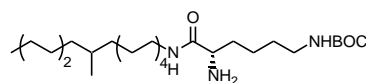
(2S)-2-Amino-6-[(*tert.*-butoxycarbonyl)]amino-N-tetradecylhexanamid (4c)

Die Verbindung wurde aus **3c** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



(2S)-2-Amino-6-[(*tert.*-butoxycarbonyl)]amino-N-[(10R,S)-10-methylhexadecyl]-hexanamid (4d)

Die Verbindung wurde aus **3d** synthetisiert



Aussehen: farbloser kristalliner Feststoff

Ausbeute: 88 % *Fp:* 46-48 °C

Summenformel: C₂₈H₅₇N₃O₃ *R_f:* 0,5 (LM 7)

Molare Masse: 483,77 g mol⁻¹ *ESI-MS:* 484,3 [M+H]⁺

EA:	ber.:	C 69,52	H 11,88	N 8,69
	gef.:	C 69,15	H 11,98	N 8,86
¹ H-NMR:		siehe Anhang		

6.4.2 Synthese der Malonsäurediamide (2. Generation)

6.4.2.1 Allgemeine Synthesevorschriften

Methode A (Amidknüpfung mit PyBOP[®])

20 mmol (2,93 g) Tris(2-aminoethyl)amin bzw. 20 mmol (1,20 g) Ethylendiamin und 2 mmol (202 mg) TEA wurden in 2 ml CH₂Cl₂ gelöst. Anschließend wurden 1 mmol der entsprechenden Carbonsäure und 1 mmol (520,4 mg) PyBOP[®] in 50 ml CH₂Cl₂ gelöst, bei RT unter Argonatmosphäre und Rühren der Aminlösung zugetropft und für 16 h bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die entstandene Suspension filtriert. Das Filtrat wurde mit CHCl₃ verdünnt und mit K₂CO₃-Lösung (15 % m/m) gewaschen. Die abgetrennte organische Phase wurde mit NaCl-Lösung (ges.) neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das entsprechende Produkt wurde säulenchromatographisch (SC Methode 2) mittels CHCl₃/MeOH/NH₃-Gradient gereinigt.

Methode B (Amidknüpfung mit N-Hydroxysuccinimidestern)

Die benötigten Mengen des entsprechenden aminofunktionalisierten Lipids, BOC-Lys(BOC)-OSu und TEA (exakte Mengenangaben siehe entsprechende Lipidgruppe) wurden in 20 ml CH₂Cl₂ gelöst und für 16 h unter Argonatmosphäre bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit 20 ml CHCl₃ verdünnt und mit K₂CO₃-Lösung (15 % m/m) gewaschen. Die abgetrennte organische Phase wurde mit NaCl-Lösung (ges.) neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das entsprechende Produkt wurde säulenchromatographisch (SC Methode 2) mittels CHCl₃/MeOH-Gradient gereinigt.

Methode C (BOC-Schutzgruppenspaltung mit TFA)

0,5 mmol BOC-geschütztes Lipid wurden in 10 ml CH₂Cl₂ gelöst. Anschließend wurde unter Rühren die benötigte Menge TFA (exakte Mengenangaben siehe entsprechende Lipidgruppe) schrittweise der Reaktion zugeführt und 5 h bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde der Reaktionsansatz am Rotationsverdampfer auf 1/10 des Volumens eingengt. Der Rückstand wurde in 20 ml CHCl₃ aufgenommen und auf dem Eiswasserbad unter Rühren tropfenweise mit 10 ml NH₃-Lösung (10 % m/m) versetzt. Anschließend wurde die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase 3× mit 20 ml CHCl₃ extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit NaCl-Lösung (ges.) neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet,

filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das entsprechende Produkt wurde säulenchromatographisch (SC Methode 2) mittels CHCl₃/MeOH/NH₃-Gradient gereinigt.

Methode D (BOC-Schutzgruppenspaltung mit HCl)

0,2 mmol BOC-geschütztes Lipid wurden in 15 ml Ethylacetat suspendiert. Anschließend wurde unter Rühren 4 ml HCl-Lösung (35 % m/m) schrittweise der Reaktion zugeführt und 6 h bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde der Reaktionsansatz am Rotationsverdampfer eingengt. Anschließend kamen folgende Aufarbeitungsmethoden zum Einsatz:

Aufarbeitung 1: Der Rückstand wurde unter Kühlung auf dem Eiswasserbad mit 10 ml NH₃-Lösung (10 % m/m) versetzt. Anschließend wurden 5 ml NaCl-Lösung (ges.) und 5 ml K₂CO₃-Lösung (15 % m/m) zugegeben und 3× mit 20 ml CHCl₃ extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit NaCl-Lösung (ges.) neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das entsprechende Produkt wurde säulenchromatographisch (modifizierte SC Methode 1: 2 g Kieselgel für 150 mg Rohprodukt) mittels CHCl₃/MeOH/NH₃-Gradient gereinigt.

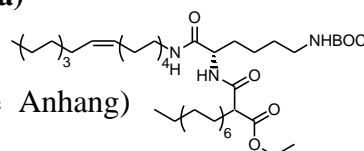
Aufarbeitung 2: Das erhaltene Hydrochloridsalz der Lipide wurde säulenchromatographisch nach SC Methode 4 (DMAP-Methode) gereinigt und in das freie aminofunktionalisierte Lipid überführt.

6.4.2.2 Synthese des Lipidrückgrats über Amidknüpfung

1 mmol des entsprechenden *N*-Alkyllysinamids (**4a-d**) und 2 mmol (250,5 mg) DIPEA wurden in 3 ml CH₂Cl₂ gelöst. Anschließend wurden 1 mmol des entsprechenden Alkylmalon säuremonoesters (**2a-d**) und 1 mmol (520,4 mg) PyBOP[®] in 15 ml CH₂Cl₂ gelöst, unter Rühren und Argonatmosphäre zugetropft und für 16 h bei RT gerührt. Abschließend wurde der Reaktionsansatz mit CHCl₃ verdünnt und mit NaHCO₃-Lösung (5 % m/m) gewaschen. Die organische Phase wurde mit NaCl-Lösung (ges.) neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das entsprechende Produkt wurde säulenchromatographisch (SC Methode 3) mittels CHCl₃/Et₂O (V/V) gereinigt.

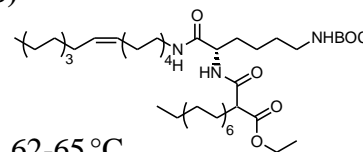
2-[(*N*-{6-[(*tert*.-Butoxycarbonyl)amino]-1-*N*-[(*Z*)-octadec-9-enyl]amino}-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]amino)carbonyl]hexadecansäureethylester (tech.) (**5a**)

Die Verbindung wurde aus **2b** und **4a** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



2-[(N-{6-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-1-{N-[(9Z)-octadec-9-enyl]amino}-1-oxohexan-(2S)-2-yl}amino)carbonyl]hexadecansäureethylester (rein) (5b)

Die Verbindung wurde aus **2b** und **4b** synthetisiert.



Aussehen: farbloser wachsartiger Feststoff

Ausbeute: 98 % *Fp:* 62-65 °C

Summenformel: C₄₈H₉₁N₃O₆ *R_f:* 0,47 (LM 9)

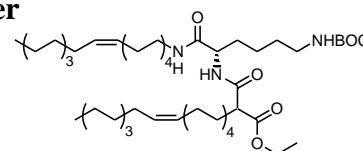
Molare Masse: 806,25 g mol⁻¹ *ESI-MS:* 828,7 [M+Na]⁺

EA: ber.: C 71,51 H 11,38 N 5,21
gef.: C 71,31 H 11,57 N 5,39

¹H-NMR: siehe Anhang

(11Z)-2-[(N-{6-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-1-{N-[(9Z)-octadec-9-enyl]amino}-1-oxohexan-(2S)-2-yl}amino)carbonyl]jicosa-11-ensäureethylester (tech.) (5c)

Die Verbindung wurde aus **2a** und **4a** synthetisiert.



Aussehen: weißer wachsartiger Feststoff

Ausbeute: 97 % *Fp:* 55-58 °C

Summenformel: C₅₂H₉₇N₃O₆ *R_f:* 0,50 (LM 9)

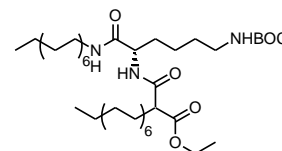
Molare Masse: 860,34 g mol⁻¹ *ESI-MS:* 882,6 [M+Na]⁺

EA: ber.: C 72,59 H 11,36 N 4,88
gef.: C 72,48 H 11,27 N 4,85

¹H-NMR: siehe Anhang

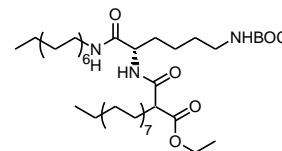
2-[(N-{6-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-[(N-tetradecyl)amino]hexan-(2S)-2-yl}amino)carbonyl]hexadecansäureethylester (5d)

Die Verbindung wurde aus **2b** und **4c** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



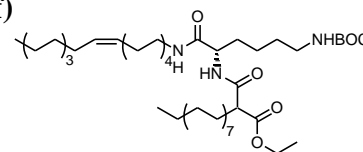
2-[(N-{6-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-[(N-tetradecyl)amino]hexan-(2S)-2-yl}amino)carbonyl]octadecansäureethylester (5e)

Die Verbindung wurde aus **2c** und **4c** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



2-[(N-{6-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-1-{N-[(9Z)-octadec-9-enyl]amino}-1-oxohexan-(2S)-2-yl}amino)carbonyl]octadecansäureethylester (tech.) (5f)

Die Verbindung wurde aus **2c** und **4a** synthetisiert.



Aussehen: weißer kristalliner Feststoff

Ausbeute: 90 % *Fp:* 73-77 °C

Summenformel: C₅₀H₉₅N₃O₆ *R_f:* 0,67 (LM 9)

Molare Masse: 834,31 g mol⁻¹ *ESI-MS:* 856,4 [M+Na]⁺

EA:	ber.:	C 71,98	H 11,48	N 5,04
	gef.:	C 71,66	H 11,52	N 4,89

¹H-NMR: siehe Anhang

2-[(N-{6-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-1-{N-[(10*R,S*)-10-methylhexadecyl]amino}-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl}amino)carbonyl]hexadecansäureethylester (5g)

Die Verbindung wurde aus **2b** und **4d** synthetisiert.

Aussehen: farbloser kristalliner Feststoff

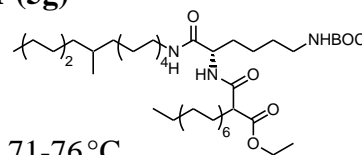
Ausbeute: 92 % *Fp*: 71-76 °C

Summenformel: C₄₇H₉₁N₃O₆ *R_f*: 0,66 (LM 9)

Molare Masse: 794,24 g mol⁻¹ *ESI-MS*: 816,6 [M+Na]⁺

EA:	ber.:	C 71,07	H 11,55	N 5,29
	gef.:	C 71,12	H 11,88	N 5,67

¹H-NMR: siehe Anhang



2-[(N-{6-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-[(N-tetradecyl)amino]hexan-(2*S*)-2-yl}amino)carbonyl]-2-tetradecylhexadecansäureethylester (5h)

Die Verbindung wurde aus **2d** und **4c** synthetisiert.

Aussehen: weißer kristalliner Feststoff

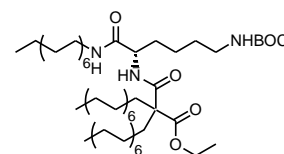
Ausbeute: 99 % *Fp*: 37-39 °C

Summenformel: C₅₈H₁₁₃N₃O₆ *R_f*: 0,86 (LM 6)

Molare Masse: 948,53 g mol⁻¹ *ESI-MS*: 971,9 [M+Na]⁺

EA:	ber.:	C 73,44	H 12,01	N 4,43
	gef.:	C 73,41	H 11,96	N 4,48

¹H-NMR: siehe Anhang

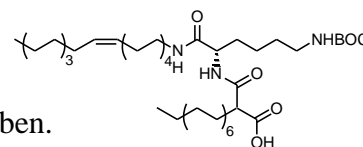


6.4.2.3 Verseifung der Ethylester in Anwesenheit einer BOC-Schutzgruppe.

1 mmol des entsprechenden Ethylesters (**5a-h**) wurden in einer Mischung aus 15 ml THF und 5 ml Wasser gelöst und mit 1,5 mmol (82,2 mg) pulverisiertem KOH versetzt. Der Ansatz wurde 46 h bei RT gerührt. Anschließend wurden 0,75 mmol (73,6 mg) H₂SO₄ in 13 ml Wasser gelöst und unter Eiskühlung zum Reaktionsansatz getropft. Nach 15 min Rühren wurde die freie Säure durch mehrmaliges Ausschütteln mit CHCl₃ aus dem wässrigen Reaktionsansatz extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit NaCl-Lösung (ges.) neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (SC Methode 1) mittels CHCl₃/MeOH-Gradient gereinigt.

2-[(N-{6-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-1-{N-[(9Z)-octadec-9-enyl]amino}-1-oxohexan-(2S)-2-yl}amino)carbonyl]hexadecansäure (tech.) (6a)

Die Verbindung wurde aus **5a** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



2-[(N-{6-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-1-{N-[(9Z)-octadec-9-enyl]amino}-1-oxohexan-(2S)-2-yl}amino)carbonyl]hexadecansäure (rein) (6b)

Die Verbindung wurde aus **5b** synthetisiert.

Aussehen: weißer wachsartiger Feststoff

Ausbeute: 95 %

Fp: 75-78 °C

Summenformel: C₄₆H₈₇N₃O₆

R_f: 0,37 (LM 7)

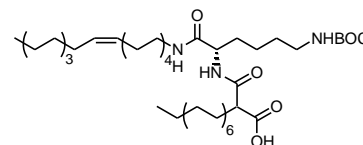
Molare Masse: 778,20 g mol⁻¹

ESI-MS: 777,4 [M-H]⁻

EA: ber.: C 71,00 H 11,27 N 5,40

gef.: C 71,24 H 11,63 N 5,18

¹H-NMR: siehe Anhang



(11Z)-2-[(N-{6-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-1-{N-[(9Z)-octadec-9-enyl]amino}-1-oxohexan-(2S)-2-yl}amino)carbonyl]icosa-11-ensäure (tech.) (6c)

Die Verbindung wurde aus **5c** synthetisiert.

Aussehen: weißer wachsartiger Feststoff

Ausbeute: 97 %

Fp: 59-60 °C

Summenformel: C₅₀H₉₃N₃O₆

R_f: 0,39 (LM 7)

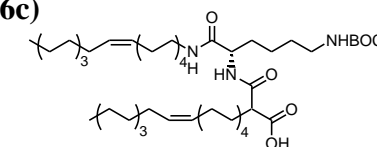
Molare Masse: 832,29 g mol⁻¹

ESI-MS: 830,4 [M-H]⁻

EA: ber.: C 72,15 H 11,26 N 5,05

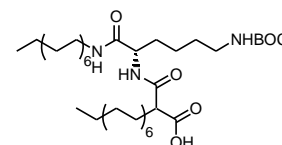
gef.: C 71,94 H 10,91 N 5,13

¹H-NMR: siehe Anhang



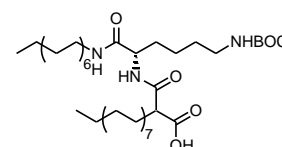
2-[(N-{6-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-[(N-tetradecyl)amino]hexan-(2S)-2-yl}amino)carbonyl]hexadecansäure (6d)

Die Verbindung wurde aus **5d** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.

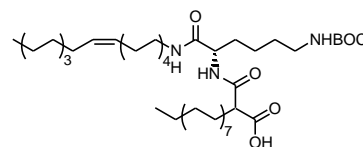


2-[(N-{6-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-[(N-tetradecyl)amino]hexan-(2S)-2-yl}amino)carbonyl]octadecansäure (6e)

Die Verbindung wurde aus **5e** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



2-[(N-{6-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-1-{N-[(9Z)-octadec-9-enyl]amino}-1-oxohexan-(2S)-2-yl}amino)carbonyl]octadecansäure (tech.) (6f)

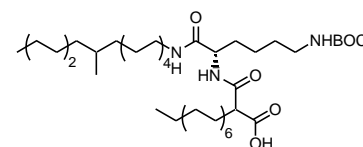


Die Verbindung wurde aus **5f** synthetisiert.

<i>Aussehen:</i>	weißer wachsartiger Feststoff		
<i>Ausbeute:</i>	99 %	<i>Fp:</i>	85-89 °C
<i>Summenformel:</i>	C ₄₈ H ₉₁ N ₃ O ₆	<i>R_f:</i>	0,48 (LM 7)
<i>Molare Masse:</i>	806,25 g mol ⁻¹	<i>ESI-MS:</i>	805,3 [M-H] ⁻
<i>EA:</i>	ber.: C 71,51	H 11,38	N 5,21
	gef.: C 71,11	H 11,24	N 5,12

¹H-NMR: siehe Anhang

2-[(N-{6-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-1-{N-[(10R,S)-10-methylhexadecyl]amino}-1-oxohexan-(2S)-2-yl}amino)carbonyl]hexadecansäure (6g)

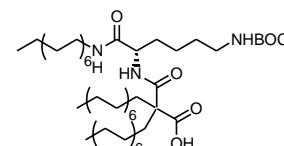


Die Verbindung wurde aus **5g** synthetisiert.

<i>Aussehen:</i>	weißer wachsartiger Feststoff		
<i>Ausbeute:</i>	96 %	<i>Fp:</i>	64-68 °C
<i>Summenformel:</i>	C ₄₅ H ₈₇ N ₃ O ₆	<i>R_f:</i>	0,59 (LM 7)
<i>Molare Masse:</i>	766,19 g mol ⁻¹	<i>ESI-MS:</i>	765,4 [M-H] ⁻
<i>EA:</i>	ber.: C 70,54	H 11,45	N 5,48
	gef.: C 70,57	H 11,57	N 5,39

¹H-NMR: siehe Anhang

2-[(N-{6-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-[(N-tetradecyl)amino]hexan-(2S)-2-yl}amino)carbonyl]-2-tetradecylhexadecansäure (6h)



Die Verbindung wurde aus **5h** synthetisiert.

<i>Aussehen:</i>	farbloser wachsartiger Feststoff		
<i>Ausbeute:</i>	92 %	<i>Fp:</i>	47-52 °C
<i>Summenformel:</i>	C ₅₆ H ₁₀₉ N ₃ O ₆	<i>R_f:</i>	0,67 (LM 7)
<i>Molare Masse:</i>	920,48 g mol ⁻¹	<i>ESI-MS:</i>	919,6 [M-H] ⁻
<i>EA:</i>	ber.: C 71,67	H 11,92	N 4,48
	gef.: C 72,00	H 11,78	N 4,68

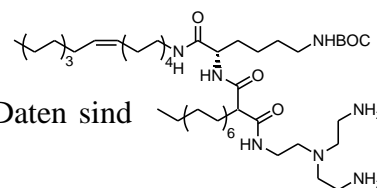
¹H-NMR: siehe Anhang

6.4.2.4 Kupplung der Carbonsäure mit Tris(2-aminoethyl)amin

Die Verbindungen **7a-h** wurden nach Methode A (allgemeine Synthesevorschriften 6.4.2.1) mit den Verbindungen **6a-h** als Carbonsäure und Tris(2-aminoethyl)amin als Amin zum Amid umgesetzt.

***N*-{2-[*N,N*-Bis(2-aminoethyl)amino]ethyl}-*N'*-[6-[*N*-(*tert.*-butoxycarbonyl)amino]-1-{*N*-[(9*Z*)-octadec-9-enyl]amino}-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-2-tetradecylpropandiamid (tech.) (7a)**

Die Verbindung wurde aus **6a** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



***N*-{2-[*N,N*-Bis(2-aminoethyl)amino]ethyl}-*N'*-[6-[*N*-(*tert.*-butoxycarbonyl)amino]-1-{*N*-[(9*Z*)-octadec-9-enyl]amino}-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-2-tetradecylpropandiamid (rein) (7b)**

Die Verbindung wurde aus **6b** synthetisiert.

Aussehen: farbloser kristalliner Feststoff

Ausbeute: 93 %

Fp: 63-67 °C

Summenformel: C₅₂H₁₀₃N₇O₅

R_f: 0,33 (LM 2)

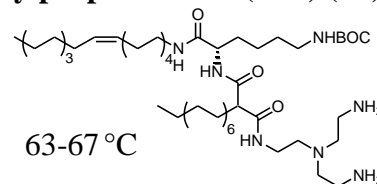
Molare Masse: 906,42 g mol⁻¹

ESI-MS: 906,8 [M+H]⁺

EA: ber.: C 67,56 H 11,45 N 10,61 (7b+1×H₂O)

gef.: C 67,28 H 11,32 N 10,30

¹H-NMR: siehe Anhang



***N*-{2-[*N,N*-Bis(2-aminoethyl)amino]ethyl}-*N'*-[6-[*N*-(*tert.*-butoxycarbonyl)amino]-1-{*N*-[(9*Z*)-octadec-9-enyl]amino}-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-2-[(9*Z*)-octadec-9-enyl]propandiamid (tech.) (7c)**

Die Verbindung wurde aus **6c** synthetisiert.

Aussehen: farbloser wachsartiger Feststoff

Ausbeute: 94 %

Fp: 74-80 °C

Summenformel: C₅₆H₁₀₉N₇O₅

R_f: 0,28 (LM 2)

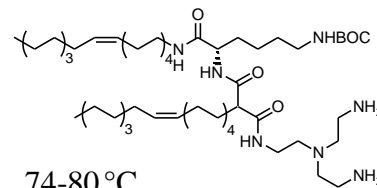
Molare Masse: 960,51 g mol⁻¹

ESI-MS: 961,6 [M+H]⁺

EA: ber.: C 68,73 H 11,44 N 10,02 (7c+1×H₂O)

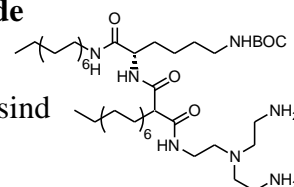
gef.: C 69,04 H 11,63 N 10,19

¹H-NMR: siehe Anhang



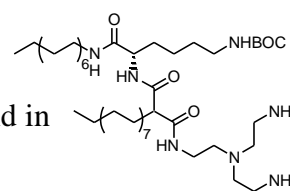
***N*-{2-[*N,N*-Bis(2-aminoethyl)amino]ethyl}-*N'*-[6-[*N*-(*tert.*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-[*N*-(tetradecyl)amino]hexan-(2*S*)-2-yl]-2-tetradecylpropandiamide (7d)**

Die Verbindung wurde aus **6d** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



***N*-{2-[*N,N*-Bis(2-aminoethyl)amino]ethyl}-2-hexadecyl-*N'*-{6-[*N*-(*tert.*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-[*N*-(tetradecyl)amino]hexan-(2*S*)-2-yl]propan-diamid (7e)**

Die Verbindung wurde aus **6e** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



***N*-{2-[*N,N*-Bis(2-aminoethyl)amino]ethyl}-*N'*-{6-[*N*-(*tert.*-butoxycarbonyl)amino]-1-{*N*-[(9*Z*)-octadec-9-enyl]amino}-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-2-hexadecylpropan-diamid (tech.) (7f)**

Die Verbindung wurde aus **6f** synthetisiert.

Aussehen: weißer kristalliner Feststoff

Ausbeute: 85 %

Fp: 88-90 °C

Summenformel: C₅₄H₁₀₇N₇O₅

R_f: 0,17 (LM 2)

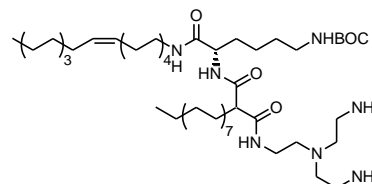
Molare Masse: 934,47 g mol⁻¹

ESI-MS: 935,6 [M+H]⁺

EA: ber.: C 66,83 H 11,53 N 10,10 (7f+2×H₂O)

gef.: C 66,92 H 11,50 N 10,50

¹H-NMR: siehe Anhang



***N*-{2-[*N,N*-Bis(2-aminoethyl)amino]ethyl}-*N'*-{6-[*N*-(*tert.*-butoxycarbonyl)amino]-1-{*N*-[(10*R,S*)-10-methylhexadecyl]amino}-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-2-tetradecylpropan-diamid (7g)**

Die Verbindung wurde aus **6g** synthetisiert.

Aussehen: farbloser wachsartiger Feststoff

Ausbeute: 99 %

Fp: 73-77 °C

Summenformel: C₅₁H₁₀₃N₇O₅

R_f: 0,21 (LM 2)

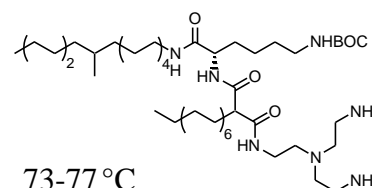
Molare Masse: 894,41 g mol⁻¹

ESI-MS: 895,7 [M+H]⁺

EA: ber.: C 67,13 H 11,60 N 10,75 (7g+1×H₂O)

gef.: C 67,47 H 11,39 N 10,74

¹H-NMR: siehe Anhang



***N*-{2-[*N,N*-Bis(2-aminoethyl)amino]ethyl}-*N'*-{6-[*N*-(*tert.*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-[*N*-(tetradecyl)amino]hexan-(2*S*)-2-yl]-2,2-ditetradecylpropan-diamide (7h)**

Die Verbindung wurde aus **6h** synthetisiert.

Aussehen: gelblich halb feste Substanz

Ausbeute: 61 %

Fp: 42-46 °C

Summenformel: C₆₂H₁₂₅N₇O₅

R_f: 0,53 (LM 2)

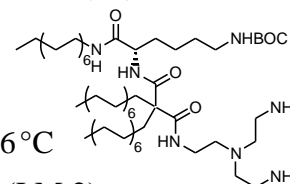
Molare Masse: 1048,70 g mol⁻¹

ESI-MS: 1048,9 [M+H]⁺

EA: ber.: C 69,81 H 12,00 N 9,19 (7h+1×H₂O)

gef.: C 69,69 H 11,66 N 9,28

¹H-NMR: siehe Anhang

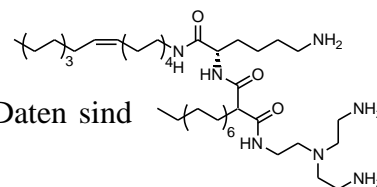


6.4.2.5 Synthese der Lipide des Kopfgruppentyps-IV

Die Verbindungen **8a-h** wurden nach Methode C (allgemeine Synthesevorschriften 6.4.2.1) aus den Verbindungen **7a-h** als BOC-geschütztes Lipid unter Verwendung von 6 ml TFA synthetisiert.

***N*-{6-Amino-1-[*N*-(9*Z*)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl}-*N*'-{2-[*N,N*-bis(2-aminoethyl)amino]ethyl}-2-tetradecylpropandiamid (tech.) (TO-IV = **8a**)**

Die Verbindung wurde aus **7a** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



***N*-{6-Amino-1-[*N*-(9*Z*)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl}-*N*'-{2-[*N,N*-bis(2-aminoethyl)amino]ethyl}-2-tetradecylpropandiamid (rein) (RTO-IV = **8b**)**

Die Verbindung wurde aus **7b** synthetisiert.

Aussehen: weißer wachsartiger Feststoff

Ausbeute: 76 %

Summenformel: C₄₇H₉₅N₇O₃

R_f(Diastereomere): 0,12/0,23 (LM 3)

Molare Masse: 806,30 g mol⁻¹

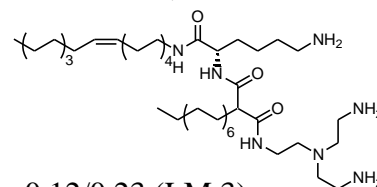
ESI-MS: 806,8 [M+H]⁺

HRMS: ber.: 806,7569 Da
gef.: 806,7569 Da

(C₄₇H₉₆N₇O₃ [M+H]⁺)

¹H-NMR: siehe Anhang

¹³C-NMR: siehe Anhang



***N*-{6-Amino-1-[*N*-(9*Z*)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl}-*N*'-{2-[*N,N*-bis(2-aminoethyl)amino]ethyl}-2-[(9*Z*)-octadec-9-enyl]propandiamid (tech.) (OO-IV = **8c**)**

Die Verbindung wurde aus **7c** synthetisiert.

Aussehen: farblose zähflüssige Substanz

Ausbeute: 86 %

Summenformel: C₅₁H₁₀₁N₇O₃

R_f(Diastereomere): 0,06/0,11 (LM 3)

Molare Masse: 860,39 g mol⁻¹

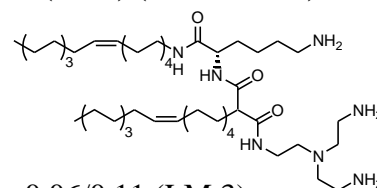
ESI-MS: 860,6 [M+H]⁺

HRMS: ber.: 860,8039 Da
gef.: 860,8060 Da

(C₅₁H₁₀₂N₇O₃ [M+H]⁺)

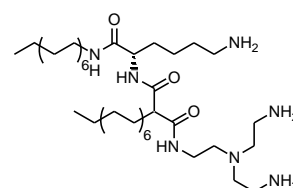
¹H-NMR: siehe Anhang

¹³C-NMR: siehe Anhang



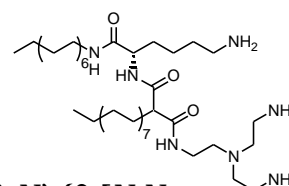
***N*-[6-Amino-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl]-*N*'-{2-[*N,N*-bis(2-aminoethyl)amino]ethyl}-2-tetradecylpropandiamid (TT-IV = **8d**)**

Die Verbindung wurde aus **7d** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



***N*-[6-Amino-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl]-*N'*-{2-[*N,N*-bis(2-aminoethyl)amino]ethyl}-2-hexadecylpropandiamid (HT-IV = 8e)**

Die Verbindung wurde aus **7e** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



***N*-{6-Amino-1-[*N*-(9*Z*)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl}-*N'*-{2-[*N,N*-bis(2-aminoethyl)amino]ethyl}-2-hexadecylpropandiamid (tech.) (HO-IV = 8f)**

Die Verbindung wurde aus **7f** synthetisiert.

Aussehen: weißer wachsartiger Feststoff

Ausbeute: 80 %

Summenformel: C₄₉H₉₉N₇O₃

R_f(Diastereomere): 0,05/0,08 (LM 3)

Molare Masse: 834,36 g mol⁻¹

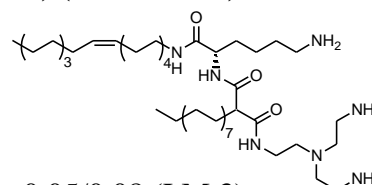
ESI-MS: 834,9 [M+H]⁺

HRMS: ber.: 834,7882 Da
gef.: 834,7871 Da

(C₄₉H₁₀₀N₇O₃ [M+H]⁺)

¹H-NMR: siehe Anhang

¹³C-NMR: siehe Anhang



***N*-(6-Amino-1-{*N*-[(10*R,S*)-10-methylhexadecyl]amino}-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl)-*N'*-{2-[*N,N*-bis(2-aminoethyl)amino]ethyl}-2-tetradecylpropandiamid (THM-IV = 8g)**

Die Verbindung wurde aus **7g** synthetisiert.

Aussehen: farblose kristalline Substanz

Ausbeute: 76 %

Summenformel: C₄₆H₉₅N₇O₅

R_f(Diastereomere): 0,08/0,11 (LM 3)

Molare Masse: 794,29 g mol⁻¹

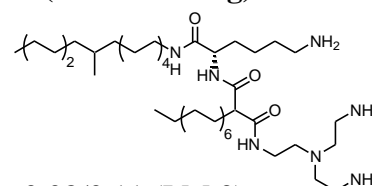
ESI-MS: 794,7 [M+H]⁺

HRMS: ber.: 794,7569 Da
gef.: 794,7569 Da

(C₄₆H₉₆N₇O₃ [M+H]⁺)

¹H-NMR: siehe Anhang

¹³C-NMR: siehe Anhang



***N*-[6-Amino-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl]-*N'*-{2-[*N,N*-bis(2-aminoethyl)amino]ethyl}-2,2-ditetradecylpropandiamid (DiTT-IV = 8h)**

Die Verbindung wurde aus **7h** synthetisiert.

Aussehen: farbloser wachsartiger Feststoff

Ausbeute: 80 %

Summenformel: C₅₇H₁₁₇N₇O₃

R_f: 0,28 (LM 2)

Molare Masse: 948,58 g mol⁻¹

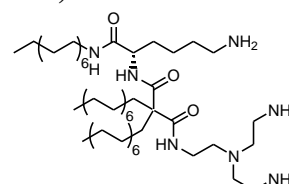
ESI-MS: 948,9 [M+H]⁺

HRMS: ber.: 948,9291 Da
gef.: 948,9323 Da

(C₅₇H₁₁₈N₇O₃ [M+H]⁺)

¹H-NMR: siehe Anhang

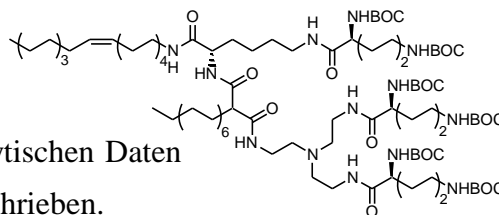
¹³C-NMR: siehe Anhang



6.4.2.6 Synthese der BOC-geschützten Verbindungen 9a,c,f,h

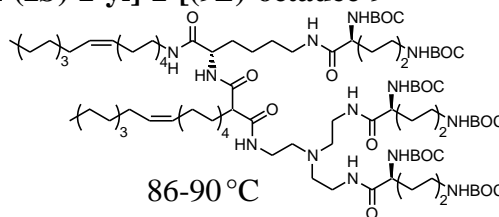
Die Verbindungen **9a,c-f,h** wurden nach Methode B (allgemeine Synthesevorschriften 6.4.2.1) aus den BOC-geschützten Verbindungen **8a,c-f,h** (0,5 mmol) unter Verwendung von 1,5 mmol BOC-Lys(BOC)-OSu und 1,5 mmol TEA synthetisiert.

N-(2-{N,N-Bis[2-(N-((2S)-2,6-di[N-(tert.-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino)-ethyl]amino}ethyl)-N'-[6-(N-((2S)-2,6-di[N-(tert.-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)-amino)-1-[N-(9Z)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2S)-2-yl]-2-tetradecylpropandiamid (tech.) (9a)



Die Verbindung wurde aus **8a** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.

N-(2-{N,N-Bis[2-(N-((2S)-2,6-di[N-(tert.-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino)-ethyl]amino}ethyl)-N'-[6-(N-((2S)-2,6-di[N-(tert.-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)-amino)-1-[N-(9Z)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2S)-2-yl]-2-(9Z)-octadec-9-enyl]propandiamid (tech.) (9c)



Die Verbindung wurde aus **8c** synthetisiert.

Aussehen: weißer kristalliner Feststoff

Ausbeute: 84 %

Fp: 86-90 °C

Summenformel: C₉₉H₁₈₅N₁₃O₁₈

R_f: 0,72 (LM 7)

Molare Masse: 1845,61 g mol⁻¹

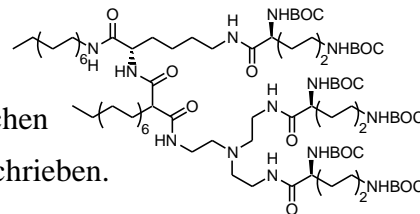
ESI-MS: 1867,8 [M+Na]⁺

EA: ber.: C 64,43 H 10,10 N 9,87

gef.: C 64,10 H 9,99 N 10,03

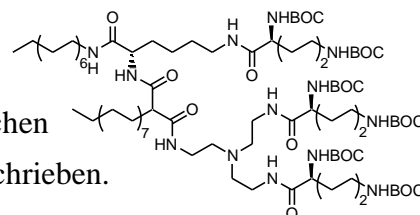
¹H-NMR: siehe Anhang

N-(2-{N,N-Bis[2-(N-((2S)-2,6-di[N-(tert.-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino)-ethyl]amino}ethyl)-N'-[6-(N-((2S)-2,6-di[N-(tert.-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)-amino)-1-oxo-1-(N-tetradecylamino)hexan-(2S)-2-yl]-2-tetradecylpropandiamid (9d)



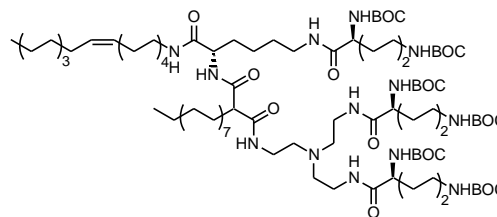
Die Verbindung wurde aus **8d** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.

N-(2-{N,N-Bis[2-(N-((2S)-2,6-di[N-(tert.-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino)-ethyl]amino}ethyl)-N'-[6-(N-((2S)-2,6-di[N-(tert.-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)-amino)-1-oxo-1-(N-tetradecylamino)hexan-(2S)-2-yl]-2-hexadecylpropandiamid (9e)



Die Verbindung wurde aus **8e** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.

***N*-(2-{*N,N*-Bis[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*.-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino]-ethyl)amino}ethyl)-*N'*-[6-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*.-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)-amino)-1-[*N*-(9*Z*)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-2-hexadecylpropandiamid (tech.) (9f)**



Die Verbindung wurde aus **8f** synthetisiert.

Aussehen: weißer kristalliner Feststoff

Ausbeute: 76 %

Fp: 98-105 °C

Summenformel: C₉₇H₁₈₃N₁₃O₁₈

R_f: 0,74 (LM 7)

Molare Masse: 1819,57 g mol⁻¹

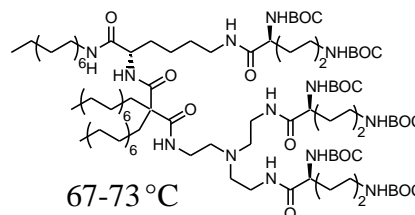
ESI-MS: 1842,4 [M+Na]⁺

EA: ber.: C 64,03 H 10,14 N 10,01

gef.: C 63,68 H 10,05 N 10,25

¹H-NMR: siehe Anhang

***N*-(2-{*N,N*-Bis[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*.-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino]-ethyl)amino}ethyl)-*N'*-[6-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*.-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)-amino)-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl]-2,2-ditetradecylpropandiamid (9h)**



Die Verbindung wurde aus **8h** synthetisiert.

Aussehen: farbloser kristalliner Feststoff

Ausbeute: 77 %

Fp: 67-73 °C

Summenformel: C₁₀₅H₂₀₁N₁₃O₁₈

R_f: 0,56 (LM 6)

Molare Masse: 1933,80 g mol⁻¹

ESI-MS: 1934,4 [M+H]⁺

EA: ber.: C 65,21 H 10,48 N 9,42

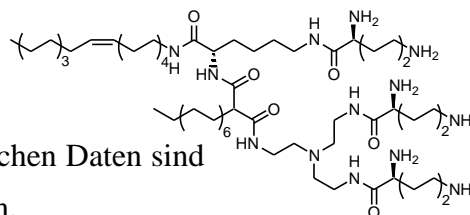
gef.: C 65,34 H 10,34 N 9,37

¹H-NMR: siehe Anhang

6.4.2.7 Synthese der Lipide des Kopfgruppentyps-VI

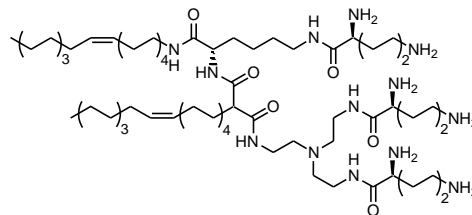
Die folgenden Verbindungen wurden nach Methode D (allgemeine Synthesevorschriften 6.4.2.1) aus **9a,c-f,h** als BOC-geschütztes Lipid synthetisiert.

***N*-(2-[*N,N*-Bis(2-{*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino}ethyl)amino]ethyl)-*N'*-(6-{*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino}-1-[*N*-(9*Z*)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-2-tetradecylpropandiamid (tech.) (TO-VI)**



Die Verbindung wurde aus **9a** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.

***N*-{2-[*N,N*-Bis(2-[*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino)ethyl)amino]ethyl}-*N'*-(6-{*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino}-1-[*N*-(9*Z*)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl)-2-[9*Z*]-octadec-9-enyl]propandiamid (tech.) (OO-VI)**



Die Verbindung wurde aus **9c** synthetisiert.

Aussehen: farbloser wachsartiger Feststoff

Ausbeute: 90 % (Aufarbeitung 2)

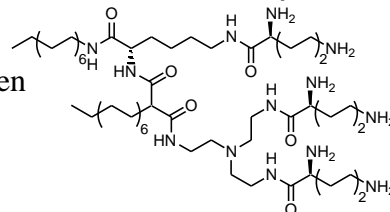
Summenformel: C₆₉H₁₃₇N₁₃O₆ *R_f(Diastereomere):* 0,08/0,11 (LM 5)

Molare Masse: 1244,91 g mol⁻¹ *ESI-MS:* 1246,2 [M+H]²⁺

HRMS: ber.: 623,0480 Da (C₆₉H₁₃₉N₆O₁₃ [M+2H]⁺)
gef.: 623,0479 Da

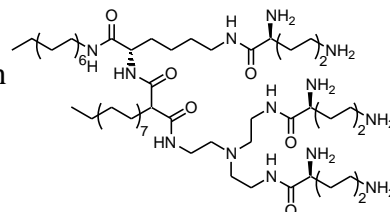
¹H-NMR: siehe Anhang ¹³C-NMR: siehe Anhang

***N*-{2-[*N,N*-Bis(2-[*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino)ethyl)amino]ethyl}-*N'*-(6-{*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino}-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl)-2-tetradecylpropandiamid (TT-VI)**



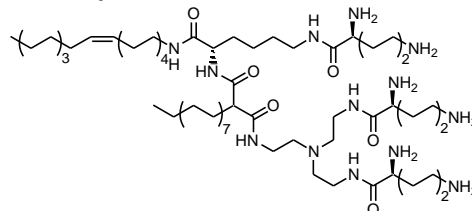
Die Verbindung wurde aus **9d** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.

***N*-{2-[*N,N*-Bis(2-[*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino)ethyl)amino]ethyl}-*N'*-(6-{*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino}-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl)-2-hexadecylpropandiamid (HT-VI)**



Die Verbindung wurde aus **9e** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.

***N*-{2-[*N,N*-Bis(2-[*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino)ethyl)amino]ethyl}-*N'*-(6-{*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino}-1-[*N*-(9*Z*)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl)-2-hexadecylpropandiamid (tech.) (HO-VI)**



Die Verbindung wurde aus **9f** synthetisiert.

Aussehen: farbloser wachsartiger Feststoff

Ausbeute: 94 % (Aufarbeitung 2)

Summenformel: C₆₇H₁₃₅N₁₃O₆ *R_f(Diastereomere):* 0,09/0,12 (LM 5)

Molare Masse: 1218,87 g mol⁻¹ *ESI-MS:* 1220,0 [M+H]⁺

HRMS: ber.: 1219,0731 Da (C₆₇H₁₃₆N₁₃O₆ [M+H]⁺)
gef.: 1219,0721 Da

¹H-NMR: siehe Anhang ¹³C-NMR: siehe Anhang

***N*-{2-[*N,N*-Bis(2-{*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino}ethyl)amino]ethyl)-*N*'-(6-[*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino]-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl)-2,2-ditetradecylpropandiamid (DiTT-VI)**

Die Verbindung wurde aus **9h** synthetisiert.

Aussehen: farbloser wachsartiger Feststoff

Ausbeute: 79 % (Aufarbeitung 2)

Summenformel: C₇₅H₁₅₃N₁₃O₆

R_f(Diastereomere): 0,13 (LM 5)

Molare Masse: 1333,10 g mol⁻¹

ESI-MS: 1334,2 [M+H]⁺

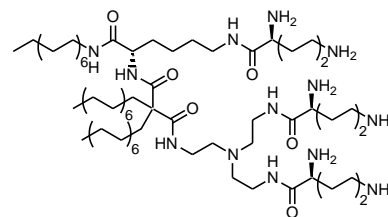
HRMS: ber.: 667,1106 Da

(C₇₅H₁₅₅N₁₃O₆ [M+2H]²⁺)

gef.: 667,1122 Da

¹H-NMR: siehe Anhang

¹³C-NMR: siehe Anhang



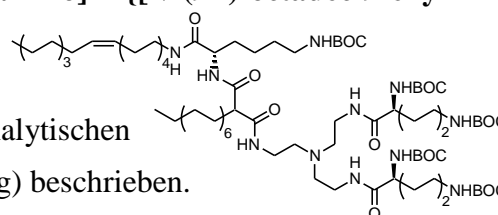
6.4.2.8 Synthese des BOC-geschützten Verbindungen 10a,c-f

Die Verbindungen **10a,c-f** wurden nach Methode B (allgemeine Synthesevorschriften 6.4.2.1) aus den BOC-geschützten Verbindungen **7a,c-f** (0,5 mmol) unter Verwendung von 1 mmol BOC-Lys(BOC)-OSu und 1 mmol TEA synthetisiert.

***N*-{2-[*N,N*-Bis[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl}amino)-ethyl)amino]ethyl)-*N*'-{6-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-[[*N*-(9*Z*)-octadec-9-enyl-amino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-2-tetradecylpropandiamid (tech.) (10a)**

Die Verbindung wurde aus **7a** synthetisiert. Die analytischen

Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



***N*-{2-[*N,N*-Bis[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl}amino)-ethyl)amino]ethyl)-*N*'-{6-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-[[*N*-(9*Z*)-octadec-9-enyl-amino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-2-[(9*Z*)-octadec-9-enyl]propandiamid (tech.) (10c)**

Die Verbindung wurde aus **7c** synthetisiert.

Aussehen: farbloser kristalliner Feststoff

Ausbeute: 97 %

Fp: 102-106 °C

Summenformel: C₈₈H₁₆₅N₁₁O₁₅

R_f: 0,83 (LM 7)

Molare Masse: 1617,32 g mol⁻¹

ESI-MS: 1638,6 [M+Na]⁺

EA: ber.: C 65,35

H 10,28

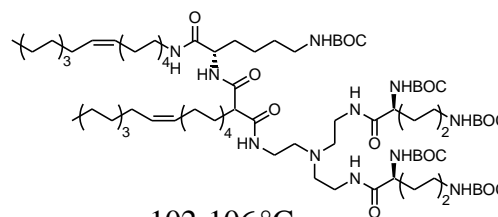
N 9,53

gef.: C 65,53

H 10,15

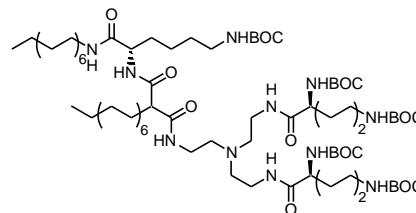
N 9,59

¹H-NMR: siehe Anhang



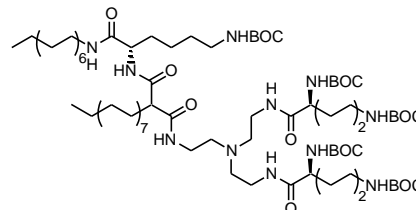
***N*-(2-{*N,N*-Bis[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert.*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino)-ethyl]amino}ethyl)-*N'*-{6-[*N*-(*tert.*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl]-2-tetradecylpropandiamid (10d)**

Die Verbindung wurde aus **7d** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



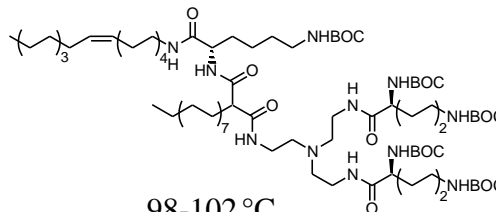
***N*-(2-{*N,N*-Bis[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert.*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino)-ethyl]amino}ethyl)-*N'*-{6-[*N*-(*tert.*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl]-2-hexadecylpropandiamid (10e)**

Die Verbindung wurde aus **7e** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



***N*-(2-{*N,N*-Bis[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert.*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino)-ethyl]amino}ethyl)-*N'*-{6-[*N*-(*tert.*-butoxycarbonyl)amino]-1-[*N*-(9*Z*)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-2-hexadecylpropandiamid (tech.) (10f)**

Die Verbindung wurde aus **7f** synthetisiert.



Aussehen: farbloser kristalliner Feststoff

Ausbeute: 76 %

Fp: 98-102 °C

Summenformel: C₈₆H₁₆₃N₁₁O₁₅

R_f: 0,72 (LM 7)

Molare Masse: 1591,28 g mol⁻¹

ESI-MS: 1613,8 [M+Na]⁺

EA: ber.: C 64,91 H 10,32 N 9,68

gef.: C 64,51 H 10,29 N 9,70

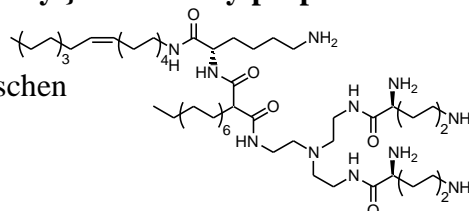
¹H-NMR: siehe Anhang

6.4.2.9 Synthese der Lipide des Kopfgruppentyps-VIII

Die folgenden Verbindungen wurden nach Methode D (allgemeine Synthesevorschriften 6.4.2.1) aus **10a,c-f** als BOC-geschütztes Lipid synthetisiert.

***N*-(6-Amino-1-{*N*-[(9*Z*)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl})-*N'*-{2-[*N,N*-bis(2-{*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino}ethyl)amino]ethyl)-2-tetradecylpropandiamid (tech.) (TO-VIII)**

Die Verbindung wurde aus **10a** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



***N*-(6-Amino-1-{*N*-[(9*Z*)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl})-*N*'-{2-[*N,N*-bis(2-[*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino)ethyl]-amino]ethyl}-2-[(9*Z*)-octadec-9-enyl]-propandiamid (tech.) (OO-VIII)**

Die Verbindung wurde aus **10c** synthetisiert.

Aussehen: farbloser wachsartiger Feststoff

Ausbeute: 58 % (Aufarbeitung 1)

Summenformel: C₆₃H₁₂₅N₁₁O₅

R_f(Diastereomere): 0,16/0,22 (LM 5)

Molare Masse: 1116,74 g mol⁻¹

ESI-MS: 1116,8 [M+H]⁺

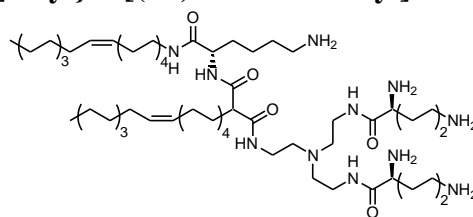
HRMS: ber.: 559,0005 Da

(C₆₃H₁₂₇N₁₁O₅ [M+2H]²⁺)

gef.: 559,0013 Da

¹H-NMR: siehe Anhang

¹³C-NMR: siehe Anhang



***N*-[6-Amino-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl]-*N*'-{2-[*N,N*-bis(2-[*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino)ethyl]amino]ethyl}-2-tetradecylpropandiamid (TT-VIII)**

Die Verbindung wurde aus **10d** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.

***N*-[6-Amino-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl]-*N*'-{2-[*N,N*-bis(2-[*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino)ethyl]amino]ethyl}-2-hexadecylpropandiamid (HT-VIII)**

Die Verbindung wurde aus **10e** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.

***N*-(6-Amino-1-{*N*-[(9*Z*)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl})-*N*'-{2-[*N,N*-bis(2-[*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino)ethyl]-amino]ethyl}-2-hexadecylpropandiamid (tech.) (HO-VIII)**

Die Verbindung wurde aus **10f** synthetisiert.

Aussehen: farbloser wachsartiger Feststoff

Ausbeute: 96 % (Aufarbeitung 2)

Summenformel: C₆₁H₁₂₃N₁₁O₅

R_f(Diastereomere): 0,18/0,29 (LM 5)

Molare Masse: 1090,70 g mol⁻¹

ESI-MS: 1091,8 [M+H]⁺

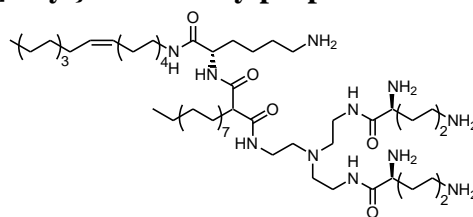
HRMS: ber.: 1090,9781 Da

(C₆₁H₁₂₄N₁₁O₅ [M+H]⁺)

gef.: 1090,9786 Da

¹H-NMR: siehe Anhang

¹³C-NMR: siehe Anhang

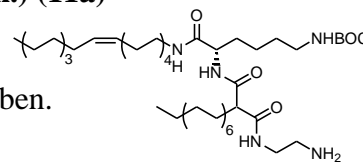


6.4.2.10 Kupplung der Carbonsäure mit Ethylendiamin

Die Verbindungen **11a-g** wurden nach Methode A (allgemeine Synthesevorschriften 6.4.2.1) aus **6a-g** als Carbonsäure und Ethylendiamin als Amin zum Amid umgesetzt.

***N*-(2-Aminoethyl)-*N*'-[6-[*N*-(*tert*-butoxy-carbonyl)amino]-1-{*N*-[(9*Z*)-octadec-9-enyl]-amino}-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-2-tetradecylpropandiamid (tech.) (11a)**

Die Verbindung wurde aus **6a** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



***N*-(2-Aminoethyl)-*N*'-[6-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-{*N*-[(9*Z*)-octadec-9-enyl]amino}-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-2-tetradecylpropandiamid (rein) (11b)**

Die Verbindung wurde aus **6b** synthetisiert.

Aussehen: farbloser kristalliner Feststoff

Ausbeute: 65 %

Fp: 99-102 °C

Summenformel: C₄₈H₉₃N₅O₅

R_f: 0,81 (LM 2)

Molare Masse: 820,28 g mol⁻¹

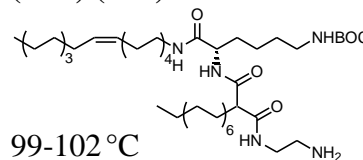
ESI-MS: 820,8 [M+H]⁺

EA: ber.: C 68,77 H 11,42 N 8,35

(11b+1×H₂O)

gef.: C 68,94 H 11,22 N 8,30

¹H-NMR: siehe Anhang



***N*-(2-Aminoethyl)-*N*'-[6-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-{*N*-[(9*Z*)-octadec-9-enyl]-amino}-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-2-[(9*Z*)-octadec-9-enyl]propandiamid (tech.) (11c)**

Die Verbindung wurde aus **6c** synthetisiert.

Aussehen: farbloser kristalliner Feststoff

Ausbeute: 98 %

Fp: 97-99 °C

Summenformel: C₅₂H₉₉N₅O₅

R_f: 0,80 (LM 2)

Molare Masse: 874,37 g mol⁻¹

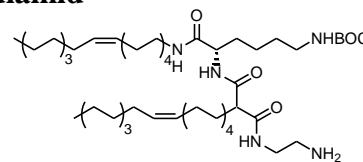
ESI-MS: 875,5 [M+H]⁺

EA: ber.: C 69,99 H 11,41 N 7,85

(11c+1×H₂O)

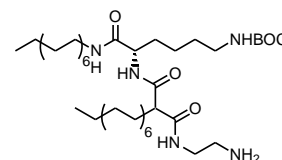
gef.: C 70,24 H 11,51 N 7,85

¹H-NMR: siehe Anhang



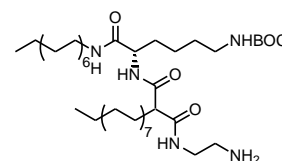
***N*-(2-Aminoethyl)-*N*'-[6-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-[*N*-(tetradecyl)amino]-hexan-(2*S*)-2-yl]-2-tetradecylpropandiamid (11d)**

Die Verbindung wurde aus **6d** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



***N*-(2-Aminoethyl)-2-hexadecyl-*N*'-[6-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-[*N*-(tetradecyl)amino]hexan-(2*S*)-2-yl]propandiamid (11e)**

Die Verbindung wurde aus **6e** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



***N*-(2-Aminoethyl)-*N*'-{6-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-[*N*-(9*Z*)-octadec-9-enyl]amino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl}-2-hexadecylpropandiamid (tech.) (11f)**

Die Verbindung wurde aus **6f** synthetisiert.

Aussehen: farbloser kristalliner Feststoff

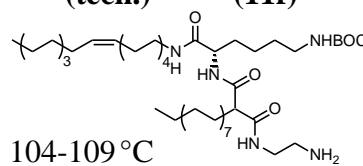
Ausbeute: 98 % *Fp*: 104-109 °C

Summenformel: C₅₀H₉₇N₅O₅ *R_f*: 0,78 (LM 2)

Molare Masse: 848,34 g mol⁻¹ *ESI-MS*: 848,8 [M+H]⁺

EA: ber.: C 69,32 H 11,52 N 8,08 (11f+1×H₂O)
gef.: C 69,61 H 11,23 N 8,18

¹H-NMR: siehe Anhang



***N*-(2-Aminoethyl)-*N*'-{6-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-[*N*-(10*R,S*)-10-methylhexadecyl]amino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl}-2-tetradecylpropandiamid (11g)**

Die Verbindung wurde aus **6g** synthetisiert.

Aussehen: weißer kristalliner Feststoff

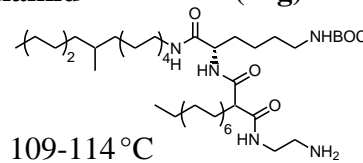
Ausbeute: 99 % *Fp*: 109-114 °C

Summenformel: C₄₇H₉₃N₅O₅ *R_f*: 0,74 (LM 2)

Molare Masse: 808,27 g mol⁻¹ *ESI-MS*: 809,5 [M+H]⁺

EA: ber.: C 68,32 H 11,59 N 8,48
gef.: C 68,54 H 11,22 N 8,33

¹H-NMR: siehe Anhang

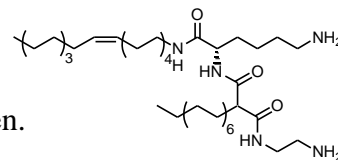


6.4.2.11 Synthese der Lipide des Kopfgruppentyps-X

Die folgenden Verbindungen wurden nach Methode C (allgemeine Synthesevorschriften 6.4.2.1) aus **11a-g** als BOC-geschütztes Lipid unter Verwendung von 4 ml TFA synthetisiert.

***N*-(2-Aminoethyl)-*N*'-{6-amino-1-[*N*-(9*Z*)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl}-2-tetradecylpropandiamid (tech.) (TO-X = 12a)**

Die Verbindung wurde aus **11a** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



***N*-(2-Aminoethyl)-*N*'-{6-amino-1-[*N*-(9*Z*)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl}-2-tetradecylpropandiamid (rein) (RTO-X = 12b)**

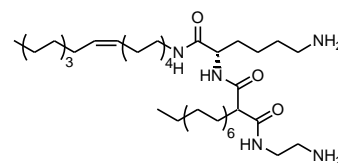
Die Verbindung wurde aus **11b** synthetisiert.

Aussehen: farbloser kristalliner Feststoff

Ausbeute: 62 %

Summenformel: C₄₃H₈₅N₅O₃ *R_f*(Diastereomere): 0,09/0,14 (LM 2)

Molare Masse: 720,17 g mol⁻¹ *ESI-MS*: 720,5 [M+H]⁺



HRMS: ber.: 720,6725 Da (C₄₃H₈₆N₅O₃ [M+H]⁺)
gef.: 720,6725 Da

¹H-NMR: siehe Anhang ¹³C-NMR: siehe Anhang

N-(2-Aminoethyl)-N`-[6-amino-1-[N-(9Z)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2S)-2-yl]-2-[(9Z)-octadec-9-enyl]propandiamid (tech.) (OO-X = 12c)

Die Verbindung wurde aus **11c** synthetisiert.

Aussehen: farbloser wachsartiger Feststoff

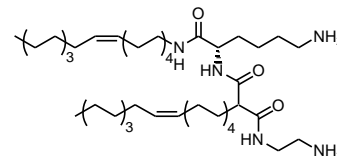
Ausbeute: 84 %

Summenformel: C₄₇H₉₁N₅O₃ R_f(Diastereomere): 0,20/0,30 (LM 2)

Molare Masse: 774,26 g mol⁻¹ ESI-MS: 774,5 [M+H]⁺

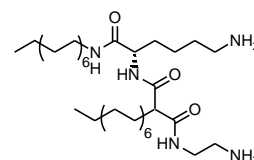
HRMS: ber.: 774,7195 Da (C₄₇H₉₂N₅O₃ [M+H]⁺)
gef.: 774,7195 Da

¹H-NMR: siehe Anhang ¹³C-NMR: siehe Anhang



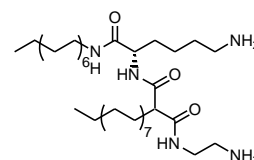
N-(2-Aminoethyl)-N`-[6-amino-1-oxo-1-[(N-tetradecylamino)hexan-(2S)-2-yl]-2-tetradecylpropandiamid (TT-X = 12d)

Die Verbindung wurde aus **11d** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



N-(2-Aminoethyl)-N`-[6-amino-1-oxo-1-(N-tetradecylamino)hexan-(2S)-2-yl]-2-hexadecylpropandiamid (HT-X = 12e)

Die Verbindung wurde aus **11e** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



N-(2-Aminoethyl)-N`-[6-amino-1-[N-(9Z)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2S)-2-yl]-2-hexadecylpropandiamid (tech.) (HO-X = 12f)

Die Verbindung wurde aus **11f** synthetisiert.

Aussehen: farbloser kristalliner Feststoff

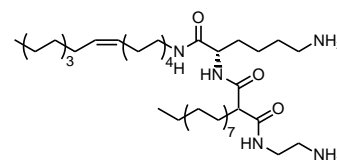
Ausbeute: 88 %

Summenformel: C₄₅H₈₉N₅O₃ R_f(Diastereomere): 0,17/0,24 (LM 2)

Molare Masse: 748,22 g mol⁻¹ ESI-MS: 748,6 [M+H]⁺

HRMS: ber.: 748,7038 Da (C₄₅H₉₀N₅O₃ [M+H]⁺)
gef.: 748,7031 Da

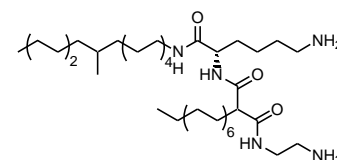
¹H-NMR: siehe Anhang ¹³C-NMR: siehe Anhang



N-(2-Aminoethyl)-N`-(6-amino-1-{N-[(10R,S)-10-methylhexadecyl]amino}-1-oxohexan-(2S)-2-yl)-2-tetradecylpropandiamid (THM-X = 12g)

Die Verbindung wurde aus **11g** synthetisiert.

Aussehen: farbloser kristalliner Feststoff



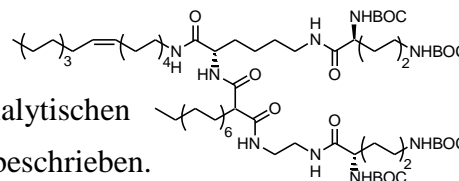
Ausbeute:	98 %	
Summenformel:	C ₄₂ H ₈₅ N ₅ O ₃	R _f (Diastereomere): 0,09/0,16 (LM 2)
Molare Masse:	708,16 g mol ⁻¹	ESI-MS: 708,6 [M+H] ⁺
HRMS:	ber.: 708,6725 Da gef.: 708,6725 Da	(C ₄₂ H ₈₆ N ₅ O ₃ [M+H] ⁺)
¹ H-NMR:	siehe Anhang	¹³ C-NMR: siehe Anhang

6.4.2.12 Synthese der BOC-geschützten Lipide 13a,c-f

Die Verbindungen **13a,c-f** wurden nach Methode B (allgemeine Synthesevorschriften 6.4.2.1) aus den BOC-geschützten Verbindungen **12a,c-f** (0,5 mmol) unter Verwendung von 1 mmol BOC-Lys(BOC)-OSu und 1 mmol TEA synthetisiert.

N-[2-(N-((2S)-2,6-Di[N-(tert.-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino)ethyl)-N'-[6-(N-((2S)-2,6-di[N-(tert.-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino-1-[N-(9Z)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2S)-2-yl]-2-tetradecylpropandiamid (tech.) (13a)

Die Verbindung wurde aus **12a** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



N-[2-(N-((2S)-2,6-Di[N-(tert.-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino)ethyl)-N'-[6-(N-((2S)-2,6-di[N-(tert.-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino-1-[N-(9Z)-octadec-9-enyl]propandiamid (tech.) (13c)

Die Verbindung wurde aus **13c** synthetisiert.

Aussehen: farbloser kristalliner Feststoff

Ausbeute: 94 % Fp: 131-135 °C

Summenformel: C₇₉H₁₄₇N₉O₁₃ R_f: 0,73 (LM 7)

Molare Masse: 1431,07 g mol⁻¹ ESI-MS: 1452,7 [M+Na]⁺

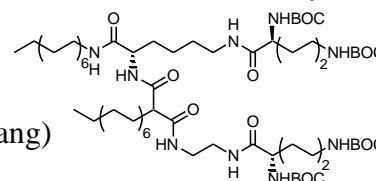
EA: ber.: C 66,30 H 10,35 N 8,81

gef.: C 66,68 H 9,99 N 9,04

¹H-NMR: siehe Anhang

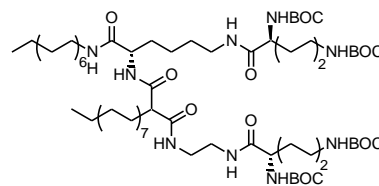
N-[2-(N-((2S)-2,6-Di[N-(tert.-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino)ethyl)-N'-[6-(N-((2S)-2,6-di[N-(tert.-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino-1-oxo-1-(N-tetradecylamino)hexan-(2S)-2-yl]-2-tetradecylpropandiamid (13d)

Die Verbindung wurde aus **12d** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



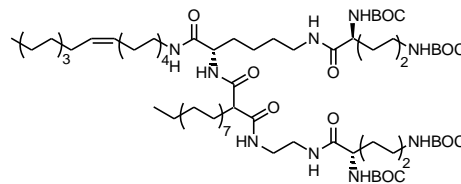
***N*-[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-Di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino)ethyl]-*N'*-[6-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino-1-oxo-1-(*N*-tetradecyl-amino)hexan-(2*S*)-2-yl]-2-hexadecylpropandiamid (13e)**

Die Verbindung wurde aus **12e** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



***N*-[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-Di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino)ethyl]-*N'*-[6-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino-1-[*N*-(9*Z*)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-2-hexadecylpropandiamid (tech.) (13f)**

Die Verbindung wurde aus **12f** synthetisiert.



Aussehen: farbloser kristalliner Feststoff

Ausbeute: 85 %

Fp: 134-137 °C

Summenformel: C₇₇H₁₄₅N₉O₁₃

R_f: 0,80 (LM 7)

Molare Masse: 1405,02 g mol⁻¹

ESI-MS: 1429,1 [M+Na]⁺

EA: ber.: C 65,82 H 10,40 N 8,97

gef.: C 65,60 H 10,20 N 8,91

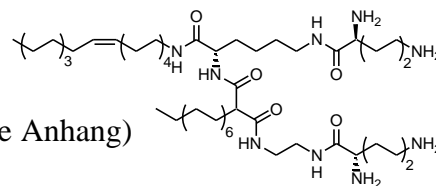
¹H-NMR: siehe Anhang

6.4.2.13 Synthese der Lipide des Kopfgruppentyps-XII

Die folgenden Verbindungen wurden nach Methode C (allgemeine Synthesevorschriften 6.4.2.1) aus **13a,c-f** als BOC-geschütztes Lipid unter Verwendung von 8 ml TFA synthetisiert.

***N*-[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-Diamino-1-oxohexyl}amino)ethyl]-*N'*-[6-(*N*-{(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl}amino-1-[*N*-(9*Z*)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-2-tetradecylpropandiamid (tech.) (TO-XII)**

Die Verbindung wurde aus **13a** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



***N*-[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-Diamino-1-oxohexyl}amino)ethyl]-*N'*-[6-(*N*-{(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl}amino-1-[*N*-(9*Z*)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-2-[(9*Z*)-octadec-9-enyl]propandiamid (tech.) (OO-XII)**

Die Verbindung wurde aus **13c** synthetisiert.

Aussehen: weißer wachsartiger Feststoff

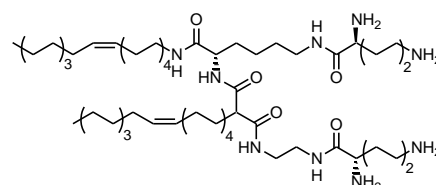
Ausbeute: 84 %

Summenformel: C₅₉H₁₁₅N₉O₅

R_f(Diastereomere): 0,19/0,28 (LM 4)

Molare Masse: 1030,60 g mol⁻¹

ESI-MS: 1030,6 [M+H]⁺

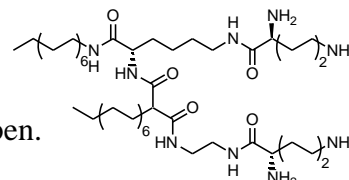


HRMS: ber.: 515,9583 Da (C₅₉H₁₁₇N₉O₅ [M+2H]²⁺)
gef.: 515,9595 Da

¹H-NMR: siehe Anhang ¹³C-NMR: siehe Anhang

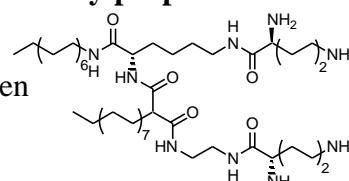
N-[2-(N-((2S)-2,6-Diamino-1-oxohexyl)amino)ethyl]-N'-[6-(N-((2S)-2,6-diamino-1-oxohexyl)amino-1-oxo-1-(N-tetradecylamino)hexan-(2S)-yl)]-2-tetradecylpropandiamid (TT-XII)

Die Verbindung wurde aus **13d** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



N-(2-{N-[(2S)-2,6-Diamino-1-oxohexyl]amino}ethyl)-N'-[6-(N-((2S)-2,6-diamino-1-oxohexyl)amino-1-oxo-1-(N-tetradecylamino)hexan-(2S)-2-yl)]-2-hexadecylpropandiamid (HT-XII)

Die Verbindung wurde aus **13e** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



N-(2-{N-[(2S)-2,6-Diamino-1-oxohexyl]amino}ethyl)-N'-[6-(N-((2S)-2,6-diamino-1-oxohexyl)amino-1-[N-(9Z)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2S)-2-yl)]-2-hexadecylpropandiamid (tech.) (HO-XII)

Die Verbindung wurde aus **13f** synthetisiert.

Aussehen: weißer wachsartiger Feststoff

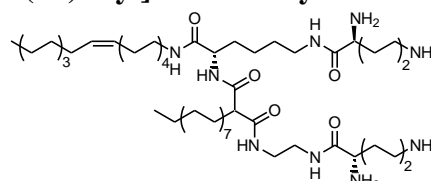
Ausbeute: 70 %

Summenformel: C₅₇H₁₁₃N₉O₅ *R_f*(Diastereomere): 0,17/0,28 (LM 4)

Molare Masse: 1004,56 g mol⁻¹ ESI-MS: 1005,0 [M+H]⁺

HRMS: ber.: 1004,8937 Da (C₅₇H₁₁₄N₉O₅ [M+H]⁺)
gef.: 1004,8937 Da

¹H-NMR: siehe Anhang ¹³C-NMR: siehe Anhang

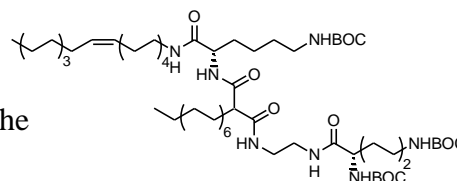


6.4.2.14 Synthese der BOC-geschützten Lipide 14a-g

Die Verbindungen **14a-g** wurden nach Methode B (allgemeine Synthesevorschriften 6.4.2.1) aus den BOC-geschützten Verbindungen **11a-g** (0,5 mmol) unter Verwendung von 0,5 mmol BOC-Lys(BOC)-OSu und 0,5 mmol TEA synthetisiert.

N-[6-[N-(tert.-Butoxycarbonyl)amino]-1-{N-[(9Z)-octadec-9-enyl]}amino-1-oxohexan-(2S)-2-yl]-N'-[2-(N-((2S)-2,6-di[N-(tert.-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino)-ethyl]-2-tetradecylpropandiamid (tech.) (14a)

Die Verbindung wurde aus **11a** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.



***N*-{6-[*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-1-{*N*-[(9*Z*)-octadec-9-enyl]}amino-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-*N*'-[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino)ethyl]-2-tetradecylpropandiamid (rein) (14b)**

Die Verbindung wurde aus **11b** synthetisiert.

Aussehen: farbloser kristalliner Feststoff

Ausbeute: 97 %

Fp: 135-138 °C

Summenformel: C₆₄H₁₂₁N₇O₁₀

R_f: 0,72 (LM 7)

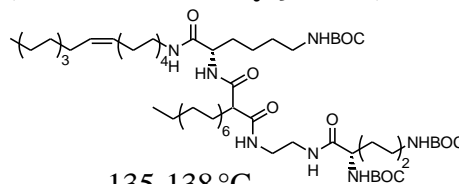
Molare Masse: 1148,69 g mol⁻¹

ESI-MS: 1170,8 [M+Na]⁺

EA: ber.: C 66,92 H 10,62 N 8,54

gef.: C 66,73 H 10,96 N 8,53

¹H-NMR: siehe Anhang



***N*-{6-[*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-1-{*N*-[(9*Z*)-octadec-9-enyl]}amino-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-*N*'-[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino)ethyl]-2-[(9*Z*)-octadec-9-enyl]propandiamid (tech.) (14c)**

Die Verbindung wurde aus **11c** synthetisiert.

Aussehen: farbloser kristalliner Feststoff

Ausbeute: 98 %

Fp: 136-139 °C

Summenformel: C₆₈H₁₂₇N₇O₁₀

R_f: 0,77 (LM 7)

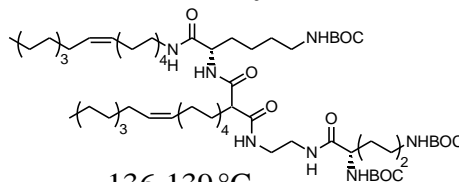
Molare Masse: 1202,78 g mol⁻¹

ESI-MS: 1224,6 [M+Na]⁺

EA: ber.: C 67,90 H 10,64 N 8,15

gef.: C 68,16 H 10,48 N 8,16

¹H-NMR: siehe Anhang



***N*-{6-[*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-[(*N*-tetradecyl)amino]hexan-(2*S*)-2-yl]-*N*'-[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino)ethyl]-2-tetradecylpropandiamid (14d)**

Die Verbindung wurde aus **11d** synthetisiert. Die analytischen

Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang)

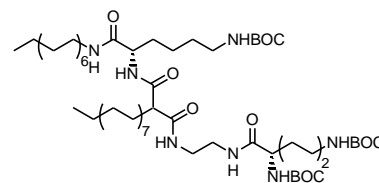
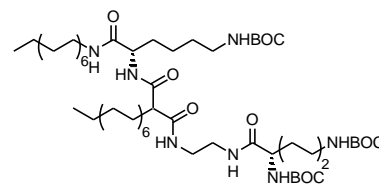
beschrieben.

***N*-{6-[*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-[(*N*-tetradecyl)amino]hexan-(2*S*)-2-yl]-*N*'-[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino)ethyl]-2-hexadecylpropandiamid (14e)**

Die Verbindung wurde aus **11e** synthetisiert. Die analytischen

Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang)

beschrieben.



***N*-{6-[*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-1-{*N*-[(9*Z*)-octadec-9-enyl]}amino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl}-*N*'-[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl}amino)ethyl]-2-hexadecylpropandiamid (tech.) (14f)**

Die Verbindung wurde aus **11f** synthetisiert.

Aussehen: farbloser kristalliner Feststoff

Ausbeute: 97 %

Fp: 135-138 °C

Summenformel: C₆₆H₁₂₅N₇O₁₀

R_f: 0,67 (LM 7)

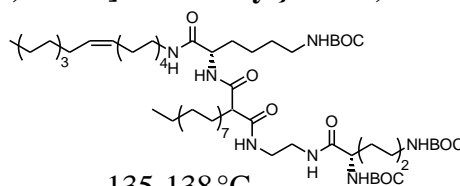
Molare Masse: 1176,74 g mol⁻¹

ESI-MS: 1198,7 [M+Na]⁺

EA: ber.: C 67,36 H 10,71 N 8,33

gef.: C 67,27 H 10,37 N 8,31

¹H-NMR: siehe Anhang



***N*-{6-[*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-1-{*N*-[(10*R,S*)-10-methylhexadecyl]}amino]}-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl}-*N*'-[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl}amino)ethyl]-2-tetradecylpropandiamid (14g)**

Die Verbindung wurde aus **11g** synthetisiert.

Aussehen: farbloser kristalliner Feststoff

Ausbeute: 94 %

Fp: 135-139 °C

Summenformel: C₆₃H₁₂₁N₇O₁₀

R_f: 0,73 (LM 7)

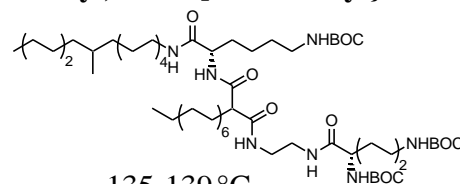
Molare Masse: 1136,68 g mol⁻¹

ESI-MS: 1159,7 [M+Na]⁺

EA: ber.: C 66,57 H 10,73 N 8,63

gef.: C 66,19 H 10,58 N 8,48

¹H-NMR: siehe Anhang

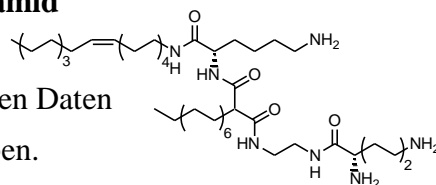


6.4.2.15 Synthese der Lipide des Kopfgruppentyps-XIV

Die folgenden Verbindungen wurden nach Methode C (allgemeine Synthesevorschriften 6.4.2.1) aus **14a-g** als BOC-geschütztes Lipid unter Verwendung von 6 ml TFA synthetisiert.

***N*-{6-Amino-1-[*N*-(9*Z*)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl}-*N*'-[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl}amino)ethyl]-2-tetradecylpropandiamid (tech.) (TO-XIV)**

Die Verbindung wurde aus **14a** synthetisiert. Die analytischen Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.

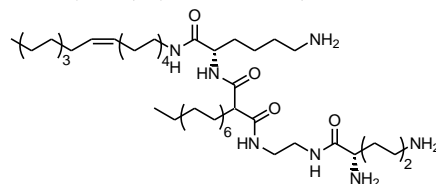


***N*-{6-Amino-1-[*N*-(9*Z*)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl}-*N*'-[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl}amino)ethyl]-2-tetradecylpropandiamid (rein) (RTO-XIV)**

Die Verbindung wurde aus **14b** synthetisiert.

Aussehen: farbloser kristalliner Feststoff

Ausbeute: 81 %



<i>Summenformel:</i>	C ₄₉ H ₉₇ N ₇ O ₄	<i>R_f(Diastereomere):</i>	0,11/0,17 (LM 3)
<i>Molare Masse:</i>	848,34 g mol ⁻¹	<i>ESI-MS:</i>	848,6 [M+H] ⁺
<i>HRMS:</i>	ber.: 848,7675 Da gef.: 848,7689 Da		(C ₄₉ H ₉₈ N ₇ O ₄ [M+H] ⁺)
¹ H-NMR:	siehe Anhang	¹³ C-NMR:	siehe Anhang

***N*-{6-Amino-1-[*N*-(9*Z*)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-*N*'-[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl}amino)ethyl]-2-[(9*Z*)-octadec-9-enyl]propandiamid (tech.) (OO-XIV)**

Die Verbindung wurde aus **14c** synthetisiert.

Aussehen: durchsichtig wachsartiger Feststoff

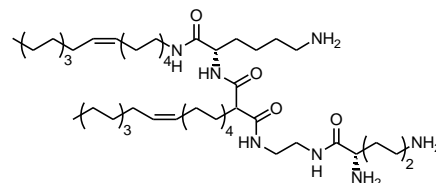
Ausbeute: 80 %

Summenformel: C₅₃H₁₀₃N₇O₄ *R_f(Diastereomere):* 0,13/0,22 (LM 3)

Molare Masse: 902,43 g mol⁻¹ *ESI-MS:* 902,6 [M+H]⁺

HRMS: ber.: 902,8144 Da (C₅₃H₁₀₄N₇O₄ [M+H]⁺)
gef.: 902,8160 Da

¹H-NMR: siehe Anhang ¹³C-NMR: siehe Anhang



***N*-[6-Amino-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl]-*N*'-[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl}amino)ethyl]-2-tetradecylpropandiamid (TT-XIV)**

Die Verbindung wurde aus **14d** synthetisiert. Die analytischen

Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.

***N*-[6-Amino-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl]-*N*'-[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl}amino)ethyl]-2-hexadecylpropandiamid (HT-XIV)**

Die Verbindung wurde aus **14e** synthetisiert. Die analytischen

Daten sind in WÖLK et al.¹⁷⁶ (Publikation siehe Anhang) beschrieben.

***N*-{6-Amino-1-[*N*-(9*Z*)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-*N*'-[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl}amino)ethyl]-2-hexadecylpropandiamid (tech.) (HO-XIV)**

Die Verbindung wurde aus **14f** synthetisiert.

Aussehen: weißer kristalliner Feststoff

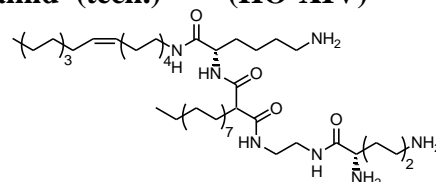
Ausbeute: 82 %

Summenformel: C₅₁H₁₀₁N₇O₄ *R_f(Diastereomere):* 0,08/0,12 (LM 3)

Molare Masse: 876,39 g mol⁻¹ *ESI-MS:* 876,7 [M+H]⁺

HRMS: ber.: 876,7988 Da (C₅₁H₁₀₂N₇O₄ [M+H]⁺)
gef.: 876,7977 Da

¹H-NMR: siehe Anhang ¹³C-NMR: siehe Anhang



***N*-[6-Amino-1-*N*-[(10*R,S*)-10-methylhexadecyl]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-*N*'-(2-*N*-[(2*S*)-2,6-diamino]-1-oxohexyl)amino)ethyl)-2-tetradecylpropandiamid (THM-XIV)**

Die Verbindung wurde aus **14g** synthetisiert.

Aussehen: farblose kristalline Substanz

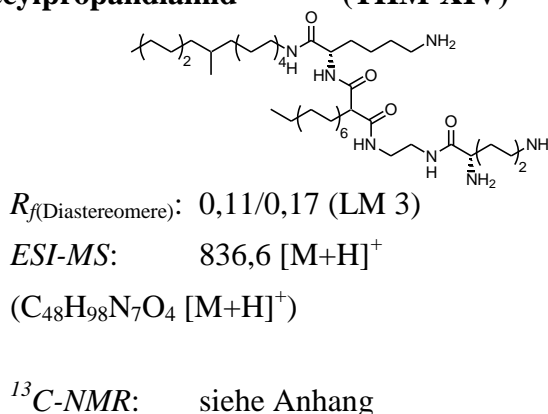
Ausbeute: 87,1 %

Summenformel: C₄₈H₉₇N₇O₄

Molare Masse: 836,33 g mol⁻¹

HRMS: ber.: 836,7675 Da
gef.: 836,7689 Da

¹H-NMR: siehe Anhang



6.4.3 Synthese der Lipide **XV** und **XVp**

Die Lipide **XV** und **XVp** wurden auf identischem Weg synthetisiert. Lediglich der Reinheitsgrad des verwendeten Oleylamins war unterschiedlich. Für die Synthese von **XV** wurde Oleylamin (tech.) verwendet während für die Synthese von **XVp** Oleylamin (rein) zum Einsatz kam.

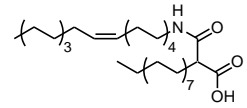
1 mmol (267,5 mg) Oleylamin und 2 mmol (250,5 mg) DIPEA wurden in 3 ml CH₂Cl₂ gelöst. Anschließend wurden 1 mmol (370,6 mg) **2c** und 1 mmol (520,4 mg) PyBOP[®] in 15 ml CH₂Cl₂ gelöst, unter Rühren und Argonatmosphäre zugetropft und für 16 h bei RT gerührt. Abschließend wurde der Reaktionsansatz mit CHCl₃ verdünnt und mit NaHCO₃-Lösung (5 % m/m) gewaschen. Die abgetrennte organische Phase wurde mit NaCl-Lösung (ges.) neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (SC Methode 2) mittels CHCl₃/MeOH/NH₃-Gradient gereinigt, anschließend in 100 ml Ethanol suspendiert und mit 20 mmol (1,12 g) Kaliumhydroxid versetzt. Die Mischung wurde für 5 h unter Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Zur Gewinnung der freien Säure (**15a,b**) wurde der Rückstand in 100 ml Wasser unter Eiskühlung und Rühren vorsichtig mit 2,5 ml konzentrierte Salzsäure versetzt. Der Ansatz wurde 1 h gerührt und anschließend mehrfach mit CHCl₃ extrahiert. Nach dem Vereinigen der organischen Phasen wurden diese über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingengt. Die Säuren **15a,b** wurden säulenchromatographisch (SC Methode 1) mittels CHCl₃/Et₂O (V/V) gereinigt.

Für die Synthese der Amine **16a,b** wurden die Carbonsäuren **15a,b** mit PyBOP[®] und Ethylen-diamin nach Methode A der allgemeinen Synthesevorschriften (siehe Kap. 6.4.2.1) umgesetzt. Für die Synthese der Lipide **XV** und **XVp** wurde im ersten Schritt das Amin **16a,b** (0,5 mmol) mit BOC-Lys(BOC)-OSu (0,5 mmol) nach Methode B (siehe Kap. 6.4.2.1) umgesetzt. Im zweiten Schritt erfolgte dann die Abspaltung der BOC-Schutzgruppe mit TFA nach

Methode C (siehe Kap. 6.4.2.1) unter Verwendung von 4 ml TFA je 0,5 mmol BOC-geschütztes Lipid.

2-[(9Z)-Octadec-9-enylamino]carbonyloctadecansäure (tech.) (15a)

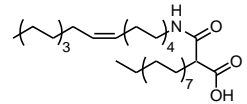
Die Verbindung **15a** wurde aus Oleylamin (tech.) synthetisiert. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.⁸⁸



Ausbeute: 75 %

2-[(9Z)-Octadec-9-enylamino]carbonyloctadecansäure (rein) (15b)

Die Verbindung **15b** wurde aus Oleylamin (rein) synthetisiert.



Aussehen: weißer wachsartiger Feststoff

Ausbeute: 81 % *Fp*: 63-69 °C

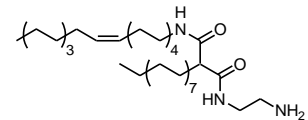
Summenformel: C₃₇H₇₁N₁O₃ *R_f*: 0,61 (LM 11)

Molare Masse: 577,97 g mol⁻¹ *ESI-MS*: 576,3 [M-H]⁻

¹H-NMR: siehe Anhang

N-(2-Aminoethyl)-2-hexadecyl-N'-[(9Z)-octadec-9-enyl]propandiamid (tech.) (16a)

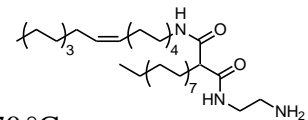
Die Verbindung **16a** wurde aus **15a** synthetisiert. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.⁸⁸



Ausbeute: 79 %

N-(2-Aminoethyl)-2-hexadecyl-N'-[(9Z)-octadec-9-enyl]propandiamid (rein) (16b)

Die Verbindung **16b** wurde aus **15b** synthetisiert.



Aussehen: weißer wachsartiger Feststoff

Ausbeute: 65 % *Fp*: 67-70 °C

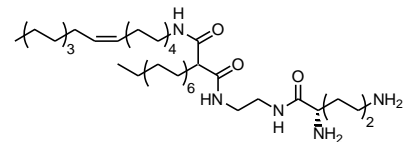
Summenformel: C₃₉H₇₇N₃O₂ *R_f*: 0,72 (LM 2)

Molare Masse: 620,05 g mol⁻¹ *ESI-MS*: 620,4 [M+H]⁺

¹H-NMR: siehe Anhang

N'-2-[(2,6-Diamino-1-oxohexyl)amino]ethyl-2-hexadecyl-N-[(9Z)-octadec-9-enyl]-propandiamid (tech.) (Lipid XV)

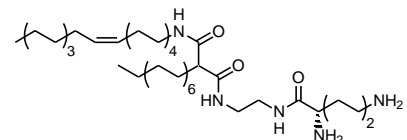
Das Lipid **XV** wurde aus **16a** synthetisiert. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.⁸⁸



Ausbeute: 70 %

N'-2-[(2,6-Diamino-1-oxohexyl)amino]ethyl-2-hexadecyl-N-[(9Z)-octadec-9-enyl]-propandiamid (rein) (Lipid XVp)

Das Lipid **XVp** wurde aus **16b** synthetisiert.



Aussehen: farblose kristalline Substanz

Ausbeute: 81 %

Summenformel:	C ₄₅ H ₈₉ N ₅ O ₃	R _f :	0,41 (LM 2)
Molare Masse:	748,22 g mol ⁻¹	ESI-MS:	748,4 [M+H] ⁺
HRMS:	ber.: 748,7038 Da gef.: 748,7031 Da	(C ₄₅ H ₉₀ N ₅ O ₃ [M+H] ⁺)	
¹ H-NMR:	siehe Anhang	¹³ C-NMR:	siehe Anhang

6.4.4 Synthese der glycosylierten Lipide

6.4.4.1 Synthese von 2-Azidoethanol

2-Azidoethanol wurde in Abwandlung einer Vorschrift von PFAENDLER und WEIMAR aus 2-Bromethanol (in Originalvorschrift 2-Chlorethanol) und NaN₃ dargestellt.¹⁹¹ Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.¹⁹¹

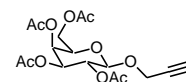
6.4.4.2 Synthese der Galactosederivate mit Acetylschutzgruppe – Glycosylierung

Die im Folgenden beschriebene Synthese basiert auf der Synthesevorschrift zur Darstellung von 1-*O*-Allylglucopyranosiden nach SCHMIDT und stellt eine Abwandlung der von TAKANO et al. beschriebenen Synthese dar.^{192,193}

10 mmol (3,9 g) peracetylierte Galactose (**17**) wurden in 50 ml CH₂Cl₂ gelöst. 11 mmol (1,36 ml) BF₃-Etherat-Komplex wurden langsam unter Argonatmosphäre zugetropft und 60 min gerührt. Anschließend wurden 15 mmol der Alkoholkomponente zugetropft und 5 h bei RT gerührt. Für die Aufarbeitung wurde der Ansatz mit 5 ml NaHCO₃-Lösung (ges.) und 20 ml CHCl₃ versetzt und für 30 min gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt, mit NaCl-Lösung (ges.) neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Galactosid wurde säulenchromatographisch (SC Methode 1) mittels Heptan/Ethylacetat-Gradient gereinigt.

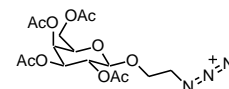
1-*O*-Propargyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-*D*-galactopyranosid (**18**)

Die Verbindung **18** wurde aus peracetylierter Galactose (**17**) und Propargylalkohol synthetisiert.



Aussehen:	farblose hochviskose Flüssigkeit	Ausbeute:	73 %
Summenformel:	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₀	R _f :	0,31 (LM 13)
Molare Masse:	386,35 g mol ⁻¹	ESI-MS:	409,04 [M+Na] ⁺
¹ H-NMR:	siehe Anhang		

1-O-(2-Azidoethyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosid (19)

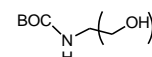


Die Verbindung **19** wurde aus peracetylierter Galactose (**17**) und 2-Azidoethanol synthetisiert.

<i>Aussehen:</i>	farblose hochviskose Flüssigkeit	<i>Ausbeute:</i>	81 %
<i>Summenformel:</i>	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ O ₁₀	<i>R_f:</i>	0,36 (LM 13)
<i>Molare Masse:</i>	417,37 g mol ⁻¹	<i>ESI-MS:</i>	439,9 [M+Na] ⁺
¹ H-NMR:	siehe Anhang		

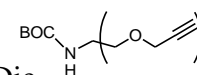
6.4.4.3 Synthese der Linkerbausteine

tert.-Butyl-tris(hydroxymethyl)methylcarbammat (20)



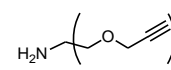
Die Verbindung wurde nach einer Vorschrift von SEGURA et al. dargestellt. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.¹⁹⁸

tert.-Butyl-tris(propargyloxymethyl)methylcarbammat (21a)



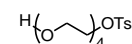
Die Verbindung wurde nach einer Vorschrift von SEGURA et al. dargestellt. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.¹⁹⁸

Tris(propargyloxymethyl)methylamin (22)



Die Verbindung **22** wurde nach Methode C (Kap. 6.4.2.1) aus **21a** dargestellt. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.²⁰³

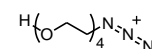
p-Toluensulfonsäure(11-hydroxy-3,6,9-trioxa-1-undecyl)ester (23a)



12,5 mmol (2,5 g) Tetraethylenglycol und 9 mmol (1,72 g) Tosylchlorid wurden in 10 ml CHCl₃ gelöst und mittels Eiskühlung auf 0 °C abgekühlt. 9 mmol (1,1 g) DMAP wurden in 15 ml CHCl₃ gelöst und langsam unter Rühren dem Ansatz zugetropft. Anschließend wurde der Ansatz für 2 h auf 0 °C gekühlt und weitere 24 h bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde der Ansatz mit 10 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Tosylat wurde säulenchromatographisch (SC Methode 1) mit Ethylacetat als Elutionsmittel gereinigt.

<i>Aussehen:</i>	farblose Flüssigkeit	<i>Ausbeute:</i>	46 %
<i>Summenformel:</i>	C ₁₅ H ₂₄ O ₇ S	<i>R_f:</i>	0,19 (LM 12)
<i>Molare Masse:</i>	348,41 g mol ⁻¹	<i>ESI-MS:</i>	371,1 [M+Na] ⁺
¹ H-NMR:	siehe Anhang		

11-Azido-3,6,9-trioxa-1-undecanol (24)

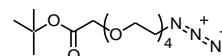


18 mmol (6,13 g) Tosylat (**23a**) und 54 mmol (3,51 g) NaN₃ wurden in 30 ml DMF gelöst und unter Rühren für 24 h auf 80 °C erwärmt. Zur Aufarbeitung wurde der Ansatz zwischen 50 ml Wasser und 200 ml CHCl₃ verteilt. Die abgetrennte organische Phase wurde über Na₂SO₄

getrocknet und eingengt. Das Azid wurde säulenchromatographisch (SC Methode 1) mit Ethylacetat als Elutionsmittel gereinigt. *Ausbeute:* 96 %

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.²⁰³

14-Azido-3,6,9,12-tetroxatetradecansäure-*tert.*-butylester (25a)

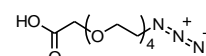


10 ml 1 M NaOH wurden auf 80 °C erwärmt, mit 10 mmol (1,7 g) AgNO₃ versetzt und 10 min gerührt. Anschließend wurde der braune Niederschlag abgesaugt und zunächst mit 80 °C heißen Wasser und anschließend mit Ethanol gewaschen. Das erhaltene Ag₂O (brauner Feststoff) wurde 24 h unter Lichtausschluss im Exsikkator getrocknet.

5 mmol (1 g) Verbindung **24**, 1 mmol (0,17 g) KI, 7,5 mmol (1,74 g) Ag₂O und 8 mmol (1,56 g) α -Bromessigsäure-*tert.*-butylester wurden in 10 ml CHCl₃ suspendiert und für 5 d unter Lichtausschluss bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde der Ansatz filtriert und das Filtrat anschließend eingengt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (SC Methode 1) mit Ethylacetat als Elutionsmittel gereinigt.

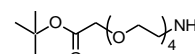
<i>Aussehen:</i>	farblose Flüssigkeit	<i>Ausbeute:</i>	83 %
<i>Summenformel:</i>	C ₁₄ H ₂₇ N ₃ O ₆	<i>R_f:</i>	0,5 (LM 12)
<i>Molare Masse:</i>	333,38 g mol ⁻¹	<i>ESI-MS:</i>	356,0 [M+Na] ⁺
¹ H-NMR:	siehe Anhang		

14-Azido-3,6,9,12-tetroxatetradecansäure (25b)



Die Verbindung wurde nach einer Vorschrift von SEGURA et al. aus **25a** dargestellt. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.¹⁹⁸

14-Amino-3,6,9,12-tetroxatetradecansäure-*tert.*-butylester (26)



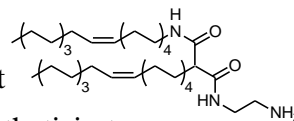
5 mmol (1,67 g) Azid **25a** wurden in 50 ml THF gelöst und mit 0,5 ml TEA und 100 mg Pd/C (10% m/m) versetzt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 20 bar Wasserstoffatmosphäre in einer Hydrierapparatur (5500 Compact Mini Bench Top Reactor, Parr Instrument Company, Miline IL, USA) gerührt. Anschließend wurde filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (SC Methode 1) mit Ethylacetat als Elutionsmittel gereinigt.

<i>Aussehen:</i>	farblose Flüssigkeit	<i>Ausbeute:</i>	65 %
<i>Summenformel:</i>	C ₁₄ H ₂₉ NO ₆	¹ <i>R_f:</i>	0,39 (LM 14)
<i>Molare Masse:</i>	307,38 g mol ⁻¹	<i>ESI-MS:</i>	308,1 [M+H] ⁺
¹ H-NMR:	siehe Anhang		

6.4.4.4 Synthese der Lipidvorstufen für die Glycolipidsynthese

N-(2-Aminoethyl)-2-[(9*Z*)-octadec-9-enyl]-*N'*-[(9*Z*)-octadec-9-enyl]propandiamid (**27**)

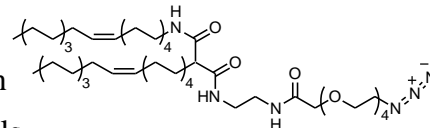
Die Verbindung **27** wurde analog der Vorschrift für die Darstellung der Verbindung **16a** nach der im Kap. 6.4.3 beschriebenen Vorschrift aus Oleylamin (tech.) und dem Oleylmalonsäuremonoethylester **2a** synthetisiert.



Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.⁸⁸

N-2-[(14-Azido-1-oxo-3,6,9,12-tetroxatetradecyl)amino]ethyl-2-[(9*Z*)-octadec-9-enyl]-*N'*-[(9*Z*)-octadec-9-enyl]propandiamid (**28**)

Die Verbindung wurde durch Amidkupplung zwischen Verbindung **27** als Aminkomponente und Verbindung **25b** als Säurekomponente nach Methode A (Kap. 6.4.2.1) synthetisiert, mit der Abwandlung dass die Säurekomponente, die Aminkomponente, PyBOP[®] und TEA in äquimolaren Mengen eingesetzt wurden.



Aussehen: weißer wachsartiger Feststoff

Ausbeute: 89 %

Fp: 28-33 °C

Summenformel: C₅₁H₉₆N₆O₇

R_f: 0,5 (LM 6)

Molare Masse: 905,34 g mol⁻¹

ESI-MS: 927,7 [M+Na]⁺

EA: ber.: C 66,99 H 10,69 N 9,19

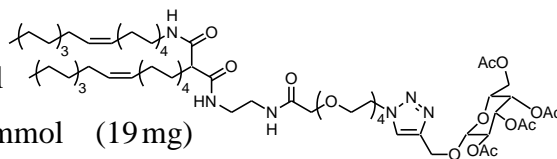
(28+0,5×H₂O)

gef.: C 66,86 H 10,14 N 9,12

¹H-NMR: siehe Anhang

N-[(9*Z*)-Octadec-9-enyl]-2-[(9*Z*)-octadec-9-enyl]-*N'*-[2-({1-oxo-14-[4-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-*D*-galactopyranosidoyl)methyl-1,2,3-triazol-1-yl]-3,6,9,12-tetroxatetradecyl}-amino)ethyl]propandiamid (**29**)

1 mmol (905 mg) Azid (**28**) wurden mit 1,7 mmol (675 mg) Alkinkomponente (**18**) und 0,15 mmol (19 mg)



Kupfer-(I)-acetat in 3 ml DMF suspendiert und für 1 h im Ultraschallbad (80 Hz) bei 50 °C behandelt. Anschließend wurde das Produkt chromatographisch gereinigt (SC Methode 1), wobei ein CHCl₃/Acetonitril/TEA-Gemisch steigender Polarität als Elutionsmittel zum Einsatz kam.

Aussehen: farbloser wachsartiger Feststoff

Ausbeute: 54 %

Fp: 64-76 °C

Summenformel: C₆₈H₁₁₈N₆O₁₇

R_f: 0,33 (LM 6)

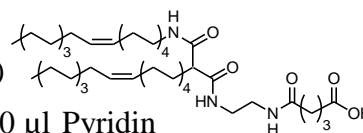
Molare Masse: 1291,69 g mol⁻¹

ESI-MS: 1292,7 [M+H]⁺

¹H-NMR: siehe Anhang

***N*-(2-[[[(11*Z*)-2-[[[(9*Z*)-Octadec-9-enylamino]carbonyl]icos-11-enoyl]amino]ethyl]glutar-säuremonoamid (30)**

1 mmol (646 mg) der Verbindung **27** und 10 mmol (1,14 g) Glutarsäureanhydrid wurden in 10 ml CHCl₃ gelöst und mit 800 µl Pyridin versetzt. Der Ansatz wurde 5 d bei RT gerührt. Für die Aufarbeitung wurde das Lösungsmittel abgezogen, der Ansatz wurde in 20 ml Wasser suspendiert und mit einer Lösung aus 20 mmol (1,96 g) H₂SO₄ in 10 ml Wasser unter Eiskühlung versetzt. Anschließend wurde mit 60 ml CHCl₃ extrahiert und die abgetrennte organische Phase mit jeweils 10 ml Salzlösung in der folgenden Reihenfolge gewaschen: K₂CO₃-Lösung (20 % m/m), NH₄Cl-Lösung (ges.) und NaCl-Lösung (ges.). Abschließend wurde die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (SC Methode 2) mittels CHCl₃/MeOH-Gradient gereinigt



Aussehen: weißer wachsartiger Feststoff

Ausbeute: 94 %

Fp: 133-140 °C

Summenformel: C₄₆H₈₅N₃O₅

R_f: 0,56 (LM 8)

Molare Masse: 760,18 g mol⁻¹

ESI-MS: 760,7 [M+H]⁺

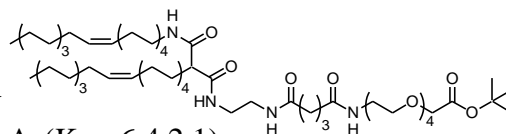
EA: ber.: C 72,86 H 11,27 N 5,53

gef.: C 72,37 H 11,27 N 5,56

¹H-NMR: siehe Anhang

***N*-(5-[(2-[[[(11*Z*)-2-[[[(9*Z*)-Octadec-9-enylamino]carbonyl]icos-11-enoyl]amino]ethyl)-amino]-5-oxopentanoyl]amino)-3,6,9,12-tetraoxatetradecansäure-*tert.*-butylester (31)**

Die Verbindung wurde durch Amidkupplung aus Verbindung **26** als Aminkomponente und Verbindung **30** als Säurekomponente nach Methode A (Kap. 6.4.2.1) synthetisiert, mit der Abwandlung, dass die Säurekomponente, die Aminkomponente, PyBOP[®] und TEA in äquimolaren Mengen eingesetzt wurden.



Aussehen: weißer wachsartiger Feststoff

Ausbeute: 89,1 %

Fp: 118-128 °C

Summenformel: C₆₀H₁₁₂N₄O₁₀

R_f: 0,58 (LM 7)

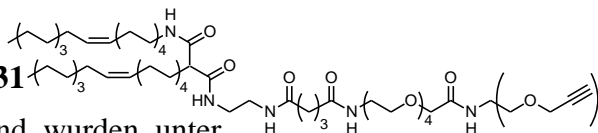
Molare Masse: 1049,55 g mol⁻¹

ESI-MS: 1071,9 [M+Na]⁺

¹H-NMR: siehe Anhang

***N*-(14-Oxo-14-[tris(propargyloxymethyl)methylamino])-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl)-*N'*-(2-[[[(11*Z*)-2-[[[(9*Z*)-octadec-9-enylamino]carbonyl]icos-11-enoyl]amino]ethyl)pentan-diamid (32)**

0,5 mmol (524 mg) des *tert.*-Butylesters **31** wurden in 10 ml CH₂Cl₂ gelöst. Anschließend wurden unter

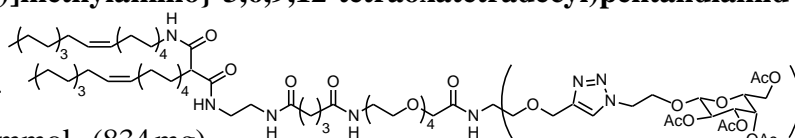


Rühren 4 ml TFA der Reaktion schrittweise zugeführt und 5 h bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde das Lösungsmittel und überschüssige TFA am Rotationsverdampfer abgezogen. Anschließend wurde die erhaltene freie Säure in einer Amidkupplung mit Verbindung **22** als Aminkomponente nach Methode A (Kap. 6.4.2.1) weiter umgesetzt, mit der Abwandlung, dass die Säurekomponente, die Aminkomponente, PyBOP® und TEA in äquimolaren Mengen eingesetzt wurden.

<i>Aussehen:</i>	weißer wachsartiger Feststoff		
<i>Ausbeute:</i>	64 %	<i>Fp:</i>	115-120 °C
<i>Summenformel:</i>	C ₆₉ H ₁₁₉ N ₅ O ₁₂	<i>R_f:</i>	0,72 (LM 7)
<i>Molare Masse:</i>	1210,71 g mol ⁻¹	<i>ESI-MS:</i>	1208,9 [M-H] ⁻
<i>¹H-NMR:</i>	siehe Anhang		

N-(2-[[[(11Z)-2-[[[(9Z)-Octadec-9-enylamino]carbonyl]icos-11-enoyl]amino]ethyl)-N'-((14-oxo-14-[tris-({1-[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosidoyl)ethyl]-1,2,3-triazol-4-yl)methoxymethyl)]methylamino]-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl)pentandiamid (33)

0,5 mmol (605 mg) Alkinkomponente (**32**) wurden mit 2 mmol (834 mg)



acetatgeschütztem Azidoethylgalactopyranosid (**19**) und 0,3 mmol (38 mg) Kupfer-(I)-acetat in 3 ml DMF suspendiert, für 2 h im Ultraschallbad (80 Hz) bei 50 °C behandelt und weitere 24 h bei RT stehen gelassen. Anschließend wurde das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (SC Methode 1, Elutionsmittel: Chloroform/Acetonitril)

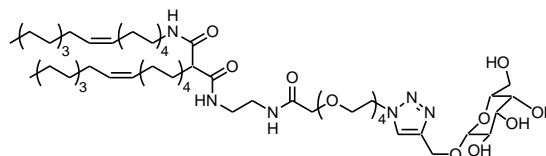
<i>Aussehen:</i>	farbloser wachsartiger Feststoff		
<i>Ausbeute:</i>	18 %	<i>Fp:</i>	69-72 °C
<i>Summenformel:</i>	C ₁₁₇ H ₁₈₈ N ₁₄ O ₄₂	<i>R_f:</i>	0,19 (LM 6)
<i>Molare Masse:</i>	2462,81 g mol ⁻¹	<i>ESI-MS:</i>	2463,2 [M+H] ⁺
<i>¹H-NMR:</i>	siehe Anhang		

6.4.4.5 Synthese der Glycolipide XVI und XVII – Spaltung der Acetatschutzgruppe

1 mmol der Acetat-geschützten Verbindungen **29,33** wurde in 5 ml trockenem MeOH gelöst und mit katalytischen Mengen Kaliummethanolat versetzt und für 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde der Ansatz am Rotationsverdampfer eingengt. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch nach Methode 1 mit einem CHCl₃/MeOH-Gradient steigender Polarität. Das Elutionsmittel wurde mit 0,1 % (V/V) TEA versetzt um eine Spaltung der Acetalstruktur zu unterbinden.

***N*-[2-({14-[4-(β-D-Galactopyranosidoyl)methyl-1,2,3-triazol-1-yl]-1-oxo-3,6,9,12-tetroxa-tetradecyl}amino)ethyl]-2-[(9Z)-octadec-9-enyl]-*N'*-[(9Z)-octadec-9-enyl]propandiamid (Lipid XVI)**

Das Lipid wurde durch Umsetzung von Verbindung **29** erhalten.



Aussehen: weißer wachsartiger Feststoff

Ausbeute: 98 %

Summenformel: C₆₀H₁₁₀N₆O₁₃

R_f: 0,52 (LM 8)

Molare Masse: 1123,55 g mol⁻¹

ESI-MS: 1146,9 [M+Na]⁺

HRMS: ber.: 1123,8204 Da
gef.: 1123,8228 Da

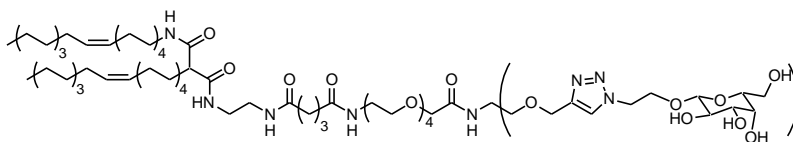
(C₆₀H₁₁₁N₆O₁₃ [M+H]⁺)

¹H-NMR: siehe Anhang

¹³C-NMR: siehe Anhang

***N*-[2-[(11Z)-2-[(9Z)-octadec-9-enylamino]carbonyl]icos-11-enoyl]amino}ethyl]-*N'*-({14-Oxo-14-[tris-({1-[2-(β-D-galactopyranosidoyl)ethyl]-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy-methyl]}methylamino)-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl}pentandiamid (Lipid XVII)**

Das Lipid wurde durch Umsetzung von Verbindung **33** erhalten.



Aussehen: durchsichtiger kristalliner Feststoff

Ausbeute: 95 %

Summenformel: C₉₃H₁₆₄N₁₄O₃₀

R_f: 0,16 (LM 5)

Molare Masse: 1958,37 g mol⁻¹

ESI-MS: 1979,9 [M +Na]⁺

HRMS: ber.: 1958,1811 Da
gef.: 1958,1810 Da

(C₉₃H₁₆₅N₁₄O₃₀ [M+H]⁺)

¹H-NMR: siehe Anhang

¹³C-NMR: siehe Anhang

Literatur

1. Watson, J. D.; Crick, F. H. C.; Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
2. International Human Genome Sequencing Consortium; Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **2001**, *409*, 860-921.
3. O'Connor, T. P.; Crystal, R. G.; Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nature Reviews Genetics* **2006**, *7*, 261-276.
4. DFG; Entwicklung der Gentherapie, Stellungnahme der Senatskommission für Grundlagenfragen der Genforschung. **2006**, *Mitteilung 5*.
5. Blaese, R. M.; Culver, K. W.; Miller, A. D.; Carter, C. S.; Fleisher, T.; Clerici, M.; Shearer, G.; Chang, L.; Chiang, Y.; Tolstoshev, P.; Greenblatt, J. J.; Rosenberg, S. A.; Klein, H.; Berger, M.; Mullen, C. A.; Ramsey, W. J.; Muul, L.; Morgan, R. A.; Anderson, W. F.; T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* **1995**, *270*, 475-480.
6. Gaudet, D.; Méthot, J.; Kastelein, J.; Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. *Current Opinion in Lipology* **2012**, *23*, 310-320.
7. Crooke, S. T.; Progress in antisense technology. *Annual Review of Medicine* **2004**, *55*, 61-95.
8. Dykxhoorn, D. M.; Lieberman, J.; The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic. *Annual Review of Medicine* **2005**, *56*, 401-423.
9. Ramachandran, P.; Ignacimuthu, S.; RNA interference - A silent but an efficient therapeutic tool. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2013**, *169*, 1774-1789.
10. <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>. (**25.11.2013**), *Reiter: Charts and Tables*
11. Mehier-Humbert, S.; Guy, R. H.; Physical methods for gene transfer: Improving the kinetics of gene delivery into cells. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, *57*, 733-753.
12. Winckler, T.; Virale Gentransfer-Arzneimittel. Therapie mit "entschärften" Humanpathogenen. *Pharmazie in unserer Zeit* **2011**, *40*, 202-211.
13. Kay, M. A.; Glorioso, J. C.; Naldini, L.; Viral vectors for gene therapy: The art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Medicine* **2001**, *7*, 33-40.
14. Evans, C. H.; Gouze, E.; Gouze, J. N.; Robbins, P. D.; Ghivizzani, S. C.; Gene therapeutic approaches - transfer in vivo. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, *58*, 243-258.
15. Sadelain, M.; Insertional oncogenesis in gene therapy: How much of a risk? *Gene Therapy* **2004**, *11*, 569-573.
16. Ferber, D.; Safer and virus-free? *Science* **2001**, *294*, 1638-1642.
17. Marshall, E.; What to do when clear success comes with an unclear risk? *Science* **2002**, *298*, 510-511.
18. Müller-Esterl, W., *Biochemie*. Elsevier: **2004**.
19. Park, T. G.; Jeong, J. H.; Kim, S. W.; Current status of polymeric gene delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, *58*, 467-486.
20. Lungwitz, U.; Breunig, M.; Blunk, T.; Göpferich, A.; Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2005**, *60*, 247-266.
21. Morille, M.; Passirani, C.; Vonarbourg, A.; Clavreul, A.; Benoit, J.-P.; Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials* **2008**, *29*, 3477-3496.
22. Neu, M.; Fischer, D.; Kissel, T.; Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives. *The Journal of Gene Medicine* **2005**, *7*, 992-1009.
23. Mintzer, M. A.; Simanek, E. E.; Nonviral vectors for gene delivery. *Chemical Reviews* **2008**, *109*, 259-302.
24. Büning, H.; Gentherapie – Was ist das? "Heilen" mit Genen. *Pharmazie in unserer Zeit* **2011**, *40*, 194-201.
25. Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M.; Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1987**, *84*, 7413-7417.
26. Felgner, J. H.; Kumar, R.; Sridhar, C. N.; Wheeler, C. J.; Tsai, Y. J.; Border, R.; Ramsey, P.; Martin, M.; Felgner, P. L.; Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 2550-2561.
27. Ma, B.; Zhang, S.; Jiang, H.; Zhao, B.; Lv, H.; Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery. *Journal of Controlled Release* **2007**, *123*, 184-194.
28. Lv, H.; Zhang, S.; Wang, B.; Cui, S.; Yan, J.; Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *Journal of Controlled Release* **2006**, *114*, 100-109.
29. Miller, A. D.; Kationische Liposomen für die Gentherapie. *Angewandte Chemie* **1998**, *110*, 1862-1880.
30. Bhattacharya, S.; Bajaj, A.; Advances in gene delivery through molecular design of cationic lipids. *Chemical Communications* **2009**, 4632-4656.

Literatur

31. Eibl, H.; Phospholipide als funktionelle Bausteine biologischer Membranen. *Angewandte Chemie* **1984**, *96*, 247-262.
32. Bangham, A. D.; Horne, R. W.; Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology* **1964**, *8*, 660-668.
33. Sessa, G.; Weissmann, G.; Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *Journal of Lipid Research* **1968**, *9*, 310-318.
34. Balazs, D. A.; Godbey, W.; Liposomes for use in gene delivery. *Journal of Drug Delivery* **2011**, 1-12.
35. Cevc, G., *Phospholipid Handbook*. Marcel Decker INC.: **1993**.
36. Hope, M. J.; Bally, M. B.; Mayer, L. D.; Janoff, A. S.; Cullis, P. R.; Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. *Chemistry and Physics of Lipids* **1986**, *40*, 89-107.
37. Dabkowska, A. P.; Barlow, D. J.; Campbell, R. A.; Hughes, A. V.; Quinn, P. J.; Lawrence, M. J.; Effect of helper lipids on the interaction of DNA with cationic lipid monolayers studied by specular neutron reflection. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 2391-2401.
38. Zidovska, A.; Evans, H. M.; Ahmad, A.; Ewert, K. K.; Safinya, C. R.; The role of cholesterol and structurally related molecules in enhancing transfection of cationic liposome-DNA complexes. *The Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 5208-5216.
39. Torchilin, V.; Weissig, V., *Liposomes*. Oxford University Press: **2003**, 154-155.
40. Chytil, A.; Ciccarone, V. C.; Gebeyehu, G.; Hawley-Nelson, P.; Jessee, J. A.; Cationic lipids. US5334761 A, **1994**.
41. Israelachvili, J. N., *Intermolecular and Surface Forces*. Elsevier: **2011**, Kap.19-21.
42. Dörfler, H. D., *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*. Springer-Verlag: **2002**, Kap.10.
43. Pitard, B.; Aguerre, O.; Airiau, M.; Lachagès, A.-M.; Boukhnikachvili, T.; Byk, G.; Dubertret, C.; Herviou, C.; Scherman, D.; Mayaux, J.-F.; Crouzet, J.; Virus-sized self-assembling lamellar complexes between plasmid DNA and cationic micelles promote gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, *94*, 14412-14417.
44. Johnsson, M.; Wagenaar, A.; Engberts, J. B. F. N.; Sugar-based gemini surfactant with a vesicle-to-micelle transition at acidic pH and a reversible vesicle flocculation near neutral pH. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 757-760.
45. Aoyama, Y.; Kanamori, T.; Nakai, T.; Sasaki, T.; Horiuchi, S.; Sando, S.; Niidome, T.; Artificial viruses and their application to gene delivery. size-controlled gene coating with glycocluster nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 3455-3457.
46. Candiani, G.; Pezzoli, D.; Cabras, M.; Ristori, S.; Pellegrini, C.; Kajaste-Rudnitski, A.; Vicenzi, E.; Sala, C.; Zanda, M. A; dimerizable cationic lipid with potential for gene delivery. *The Journal of Gene Medicine* **2008**, *10*, 637-645.
47. Maitani, Y.; Hattori, Y.; Oligoarginine-PEG-lipid particles for gene delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2009**, *6*, 1065-1077.
48. Williams, R. J.; Phillips, J. N.; Mysels, K. J.; The critical micelle concentration of sodium lauryl sulphate at 25°C. *Transactions of the Faraday Society* **1955**, *51*, 728-737.
49. Carey, M. C.; Small, D. M.; The characteristics of mixed micellar solutions with particular reference to bile. *The American journal of medicine* **1970**, *49*, 590-608.
50. Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W.; Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* **1976**, *72*, 1525-1568.
51. Israelachvili, J. N.; Marčelja, S.; Horn, R. G.; Physical principles of membrane organization. *Quarterly Reviews of Biophysics* **1980**, *13*, 121-200.
52. Winter, R.; Noll, F.; Czeslik, C., *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. Vieweg+Teubner Verlag: **2011**, Vol. 2, Kap.4.
53. Winter, R.; Synchrotron X-ray and neutron small-angle scattering of lyotropic lipid mesophases, model biomembranes and proteins in solution at high pressure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **2002**, *1595*, 160-184.
54. Marsh, D., *Handbook of Lipid Bilayers*. CRC Press: **2013**.
55. Felgner, P. L.; Ringold, G. M.; Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* **1989**, *337*, 387-388.
56. Sternberg, B.; Sorgi, F. L.; Huang, L.; New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze - fracture electron microscopy. *FEBS Letters* **1994**, *356*, 361-366.
57. May, S.; Ben-Shaul, A.; DNA-lipid complexes: stability of honeycomb-like and spaghetti-like structures. *Biophysical Journal* **1997**, *73*, 2427-2440.
58. Rädler, J. O.; Koltover, I.; Salditt, T.; Safinya, C. R.; Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science* **1997**, *275*, 810-814.

59. Zidovska, A.; Evans, H. M.; Ewert, K. K.; Quispe, J.; Carragher, B.; Potter, C. S.; Safinya, C. R.; Liquid crystalline phases of dendritic lipid–DNA self-assemblies: lamellar, hexagonal, and DNA bundles. *The Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *113*, 3694-3703.
60. May, S.; Ben-Shaul, A.; Modeling of cationic lipid-DNA complexes. *Current Medicinal Chemistry* **2004**, *11*, 151-167.
61. Zantl, R.; Artzner, F.; Rapp, G.; Rädler, J. O.; Thermotropic structural changes of saturated-cationic-lipid–DNA complexes. *EPL (Europhysics Letters)* **1999**, *45*, 90.
62. Koltover, I.; Salditt, T.; Safinya, C. R.; Phase diagram, stability, and overcharging of lamellar cationic lipid DNA self-assembled complexes. *Biophysical Journal* **1999**, *77*, 915-924.
63. Koltover, I.; Salditt, T.; Rädler, J. O.; Safinya, C. R.; An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science* **1998**, *281*, 78-81.
64. Ewert, K. K.; Evans, H. M.; Zidovska, A.; Bouxsein, N. F.; Ahmad, A.; Safinya, C. R.; A columnar phase of dendritic lipid–based cationic liposome–DNA complexes for gene delivery: hexagonally ordered cylindrical micelles embedded in a DNA honeycomb lattice. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 3998-4006.
65. Leal, C. I.; Ewert, K. K.; Shirazi, R. S.; Bouxsein, N. F.; Safinya, C. R.; Nanogyroids incorporating multivalent lipids: enhanced membrane charge density and pore forming ability for gene silencing. *Langmuir* **2011**, *27*, 7691-7697.
66. Zuhorn, I.; Engberts, J. F. N.; Hoekstra, D.; Gene delivery by cationic lipid vectors: overcoming cellular barriers. *European Biophysics Journal* **2007**, *36*, 349-362.
67. Sahay, G.; Alakhova, D. Y.; Kabanov, A. V.; Endocytosis of nanomedicines. *Journal of Controlled Release* **2010**, *145*, 182-195.
68. Khalil, I. A.; Kogure, K.; Akita, H.; Harashima, H.; Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacological Reviews* **2006**, *58*, 32-45.
69. Rehman, Z. u.; Sjollem, K. A.; Kuipers, J.; Hoekstra, D.; Zuhorn, I. S.; Nonviral gene delivery vectors use syndecan-dependent transport mechanisms in filopodia to reach the cell surface. *ACS Nano* **2012**, *6*, 7521-7532.
70. Pollard, T. D.; Earnshaw, W. C.; Lippincott-Schwartz, J., *Cell Biology*. Elsevier: **2007**.
71. Xu, Y.; Szoka, F. C.; mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry* **1996**, *35*, 5616-5623.
72. Zelphati, O.; Szoka, F. C.; Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, *93*, 11493-11498.
73. Koynova, R., Analysis of Lipoplex Structure and Lipid Phase Changes. In *Liposomes*, Weissig, V., Ed. Humana Press: **2010**; Vol. 606, 399-423.
74. Ewert, K.; Zidovska, A.; Ahmad, A.; Bouxsein, N.; Evans, H.; McAllister, C.; Samuel, C.; Safinya, C., Cationic Liposome–Nucleic Acid Complexes for Gene Delivery and Silencing: Pathways and Mechanisms for Plasmid DNA and siRNA. In *Nucleic Acid Transfection*, Bielke, W.; Erbacher, C., Eds. Springer Berlin Heidelberg: **2010**; Vol. 296, 191-226.
75. Safinya, C. R.; Ewert, K. K.; Leal, C.; Cationic liposome–nucleic acid complexes: liquid crystal phases with applications in gene therapy. *Liquid Crystals* **2011**, *38*, 1715-1723.
76. Matulis, D.; Rouzina, I.; Bloomfield, V. A.; Thermodynamics of cationic lipid binding to DNA and DNA condensation: Roles of electrostatics and hydrophobicity. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 7331-7342.
77. Pozharski, E.; MacDonald, R. C.; Thermodynamics of cationic lipid-DNA complex formation as studied by isothermal titration calorimetry. *Biophysical Journal* **2002**, *83*, 556-565.
78. Manning, G. S.; Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions: IV. The approach to the limit and the extraordinary stability of the charge fraction. *Biophysical Chemistry* **1977**, *7*, 95-102.
79. Manning, G. S.; Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions: V. Further development of the chemical model. *Biophysical Chemistry* **1978**, *9*, 65-70.
80. Schulze, I.; Synthese von Lipiden für die liposomale Gentransfektion. *Dissertation*, MLU-Halle/Wittenberg, Halle (Saale), **2006**.
81. Wölk, C.; Synthese und Charakterisierung von Lysin-haltigen Malonamiden als kationische Lipide für die Gentransfektion. *Diplom*, MLU-Halle/Wittenberg, Halle (Saale), **2010**.
82. Chargaff, E.; Über höhere Fettsäuren mit verzweigter Kohlenstoffkette. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1932**, *65*, 745-754.
83. Weitzel, G.; Wojahn, J.; Biochemie verzweigter Carbonsäuren. V. Mitteilung. Darstellung sämtlicher d,l-Monomethyl-palmitinsäuren. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* **1951**, *287*, 65-89.
84. Weitzel, G.; Wojahn, J.; Biochemie verzweigter Carbonsäuren VII. Mitteilung. Darstellung der racemischen Monomethyl-stearinsäuren. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* **1951**, *287*, 296-310.
85. Fischer, E.; Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1906**, *39*, 530-610.

86. Snyder, H. R.; Smith, C. W.; A Convenient Synthesis of dl-Tryptophan. *Journal of the American Chemical Society* **1944**, *66*, 350-351.
87. Koynova, R.; Tenchov, B., Cationic lipids: molecular structure/transfection activity relationships and interactions with biomembranes. In *Nucleic Acid Transfection*, Bielke, W.; Erbacher, C., Eds. Springer Berlin Heidelberg: **2010**; Vol. 296, 51-93.
88. Heinze, M.; Brezesinski, G.; Dobner, B.; Langner, A.; Novel cationic lipids based on malonic acid amides backbone: transfection efficacy and cell toxicity properties. *Bioconjugate Chemistry* **2010**, *21*, 696-708.
89. Autorkollektiv, *Organikum*. Wiley-VCH Verlag GmbH: **2009**, Vol. 23.
90. Fischer, E.; Axhausen, W.; Brunner, A.; Warburg, O.; Koelker, W. F.; Raske, K.; Schmidlin, J.; Synthese von Polypeptiden. XI. *Justus Liebig's Annalen der Chemie* **1905**, *340*, 123-204.
91. Sheehan, J. C.; Hess, G. P.; A new method of forming peptide bonds. *Journal of the American Chemical Society* **1955**, *77*, 1067-1068.
92. Jakubke, H. D.; Kleßen, C.; Berger, E.; Neubert, K.; Lewis acids, especially zinc chloride: A new type of carbodiimide additive in peptide synthesis. *Tetrahedron Letters* **1978**, *19*, 1497-1500.
93. Halpern, B.; Chew, L. F.; Weinstein, B.; Measurement of racemization in peptide synthesis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **1967**, *89*, 5051-5052.
94. König, W.; Geiger, R.; Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolinen. *Chemische Berichte* **1970**, *103*, 788-798.
95. Wünsch, E.; Drees, F.; Zur Synthese des Glucagons, X. Darstellung der Sequenz 22-29. *Chemische Berichte* **1966**, *99*, 110-120.
96. Gross, H.; Bilk, L.; Zur Reaktion von N-Hydroxysuccinimid mit Dicyclohexylcarbodiimid. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 6935-6939.
97. Anderson, G. W.; Paul, R.; N,N'-Carbonyldiimidazole, a new reagent for peptide synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **1958**, *80*, 4423-4423.
98. Dourtoglou, V.; Ziegler, J.-C.; Gross, B.; L'hexafluorophosphate de O-benzotriazolyl-N,N-tetramethyluronium: Un reactif de couplage peptidique nouveau et efficace. *Tetrahedron Letters* **1978**, *19*, 1269-1272.
99. Dourtoglou, V.; Gross, B.; Lambropoulou, V.; Zioudrou, C.; O-Benzotriazolyl-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate as coupling reagent for the synthesis of peptides of biological interest. *Synthesis* **1984**, *1984*, 572-574.
100. Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillessen, D.; New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Letters* **1989**, *30*, 1927-1930.
101. Høeg-Jensen, T.; Jakobsen, M. H.; Holm, A.; A new method for rapid solution synthesis of shorter peptides by use of PyBOP[®]. *Tetrahedron Letters* **1991**, *32*, 6387-6390.
102. Goodman, M.; Felix, A. M.; Moroder, L.; Toniolo, C., *Methods of Organic Chemistry (Houben-Weyl) - Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*. Thieme: **2002**, Vol. E22a-d.
103. Fields, G. B., *Methods in Enzymology - Solid Phase Peptide Synthesis*. Academic Press: **1997**, Vol. 289.
104. Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B.; PyBOP[®]: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Letters* **1990**, *31*, 205-208.
105. National Toxicology Program (USA); Eleventh Edition. *Report on Carcinogens*.
106. Kim, M. H.; Patel, D. V.; "BOP" as a reagent for mild and efficient preparation of esters. *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 5603-5606.
107. Anderson, G. W.; Zimmerman, J. E.; Callahan, F. M.; The use of esters of N-hydroxysuccinimide in peptide synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **1964**, *86*, 1839-1842.
108. McDermott, J. R.; Benoiton, N. L.; N-Methylamino acids in peptide synthesis. IV. racemization and yields in peptide-bond formation. *Canadian Journal of Chemistry* **1973**, *51*, 2562-2570.
109. Green, T. W.; Wuts, P. G. M., *Protective Groups in Organic Synthesis*. John. Wiley & sons: **1991**.
110. Carpino, L. A.; The 9-fluorenylmethoxycarbonyl family of base-sensitive amino-protecting groups. *Accounts of Chemical Research* **1987**, *20*, 401-407.
111. Carpino, L. A.; Sadat-Aalae, D.; Beyermann, M.; Tris(2-aminoethyl)amine as substitute for 4-(aminomethyl)piperidine in the Fmoc/polyamine approach to rapid peptide synthesis. *The Journal of Organic Chemistry* **1990**, *55*, 1673-1675.
112. Stahl, G. L.; Walter, R.; Smith, C. W.; General procedure for the synthesis of mono-N-acylated 1,6-diaminohexanes. *The Journal of Organic Chemistry* **1978**, *43*, 2285-2286.
113. Lundt, B. F.; Johansen, N. L.; Vølund, A.; Markussen, J.; Removal of t-butyl and t-butoxycarbonyl protecting groups with trifluoroacetic acid. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1978**, *12*, 258-268.
114. Rawal, V. H.; Jones, R. J.; Cava, M. P.; Photocyclization strategy for the synthesis of antitumor agent CC-1065: synthesis of dideoxy PDE-I and PDE-II. Synthesis of thiophene and furan analogs of dideoxy PDE-I and PDE-II. *The Journal of Organic Chemistry* **1987**, *52*, 19-28.

115. Wasserman, H. H.; Berger, G. D.; Cho, K. R.; Transamidation reactions using β -lactams. The synthesis of homaline. *Tetrahedron Letters* **1982**, *23*, 465-468.
116. Ben-Ishai, D.; Berger, A.; Cleavage of N-carbobenzoxy groups by dry hydrogen bromide and hydrogen chloride. *The Journal of Organic Chemistry* **1952**, *17*, 1564-1570.
117. Mitchell, A. R.; Merrifield, R. B.; Occurrence of N-alkylation during the acidolytic cleavage of urethane protecting groups. *The Journal of Organic Chemistry* **1976**, *41*, 2015-2019.
118. Matsuura, S.; Niu, C.-H.; Cohen, J. S.; Pyridinium polyhydrogen fluoride, a deprotecting reagent in peptide chemistry. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1976**, 451-452.
119. Yajima, H.; Fujii, N.; Ogawa, H.; Kawatani, H.; Trifluoromethanesulphonic acid as a deprotecting reagent in peptide chemistry. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1974**, 107-108.
120. Yajima, H.; Ogawa, H.; Sakurai, H.; Synthesis of the nonacosapeptide corresponding to the entire amino acid sequence of duck glucagon. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1977**, 909-910.
121. Overman, L. E.; Sharp, M. J.; Enantioselective total synthesis of the pumiliotoxin A alkaloids via reductive iminium ion-alkyne cyclizations. Total synthesis of (+)-pumiliotoxin a. *Tetrahedron Letters* **1988**, *29*, 901-904.
122. Angle, S. R.; Arnaiz, D. O.; Stereoselective synthesis of substituted pipercolic acids. *Tetrahedron Letters* **1989**, *30*, 515-518.
123. Bergmann, M.; Zervas, L.; Über ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1932**, *65*, 1192-1201.
124. Meienhofer, J.; Kuromizu, K.; Catalytic hydrogenolysis in liquid ammonia: stability and cleavage of some protecting groups used in peptide synthesis. *Tetrahedron Letters* **1974**, *15*, 3259-3262.
125. Felix, A. M.; Heimer, E. P.; Lambros, T. J.; Tzougraki, C.; Meienhofer, J.; Rapid removal of protecting groups from peptides by catalytic transfer hydrogenation with 1,4-cyclohexadiene. *The Journal of Organic Chemistry* **1978**, *43*, 4194-4196.
126. ElAmin, B.; Anantharamaiah, G. M.; Royer, G. P.; Means, G. E.; Removal of benzyl-type protecting groups from peptides by catalytic transfer hydrogenation with formic acid. *The Journal of Organic Chemistry* **1979**, *44*, 3442-3444.
127. Makowski, M.; Rzeszutarska, B.; Smelka, L.; Kubica, Z.; Synthesis of peptides with α,β -dehydroamino acids, III. debenzoyloxycarbonylation and detrifluoroacetylation of dehydroalanine and dehydrophenylalanine peptides. *Liebigs Annalen der Chemie* **1985**, *1985*, 1457-1464.
128. Bergeron, R. J.; McManis, J. S.; Reagents for the stepwise functionalization of spermine. *The Journal of Organic Chemistry* **1988**, *53*, 3108-3111.
129. Newman, H.; Trifluoroacetyl as a Protecting Group for 1-Halo Sugars. *The Journal of Organic Chemistry* **1965**, *30*, 1287-1288.
130. Quick, J.; Meltz, C.; The pelletierine condensation. Mechanistic studies. *The Journal of Organic Chemistry* **1979**, *44*, 573-578.
131. Gibson, S.; Process for the preparation of saturated or unsaturated primary fatty amines. EP1746084 (A1), **2007**.
132. Fong, C.; Wells, D.; Krodkiewska, I.; Hartley, P. G.; Drummond, C. J.; New role for urea as a surfactant headgroup promoting self-assembly in water. *Chemistry of Materials* **2006**, *18*, 594-597.
133. Kim, S.; Lee, J. I.; Kim, Y. C.; A simple and mild esterification method for carboxylic acids using mixed carboxylic-carbonic anhydrides. *The Journal of Organic Chemistry* **1985**, *50*, 560-565.
134. Rodrigues de fonseca, F. A.; Macias Gonzalez, M.; Pavon Moron, J.; Goya-Laza, M. P.; Paez Prosper, J. A.; Cano Ramos, C.; Acyclic Sulfamide Derivatives. PCT/EP2007/000681, **2007**.
135. Dobner, B.; Synthese und Untersuchungen von Phospholipiden mit verzweigten Fettsäuren. *Dissertation B*, MLU-Halle/Wittenberg, Halle (Saale), **1990**.
136. Weitzel, G.; Wojahn, J.; Biochemie verzweigter Carbonsäuren. III. Mitteilung: Darstellung homologer d,l- α -n-Alkylstearinsäuren. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* **1950**, *285*, 220-229.
137. Tamura, M.; Kochi, J.; Coupling of grignard reagents with organic halides. *Synthesis* **1971**, *1971*, 303-305.
138. Corey, E. J.; Niwa, H.; Knolle, J.; Total synthesis of (S)-12-hydroxy-5,8,14-cis,-10-trans-eicosatetraenoic acid (Samuelsson's HETE). *Journal of the American Chemical Society* **1978**, *100*, 1942-1943.
139. Ashraf, R. S.; Gilot, J.; Janssen, R. A. J.; Fused ring thiophene-based poly(heteroarylene ethynylene)s for organic solar cells. *Solar Energy Materials and Solar Cells* **2010**, *94*, 1759-1766.
140. De, S.; Ramakrishnan, S.; Charge-transfer reinforced folding of novel ionenes. *Macromolecules* **2009**, *42*, 8599-8603.
141. Stempfle, F.; Quinzler, D.; Heckler, I.; Mecking, S.; Long-chain linear C19 and C23 monomers and polycondensates from unsaturated fatty acid esters. *Macromolecules* **2011**, *44*, 4159-4166.
142. Dobner, B.; Nuhn, P.; Büge, A.; Synthese der racemischen Corynomycolsäure. *Zeitschrift für Chemie* **1988**, *28*, 299-300.
143. Floyd, D. E.; Miller, S. E.; Synthesis of alkylmalonic esters by oxalate condensations. *Journal of the American Chemical Society* **1947**, *69*, 2354-2355.

144. Haldar, J.; Kondaiah, P.; Bhattacharya, S.; Synthesis and antibacterial properties of novel hydrolyzable cationic amphiphiles. Incorporation of multiple head groups leads to impressive antibacterial activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 3823-3831.
145. Milite, C.; Castellano, S.; Benedetti, R.; Tosco, A.; Ciliberti, C.; Vicidomini, C.; Bouilly, L.; Franci, G.; Altucci, L.; Mai, A.; Sbardella, G.; Modulation of the activity of histone acetyltransferases by long chain alkylidenemalonates (LoCAMs). *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19*, 3690-3701.
146. Anelli, P. L.; Montanari, F.; Quici, S.; Ciani, G.; Sironi, A.; Lipophilic cage ligands containing two tightly connected 1,7-dioxo-4,10-diazacyclododecane rings: synthesis and x-ray structure of a sodium perchlorate complex. *The Journal of Organic Chemistry* **1988**, *53*, 5292-5298.
147. Prasad, K.; Bharathi, K.; Haseena, B. B.; Applications of peptide coupling reagents - an update. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* **2011**, *8*, 108-119.
148. Buwalda, R. T.; Wagenaar, A.; Engberts, J. B. F. N.; Synthesis and aggregation behavior of cyclic single- and double-tailed phosphate amphiphiles: A novel class of phosphate surfactants – Comparison with the aggregation behavior of sodium di-n-alkyl phosphates. *Liebigs Annalen* **1997**, *1997*, 1745-1753.
149. Breslow, D. S.; Baumgarten, E.; Hauser, C. R.; A new synthesis of β -keto esters of the type $\text{RCOCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$. *Journal of the American Chemical Society* **1944**, *66*, 1286-1288.
150. Carpino, L. A.; Cohen, B. J.; Stephens, K. E.; Sadat-Aalae, S. Y.; Tien, J. H.; Langridge, D. C.; (Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl (Fmoc) amino acid chlorides. Synthesis, characterization, and application to the rapid synthesis of short peptide segments. *The Journal of Organic Chemistry* **1986**, *51*, 3732-3734.
151. Beyermann, M.; Bienert, M.; Niedrich, H.; Carpino, L. A.; Sadat-Aalae, D.; Rapid continuous peptide synthesis via Fmoc amino acid chloride coupling and 4-(aminomethyl)piperidine deblocking. *The Journal of Organic Chemistry* **1990**, *55*, 721-728.
152. Suenaga, K.; Kajiwarra, S.; Kuribayashi, S.; Handa, T.; Kigoshi, H.; Synthesis and cytotoxicity of aurilide analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, *18*, 3902-3905.
153. Dijk, M. v.; Nollet, M. L.; Weijers, P.; Dechesne, A. C.; Nostrum, C. F. v.; Hennink, W. E.; Rijkers, D. T. S.; Liskamp, R. M. J.; Synthesis and characterization of biodegradable peptide-based polymers prepared by microwave-assisted click chemistry. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2834-2843.
154. Zinieris, N.; Leondiadis, L.; Ferderigos, N.; Na-Fmoc Removal from Resin-Bound Amino Acids by 5% Piperidine Solution. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2004**, *7*, 4-6.
155. Lee, S. T.; Molyneux, R. J.; Panter, K. E.; Chang, C.-W. T.; Gardner, D. R.; Pfister, J. A.; Garrossian, M.; Ammodendrine and N-methylammodendrine enantiomers: isolation, optical rotation, and toxicity. *Journal of Natural Products* **2005**, *68*, 681-685.
156. Zhao, G.; Kwon, C.; Wang, A.; Robertson, J. G.; Marcinkeviciene, J.; Parker, R. A.; Kirby, M. S.; Hamann, L. G.; Substituted piperidinyl glycyl 2-cyano-4,5-methano pyrrolidines as potent and stable dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23*, 1622-1625.
157. Frérot, E.; Coste, J.; Pantaloni, A.; Dufour, M.-N.; Jouin, P.; PyBOP[®] and PyBroP: Two reagents for the difficult coupling of the α,α -dialkyl amino acid, Aib. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 259-270.
158. Fauconnot, L.; Robert, F.; Villard, R.; Dionisi, F.; Chemical synthesis and NMR characterization of structured polyunsaturated triacylglycerols. *Chemistry and Physics of Lipids* **2006**, *139*, 125-136.
159. Cavalier, F.; Enjalbal, C.; Studies of selective Boc removal in the presence of silyl ethers. *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, 5131-5134.
160. Prashad, M.; Har, D.; Hu, B.; Kim, H.-Y.; Girgis, M. J.; Chaudhary, A.; Repič, O.; Blacklock, T. J.; Marterer, W.; Process development of a large-scale synthesis of TKA731: A tachykinin receptor antagonist. *Organic Process Research & Development* **2004**, *8*, 330-340.
161. Wei, Y.; Sastry, G. N.; Zipse, H.; Methyl cation affinities of commonly used organocatalysts. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 3473-3477.
162. Scherrer, R. A.; Donovan, S. F.; Automated potentiometric titrations in KCl/water-saturated octanol: method for quantifying factors influencing ion-pair partitioning. *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 2768-2778.
163. Höfle, G.; Steglich, W.; Vorbrüggen, H.; 4-Dialkylaminopyridines as highly active acylation catalysts. [New synthetic method (25)]. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1978**, *17*, 569-583.
164. Kaljurand, I.; Kütt, A.; Sooväli, L.; Rodima, T.; Mäemets, V.; Leito, I.; Koppel, I. A.; Extension of the self-consistent spectrophotometric basicity scale in acetonitrile to a full span of 28 pKa Units: unification of different basicity scales. *The Journal of Organic Chemistry* **2005**, *70*, 1019-1028.
165. Glasovac, Z.; Eckert-Maksic, M.; Maksic, Z. B.; Basicity of organic bases and superbases in acetonitrile by the polarized continuum model and DFT calculations. *New Journal of Chemistry* **2009**, *33*, 588-597.
166. Spivey, A. C.; Arseniyadis, S.; Nucleophile Katalyse durch 4-(Dialkylamino)pyridine neu aufgerollt: Optimierung von Reaktivität und Selektivität. *Angewandte Chemie* **2004**, *116*, 5552-5557.
167. Zhong, Z.; Ji, Q.; Zhang, J. A.; Analysis of cationic liposomes by reversed-phase HPLC with evaporative light-scattering detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2010**, *51*, 947-951.

168. Meyer, O.; Roch, O.; Elmlinger, D.; Kolbe, H. V. J.; Direct lipid quantitation of cationic liposomes by reversed-phase HPLC in lipoplex preparation process. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2000**, *50*, 353-356.
169. Chang, C. D.; Harris, D. J.; Reversed-phase high performance liquid chromatographic analysis of cationic lipid-based gene transfer agents. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **1998**, *21*, 1119-1136.
170. Felgner, J.; Separation and quantitation of cationic liposome components by high performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection. *Pharmaceutical Research* **1997**, *14*, 1269-1271.
171. Healthcare, G.; Sephadex LH-20. *Data File 18-1107-22 AB* **2007**.
172. Maxwell, M. A. B.; Williams, J. P.; The purification of lipid extracts using Sephadex LH-20. *Journal of Chromatography A* **1967**, *31*, 62-68.
173. Joustra, M.; Söderqvist, B.; Fischer, L.; Gel filtration in organic solvents. *Journal of Chromatography A* **1967**, *28*, 21-25.
174. Friebolin, H., *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*. Wiley-VCH Verlag GmbH: **1988**, Kap.13.
175. Stewart, W. E.; Siddall, T. H.; Nuclear magnetic resonance studies of amides. *Chemical Reviews* **1970**, *70*, 517-551.
176. Wölk, C.; Drescher, S.; Meister, A.; Blume, A.; Langner, A.; Dobner, B.; General synthesis and physicochemical characterisation of a series of peptide-mimic lysine-based amino-functionalised lipids. *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19*, 12824-12838.
177. Llinas, M.; Wilson, D. M.; Klein, M. P.; Peptide hydrogen bonding. Conformation dependence of the carbonyl carbon-13 nuclear magnetic resonance chemical shifts in ferrichrome. A study by carbon-13-{nitrogen-15} Fourier double resonance spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99*, 6846-6850.
178. Blume, A.; Huebner, W.; Messner, G.; Fourier transform infrared spectroscopy of ¹³C:O labeled phospholipids hydrogen bonding to carbonyl groups. *Biochemistry* **1988**, *27*, 8239-8249.
179. Dittrich, M.; Böttcher, M.; Oliveira, J. S. L.; Dobner, B.; Möhwald, H.; Brezesinski, G.; Physical-chemical characterization of novel cationic transfection lipids and the binding of model DNA at the air-water interface. *Soft Matter* **2011**, *7*, 10162-10173.
180. Dittrich, M.; Heinze, M.; Wölk, C.; Funari, S. S.; Dobner, B.; Möhwald, H.; Brezesinski, G.; Structure-Function Relationships of New Lipids Designed for DNA Transfection. *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 2328-2337.
181. Zhang, H.; Ma, Y.; Sun, X.-L.; Recent developments in carbohydrate-decorated targeted drug/gene delivery. *Medicinal Research Reviews* **2010**, *30*, 270-289.
182. Gupta, A.; Gupta, R. K.; Gupta, G. S.; Targeting cells for drug and gene delivery: Emerging applications of mannans and mannan binding lectins. *Journal of Scientific and Industrial Research* **2009**, *68*, 465-483.
183. Gopal, V.; Xavier, J.; Dar, G. H.; Jafurulla, M.; Chattopadhyay, A.; Rao, N. M.; Targeted liposomes to deliver DNA to cells expressing 5-HT receptors. *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, *419*, 347-354.
184. Nishikawa, M.; Development of cell-specific targeting systems for drugs and genes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2005**, *28*, 195-200.
185. Kelly, C.; Jefferies, C.; Cryan, S. A.; Targeted liposomal drug delivery to monocytes and macrophages. *Journal of Drug Delivery* **2011**, *2011*.
186. Arap, W.; Pasqualini, R.; Ruoslahti, E.; Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* **1998**, *279*, 377-380.
187. Ellerby, H. M.; Arap, W.; Ellerby, L. M.; Kain, R.; Andrusiak, R.; Rio, G. D.; Krajewski, S.; Lombardo, C. R.; Rao, R.; Ruoslahti, E.; Bredesen, D. E.; Pasqualini, R.; Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nature Medicine* **1999**, *5*, 1032-1038.
188. Pasqualini, R.; Koivunen, E.; Kain, R.; Lahdenranta, J.; Sakamoto, M.; Stryhn, A.; Ashmun, R. A.; Shapiro, L. H.; Arap, W.; Ruoslahti, E.; Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Research* **2000**, *60*, 722-727.
189. Lindhorst, T. K.; Glycodendrimere. *Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium* **1996**, *44*, 1073-1079.
190. Connolly, D. T.; Townsend, R. R.; Kawaguchi, K.; Bell, W. R.; Lee, Y. C.; Binding and endocytosis of cluster glycosides by rabbit hepatocytes. Evidence for a short-circuit pathway that does not lead to degradation. *Journal of Biological Chemistry* **1982**, *257*, 939-945.
191. Pfaendler, H. R.; Weimar, V.; Synthesis of racemic ethanolamine plasmalogen. *Synthesis* **1996**, *1996*, 1345-1349.
192. Takano, T.; Nakatsubo, F.; Murakami, K.; A facile allyl β -glycosylation in the presence of a benzyl protecting group, using boron trifluoride etherate. *Carbohydrate Research* **1990**, *203*, 341-342.
193. Schmidt, M.; Synthese von Glycosiden mit Lipidanker zur Untersuchung biologischer Erkennungsprozesse. *Dissertation*, MLU-Halle/Wittenberg, Halle (Saale), **2000**.
194. Erdmann, N.; Beitrag zur Synthese und Charakterisierung siliziumorganischer Verbindungen. *Diplom*, MLU-Halle/Wittenberg, Halle (Saale), **2011**.
195. Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B., *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Thieme Verlagsgesellschaft KG: **2012**, Vol. 8, p125-130.

196. Karplus, M.; Anderson, D. H.; Valence - bond interpretation of electron - coupled nuclear spin interactions; application to methane. *The Journal of Chemical Physics* **1959**, *30*, 6-10.
197. Karplus, M.; Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*, 2870-2871.
198. Segura, M.; Sansone, F.; Casnati, A.; Ungaro, R.; Synthesis of lower rim polyhydroxylated calix[4]arenes. *Synthesis* **2001**, *2001*, 2105-2112.
199. Fleischer, E. B.; Gebala, A. E.; Levey, A.; Tasker, P. A.; Conversion of aliphatic and alicyclic polyalcohols to the corresponding primary polyamines. *The Journal of Organic Chemistry* **1971**, *36*, 3042-3044.
200. Joo, Y.-H.; Shreeve, J. n. M.; 1,3-Diazido-2-(azidomethyl)-2-propylammonium salts. *Inorganic Chemistry* **2009**, *48*, 8431-8438.
201. Petite, H.; Frei, V.; Huc, A.; Herbage, D.; Use of diphenylphosphorylazide for cross-linking collagen-based biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research* **1994**, *28*, 159-165.
202. Masanori, M.; Takayuki, S.; Process for the preparation of azide derivatives. EP0867431 (A1) — 1998-09-30, **1998**.
203. Bogdan, N. D.; Matache, M.; Meier, V. M.; Dobrotă, C.; Dumitru, I.; Roiban, G. D.; Funeriu, D. P.; Protein–inorganic array construction: design and synthesis of the building blocks. *Chemistry – A European Journal* **2010**, *16*, 2170-2180.
204. Staudinger, H.; Meyer, J.; Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylen-derivate und Phosphinimine. *Helvetica Chimica Acta* **1919**, *2*, 635-646.
205. Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H.; CuI-catalyzed alkyne - azide “Click” cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective. *European Journal of Organic Chemistry* **2006**, *2006*, 51-68.
206. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B.; Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 2004-2021.
207. Huisgen, R.; Szeimies, G.; Möbius, L.; 1,3-Dipolare Cycloadditionen, XXXII. Kinetik der Additionen organischer Azide an CC-Mehrfachbindungen. *Chemische Berichte* **1967**, *100*, 2494-2507.
208. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 2596-2599.
209. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M.; Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 3057-3064.
210. van Maarseveen, J. H.; Horne, W. S.; Ghadiri, M. R.; Efficient route to C2 symmetric heterocyclic backbone modified cyclic peptides. *Organic Letters* **2005**, *7*, 4503-4506.
211. David, O.; Maisonneuve, S.; Xie, J.; Generation of new fluorophore by Click chemistry: synthesis and properties of β -cyclodextrin substituted by 2-pyridyl triazole. *Tetrahedron Letters* **2007**, *48*, 6527-6530.
212. Zemplén, G.; Pacsu, E.; Über die Verseifung acetylierter Zucker und verwandter Substanzen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1929**, *62*, 1613-1614.
213. Lindhorst, T. K., *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH: **2007**.
214. Blume, A.; Garidel, P., Chapter 3 Lipid model membranes and biomembranes. In *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry*, Kemp, R. B., Ed. Elsevier Science B.V.: **1999**; Vol. 4, 109-173.
215. Dörfler, H. D., *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*. Springer-Verlag: **2002**, Kap.24.
216. Höhne, G. W. H.; Hemminger, W. F.; Flammersheim, H. J., *Differential Scanning Calorimetry*. Springer-Verlag: **2003**.
217. Plotnikov, V. V.; Brandts, J. M.; Lin, L.-N.; Brandts, J. F.; A new ultrasensitive scanning calorimeter. *Analytical Biochemistry* **1997**, *250*, 237-244.
218. Winter, R.; Noll, F.; Czeslik, C., *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. Vieweg+Teubner Verlag: **2011**, Vol. 2, Kap.2.
219. Doyle, M. L.; Characterization of binding interactions by isothermal titration calorimetry. *Current Opinion in Biotechnology* **1997**, *8*, 31-35.
220. Freire, E.; Mayorga, O.; Straume, M.; Isothermal titration calorimetry. *Analytical Chemistry* **1990**, *62*, 950A-959A.
221. Blandamer, M. J.; Cullis, P. M.; Engberts, J. B. F. N.; Titration microcalorimetry. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **1998**, *94*, 2261-2267.
222. Perozzo, R.; Folkers, G.; Scapozza, L.; Thermodynamics of protein–ligand interactions: history, presence, and future aspects. *Journal of Receptors and Signal Transduction* **2004**, *24*, 1-52.
223. Seelig, J.; Thermodynamics of lipid–peptide interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2004**, *1666*, 40-50.
224. Krishnakumari, V.; Nagaraj, R.; Binding of peptides corresponding to the carboxy-terminal region of human- β -defensins-1–3 with model membranes investigated by isothermal titration calorimetry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2012**, *1818*, 1386-1394.

225. Schwieger, C.; Blume, A.; Interaction of poly(L-arginine) with negatively charged DPPG membranes: Calorimetric and monolayer studies. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2152-2161.
226. Reuter, M.; Schwieger, C.; Meister, A.; Karlsson, G.; Blume, A.; Poly-L-lysines and poly-L-arginines induce leakage of negatively charged phospholipid vesicles and translocate through the lipid bilayer upon electrostatic binding to the membrane. *Biophysical Chemistry* **2009**, *144*, 27-37.
227. Kennedy, M. T.; Pozharski, E. V.; Rakhmanova, V. A.; MacDonald, R. C.; Factors governing the assembly of cationic phospholipid-DNA complexes. *Biophysical Journal* **2000**, *78*, 1620-1633.
228. Barreireiro, P. C. A.; Olofsson, G.; Alexandridis, P.; Interaction of DNA with cationic vesicles: A calorimetric study. *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104*, 7795-7802.
229. Pector, V.; Backmann, J.; Maes, D.; Vandenbranden, M.; Ruyschaert, J.-M.; Biophysical and structural properties of DNA·diC14-amidine complexes: Influence of the DNA/lipid ratio. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 29533-29538.
230. Giattrellis, S.; Nikolopoulos, G.; Sideratou, Z.; Nounesis, G.; Calorimetric study of the interaction of binary DMTAP/DOTAP cationic liposomes with plasmid DNA. *Journal of Liposome Research* **2009**, *19*, 220-230.
231. Zhu, D.-M.; Evans, R. K.; Molecular mechanism and thermodynamics study of plasmid DNA and cationic surfactants interactions. *Langmuir* **2006**, *22*, 3735-3743.
232. Patel, M. M.; Anchordoquy, T. J.; Contribution of hydrophobicity to thermodynamics of ligand-DNA binding and DNA collapse. *Biophysical Journal* **2005**, *88*, 2089-2103.
233. Spink, C. H.; Chaires, J. B.; Thermodynamics of the binding of a cationic lipid to DNA. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 10920-10928.
234. Fujii, S.; Nishimura, T.; Sakurai, K.; Thermodynamics of lipoplex formation: relationship between the lipid alkyl tail length and thermodynamic functions. *Chemistry Letters* **2012**, *41*, 501-503.
235. Barreireiro, P. C. A.; May, R. P.; Lindman, B.; Mechanism of formation of DNA-cationic vesicle complexes. *Faraday Discussions* **2003**, *122*, 191-201.
236. Barreireiro, P. C. A.; Lindman, B.; The kinetics of DNA-cationic vesicle complex formation. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 6208-6213.
237. Wiseman, T.; Williston, S.; Brandts, J. F.; Lin, L.-N.; Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Analytical Biochemistry* **1989**, *179*, 131-137.
238. Pecora, R.; Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *Journal of Nanoparticle Research* **2000**, *2*, 123-131.
239. Pencer, J.; Hallett, F. R.; Effects of vesicle size and shape on static and dynamic light scattering measurements. *Langmuir* **2003**, *19*, 7488-7497.
240. Dörfler, H. D., *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*. Springer-Verlag: **2002**, Kap.14.
241. Müller, R. H., *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: **1996**.
242. Winter, R.; Noll, F.; Czeslik, C., *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. Vieweg+Teubner Verlag: **2011**, Vol. 2, Kap.3.
243. Dörfler, H.-D.; Brezesinski, G.; Miethe, P.; Phase diagrams of pseudo-binary phospholipid systems I. Influence of the chain length differences on the miscibility properties of cephaline/cephaline/water systems. *Chemistry and Physics of Lipids* **1988**, *48*, 245-254.
244. Cevc, G.; How membrane chain-melting phase-transition temperature is affected by the lipid chain asymmetry and degree of unsaturation: an effective chain-length model. *Biochemistry* **1991**, *30*, 7186-7193.
245. Cevc, G.; How membrane chain melting properties are regulated by the polar surface of the lipid bilayer. *Biochemistry* **1987**, *26*, 6305-6310.
246. Garidel, P.; Johann, C.; Blume, A.; Nonideal mixing and phase separation in phosphatidylcholine phosphatidic acid mixtures as a function of acyl chain length and pH. *Biophysical Journal* **1997**, *72*, 2196-2210.
247. Garidel, P.; Johann, C.; Blume, A.; Non-ideal mixing and fluid-fluid immiscibility in phosphatidic acid-phosphatidylethanolamine mixed bilayers. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **2011**, *40*, 891-905.
248. Lewis, R. N. A. H.; Tristram-Nagle, S.; Nagle, J. F.; McElhaney, R. N.; The thermotropic phase behavior of cationic lipids: calorimetric, infrared spectroscopic and X-ray diffraction studies of lipid bilayer membranes composed of 1,2-di-O-myristoyl-3-N,N,N-trimethylaminopropane (DM-TAP). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2001**, *1510*, 70-82.
249. Tada, K.; Saito, K.; Goto, M.; Tamai, N.; Matsuki, H.; Kaneshina, S.; High-pressure study on bilayer phase behavior of oleoylmyristoyl- and myristoyloleoyl-phosphatidylcholines. *Biophysical Chemistry* **2008**, *138*, 36-41.
250. Serrallach, E. N.; De Haas, G. H.; Shipley, G. G. Structure and thermotropic properties of mixed-chain phosphatidylcholine bilayer membranes. *Biochemistry* **1984**, *23*, 713-720.
251. Tada, K.; Goto, M.; Tamai, N.; Matsuki, H.; Kaneshina, S.; Effect of pressure on the bilayer phase transitions of asymmetric lipids with an unsaturated acyl chain in sn-1 position. *Journal of Physics: Conference Series* **2010**, *215*, 012162.

252. Epand, R. M.; Bottega, R.; Determination of the phase behaviour of phosphatidylethanolamine admixed with other lipids and the effects of calcium chloride: implications for protein kinase C regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1988**, *944*, 144-154.
253. Sarker, S. R.; Arai, S.; Murate, M.; Takahashi, H.; Takata, M.; Kobayashi, T.; Takeoka, S.; Evaluation of the influence of ionization states and spacers in the thermotropic phase behaviour of amino acid-based cationic lipids and the transfection efficiency of their assemblies. *International Journal of Pharmaceutics* **2012**, *422*, 364-373.
254. Gopal, V.; Xavier, J.; Kamal, M. Z.; Govindarajan, S.; Takafuji, M.; Soga, S.; Ueno, T.; Ihara, H.; Rao, N. M.; Synthesis and transfection efficiency of cationic oligopeptide lipids: role of linker. *Bioconjugate Chemistry* **2011**.
255. Blandamer, M. J.; Briggs, B.; Cullis, P. M.; Engberts, J. B. F. N.; Norman, R. I.; Influence of polar head groups on the gel to liquid-crystal transition in vesicular and lipid bilayer systems. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **1996**, *92*, 3163-3164.
256. Blume, A.; A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1979**, *557*, 32-44.
257. Boggs, J. M.; Effect of lipid structural modifications on their intermolecular hydrogen bonding interactions and membrane functions. *Biochemistry and Cell Biology* **1986**, *64*, 50-57.
258. Boggs, J. M.; Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1987**, *906*, 353-404.
259. Koynova, R. D.; Kuttentrich, H. L.; Tenchov, B. G.; Hinz, H. J.; Influence of head-group interactions on the miscibility of synthetic, stereochemically pure glycolipids and phospholipids. *Biochemistry* **1988**, *27*, 4612-4619.
260. Pawlowska, D.; Tassler, S., persönliche Mitteilung. In 2014.
261. Garidel, P.; Blume, A.; Miscibility of phospholipids with identical headgroups and acyl chain lengths differing by two methylene units: Effects of headgroup structure and headgroup charge. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1998**, *1371*, 83-95.
262. Asokan, A.; Cho, M. J.; Exploitation of intracellular pH gradients in the cellular delivery of macromolecules. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2002**, *91*, 903-913.
263. Majhi, P. R.; Blume, A.; Temperature-induced micelle-vesicle transitions in DMPC–SDS and DMPC–DTAB mixtures studied by calorimetry and dynamic light scattering. *The Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106*, 10753-10763.
264. Wölk, C.; Drescher, S.; Meister, A.; Blume, A.; Langner, A.; Dobner, B.; In *Physicochemical Characterization of the Miscibility of Phospholipids with a Novel Amino-Functionalized Lipid Bearing Three Alkyl Chains*, 3. Symposium on Phospholipids in Pharmaceutical Research - Heidelberg, Poster, **2013**.
265. Blume, A.; Tuchtenhagen, J.; Thermodynamics of ion binding to phosphatidic acid bilayers. Titration calorimetry of the heat of dissociation of DMPA. *Biochemistry* **1992**, *31*, 4636-4642.
266. Eibl, H.; Blume, A.; The influence of charge on phosphatidic acid bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1979**, *553*, 476-488.
267. Blume, A.; Eibl, H.; The influence of charge on bilayer membranes calorimetric investigations of phosphatidic acid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1979**, *558*, 13-21.
268. Blume, A., Persönliche Mitteilung: Wenn mehrere Peaks überlappen, kann man zur Veranschaulichung verschiedene Gauß-Peaks fitten. Dies wird in der Regel genutzt, um Änderungen zu beschreiben. Physikalisch gesehen gibt es dafür keinen Hintergrund. In 2014.
269. Rodham, D. K.; Chapman, D.; Derivative analysis in differential scanning calorimetry of model biomembranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1988**, *959*, 84-89.
270. Wölk, C.; Heinze, M.; Kreideweiß, P.; Dittrich, M.; Brezesinski, G.; Langner, A.; Dobner, B.; Synthesis and DNA transfection properties of new head group modified malonic acid diamides. *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, *409*, 46-56.
271. <http://www.sigmaaldrich.com/chemistry.html>. (**22.01.2013**), *Sigma Aldrich Preis ohne Mehrwertsteuer: 100 g Oleylalkohol (85 %) - 369314-100G = 33,30 Euro, 25 g Oleylalkohol (99 %) - O8880-25G = 1690,00 Euro*
272. Menger, F. M.; Aikens, P.; Synthetische kettensubstituierte Phospholipide; Ionentransport durch die Doppelschichtmembran. *Angewandte Chemie* **1992**, *104*, 919-921.
273. Dahmen-Levison, U.; Brezesinski, G.; Möhwald, H.; Jakob, J.; Nuhn, P.; Investigations of lipid–protein interactions on monolayers of chain-substituted phosphatidylcholines. *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, *39*, 2775-2778.
274. Kaneda, T.; Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. *Bacteriological Reviews* **1977**, *41*, 391-418.
275. Benvegna, T.; Lemiègre, L.; Cammas-Marion, S.; Archaeal lipids: Innovative materials for biotechnological applications. *European Journal of Organic Chemistry* **2008**, *2008*, 4725-4744.
276. Silvius, J. R.; McElhaney, R. N.; Effects of phospholipid acyl chain structure on physical properties: I. Isobranched phosphatidylcholines. *Chemistry and Physics of Lipids* **1979**, *24*, 287-296.
277. Nishihara, M.; Morii, H.; Koga, Y.; Structure determination of a quartet of novel tetraether lipids from methanobacterium thermoautotrophicum. *Journal of Biochemistry* **1987**, *101*, 1007-1015.

278. De Rosa, M.; Gambacorta, A.; Gliozzi, A.; Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeobacterial lipids. *Microbiological Reviews* **1986**, *50*, 70-80.
279. Nuhn, P.; Gutheil, M.; Dobner, B.; Vorkommen, Biosynthese und biologische Bedeutung verzweigter Fettsäuren. *Fette Seifen Anstrichmittel* **1985**, *87*, 135-140.
280. Kannenberg, E.; Blume, A.; McElhaney, R. N.; Poralla, K.; Monolayer and calorimetric studies of phosphatidylcholines containing branched-chain fatty acids and of their interactions with cholesterol and with a bacterial hopanoid in model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1983**, *733*, 111-116.
281. Lewis, R. N. A. H.; McElhaney, R. N.; Thermotropic phase behavior of model membranes composed of phosphatidylcholines containing methyl iso-branched fatty acids. 1. Differential scanning calorimetric studies. *Biochemistry* **1985**, *24*, 2431-2439.
282. Nuhn, P.; Brezesinski, G.; Dobner, B.; Förster, G.; Gutheil, M.; Dörfler, H. D.; Synthesis, calorimetry, and X-ray diffraction of lecithins containing branched fatty acid chains. *Chemistry and Physics of Lipids* **1986**, *39*, 221-236.
283. Menger, F. M.; Wood, M. G.; Zhou, Q. Z.; Hopkins, H. P.; Fumero, J.; Thermotropic properties of synthetic chain-substituted phosphatidylcholines: effect of substituent size, polarity, number, and location on molecular packing in bilayers. *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110*, 6804-6810.
284. Barton, P. G.; Gunstone, F. D.; Hydrocarbon chain packing and molecular motion in phospholipid bilayers formed from unsaturated lecithins. Synthesis and properties of sixteen positional isomers of 1,2-dioctadecenoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine. *Journal of Biological Chemistry* **1975**, *250*, 4470-4476.
285. Mannock, D. A.; Lewis, R. N.; McElhaney, R. N.; Akiyama, M.; Yamada, H.; Turner, D. C.; Gruner, S. M.; Effect of the chirality of the glycerol backbone on the bilayer and nonbilayer phase transitions in the diastereomers of didodecyl-beta-D-glucopyranosyl glycerol. *Biophysical Journal* **1992**, *63*, 1355-1368.
286. Mabrey, S.; Sturtevant, J. M.; Investigation of phase transitions of lipids and lipid mixtures by sensitivity differential scanning calorimetry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1976**, *73*, 3862-3866.
287. Barenholz, Y.; Bombelli, C.; Bonicelli, M. G.; Profio, P. d.; Giansanti, L.; Mancini, G.; Pascale, F.; Influence of lipid composition on the thermotropic behavior and size distribution of mixed cationic liposomes. *Journal of Colloid and Interface Science* **2011**, *356*, 46-53.
288. Garidel, P.; Johann, C.; Blume, A.; Thermodynamics of lipid organization and domain formation in phospholipid bilayers. *Journal of Liposome Research* **2000**, *10*, 131-158.
289. Majhi, P. R.; Blume, A.; Thermodynamic characterization of temperature-induced micellization and demicellization of detergents studied by differential scanning calorimetry. *Langmuir* **2001**, *17*, 3844-3851.
290. Garidel, P.; Hildebrand, A.; Neubert, R.; Blume, A.; Thermodynamic characterization of bile salt aggregation as a function of temperature and ionic strength using isothermal titration calorimetry. *Langmuir* **2000**, *16*, 5267-5275.
291. Paula, S.; Sues, W.; Tuchtenhagen, J.; Blume, A.; Thermodynamics of micelle formation as a function of temperature: A high sensitivity titration calorimetry study. *The Journal of Physical Chemistry* **1995**, *99*, 11742-11751.
292. Birdi, K. S.; Calorimetric determination of the enthalpy of micelle formation in aqueous media. *Colloid and Polymer Science* **1983**, *261*, 45-48.
293. Ledbetter, J. W.; Bowen, J. R.; Spectrophotometric determination of the critical micelle concentration of some alkyltrimethylbenzylammonium chlorides using fluorescein. *Analytical Chemistry* **1969**, *41*, 1345-1347.
294. Chattopadhyay, A.; London, E.; Fluorimetric determination of critical micelle concentration avoiding interference from detergent charge. *Analytical Biochemistry* **1984**, *139*, 408-412.
295. Wölk, C.; Erdmann, N.; Drescher, S.; Meister, A.; Blume, A.; Langner, A.; Dobner, B.; In *Physicochemical Characterization of Cationic Liposomes for the Use as Gene Transfection Systems.*, 2. Symposium on Phospholipids in Pharmaceutical Research - Heidelberg, **2011**.
296. Huang, C.-H.; Phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry* **1969**, *8*, 344-352.
297. Wölk, C.; Pawlowska, D.; Drescher, S.; Auerswald, A.; Meister, A.; Hause, G.; Blume, A.; Langner, A.; Brezesinski, G.; Dobner, B.; New Micellar Transfection Agents. *Langmuir* **2014**, *30*, 4905-4915.
298. McGlothlin, C. D.; Jordan, J. Thermodynamic parameters of some biochemically significant buffers. *Analytical Letters* **1976**, *9*, 245-255.
299. Seelig, J.; Titration calorimetry of lipid-peptide interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1997**, *1331*, 103-116.
300. Antipina, M. N.; Dobner, B.; Kononov, O. V.; Shapovalov, V. L.; Brezesinski, G.; Investigation of the protonation state of novel cationic lipids designed for gene transfection. *The Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111*, 13845-13850.
301. Antipina, M. N.; Schulze, I.; Dobner, B.; Langner, A.; Brezesinski, G.; Physicochemical investigation of a lipid with a new core structure for gene transfection: 2-Amino-3-hexadecyloxy-2-(hexadecyloxymethyl)propan-1-ol. *Langmuir* **2007**, *23*, 3919-3926.
302. Derjaguin, B.; Landau, L.; Theory of the stability of strong charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solution of electrolytes. *Acta Physicochimica URSS* **1941**, *14*, 633-662.

Literatur

303. Caracciolo, G.; Pozzi, D.; Caminiti, R.; Amenitsch, H.; Formation of overcharged cationic lipid/DNA complexes. *Chemical Physics Letters* **2006**, *429*, 250-254.
304. Michanek, A.; Kristen, N.; Höök, F.; Nylander, T.; Sparr, E.; RNA and DNA interactions with zwitterionic and charged lipid membranes — A DSC and QCM-D study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2010**, *1798*, 829-838.
305. Tarahovsky, Y. S.; Rakhmanova, V. A.; Epand, R. M.; MacDonald, R. C.; High temperature stabilization of DNA in complexes with cationic lipids. *Biophysical Journal* **2002**, *82*, 264-273.
306. Burova, T. V.; Grinberg, N. V.; Tur, D. R.; Papkov, V. S.; Dubovik, A. S.; Grinberg, V. Y.; Khokhlov, A. R.; Polyplexes of poly(methylaminophosphazene): Energetics of DNA melting. *Langmuir* **2011**, *27*, 11582-11590.
307. Pabst, G.; Rappolt, M.; Amenitsch, H.; Laggner, P.; Structural information from multilamellar liposomes at full hydration: Full q-range fitting with high quality x-ray data. *Physical Review E* **2000**, *62*, 4000-4009.
308. Pabst, G.; Koschuch, R.; Pozo-Navas, B.; Rappolt, M.; Lohner, K.; Laggner, P.; Structural analysis of weakly ordered membrane stacks. *Journal of Applied Crystallography* **2003**, *36*, 1378-1388.
309. Podgornik, R.; Rau, D. C.; Parsegian, V. A.; The action of interhelical forces on the organization of DNA double helices: fluctuation-enhanced decay of electrostatic double-layer and hydration forces. *Macromolecules* **1989**, *22*, 1780-1786.
310. Koynova, R.; MacDonald, R. C.; Columnar DNA superlattices in lamellar o-ethylphosphatidylcholine lipoplexes: Mechanism of the gel-liquid crystalline lipid phase transition. *Nano Letters* **2004**, *4*, 1475-1479.
311. Fielden, M. L.; Perrin, C.; Kremer, A.; Bergsma, M.; Stuart, M. C.; Camilleri, P.; Engberts, J. B. F. N.; Sugar-based tertiary amino gemini surfactants with a vesicle-to-micelle transition in the endosomal pH range mediate efficient transfection in vitro. *European Journal of Biochemistry* **2001**, *268*, 1269-1279.
312. Battersby, B. J.; Grimm, R.; Huebner, S.; Cevc, G.; Evidence for three-dimensional interlayer correlations in cationic lipid-DNA complexes as observed by cryo-electron microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1998**, *1372*, 379-383.
313. Farago, O.; Grønbech-Jensen, N.; Computational and analytical modeling of cationic lipid-DNA complexes. *Biophysical Journal* **2007**, *92*, 3228-3240.
314. Janich, C.; Wölk, C.; Taßler, S.; Drescher, S.; Meister, A.; Brezesinski, G.; Dobner, B.; Langner, A.; Composites of malonic acid diamides and phospholipids – Structural parameters for optimal transfection efficiency in A549 cells. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2014**, DOI: 10.1002/ejlt.201300405.
315. Kreideweiß, P.; In-vitro Untersuchungen neuer kationischer Lipide für die Gentransfektion am Zellkulturmodell. *Diplom*, MLU-Halle/Wittenberg, Halle (Saale), **2012**.
316. Müllhardt, C., *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag: **2009**.
317. Lazik, A.; Liu, Y.; Bringas, P.; Sangiorgi, F.; Maxson, R.; A sensitive method for analyzing β -galactosidase reporter gene expression in tissue sections of mouse embryos. *Trends in Genetics* **1996**, *12*, 445-447.
318. MacGregor, G.; Nolan, G.; Fiering, S.; Roederer, M.; Herzenberg, L., *Use of Escherichia coli (E. coli) lacZ (β -Galactosidase) as a Reporter Gene*. Humana Press: **1991**, Vol. 7, 217-235.
319. Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C.; Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **1985**, *150*, 76-85.
320. Mosmann, T.; Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **1983**, *65*, 55-63.
321. Dittrich, M.; Physical-Chemical Characterisation of New Lipids Designed for Non-Viral Gene Transfection. *Dissertation*, Universität Potsdam, Potsdam, **2011**.
322. Muñoz-Úbeda, M.; Misra, S. K.; Barrán-Berdón, A. L.; Aicart-Ramos, C.; Sierra, M. B.; Biswas, J.; Kondaiah, P.; Junquera, E.; Bhattacharya, S.; Aicart, E.; Why is less cationic lipid required to prepare lipoplexes from plasmid DNA than linear DNA in gene therapy? *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 18014-18017.
323. Heinze, M.; Untersuchungen neuartiger liposomaler Gentransfersysteme - Beiträge zur Charakterisierung von Transfektionseigenschaften und zytotoxischem Potenzial. *Dissertation*, MLU-Halle/Wittenberg, Halle (Saale), **2010**.
324. <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/11668027>. (**29.01.2014**), *Produktinformationen*
325. Dalby, B.; Cates, S.; Harris, A.; Ohki, E. C.; Tilkins, M. L.; Price, P. J.; Ciccarone, V. C.; Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* **2004**, *33*, 95-103.
326. Paris, O.; Li, C.; Siegel, S.; Weseloh, G.; Emmerling, F.; Riesemeier, H.; Erko, A.; Fratzl, P.; A new experimental station for simultaneous X-ray microbeam scanning for small- and wide-angle scattering and fluorescence at BESSY II. *Journal of Applied Crystallography* **2007**, *40*, 466-470.
327. Hammersley, A. P.; Svensson, S. O.; Hanfland, M.; Fitch, A. N.; Hausermann, D.; Two-dimensional detector software: From real detector to idealised image or two-theta scan. *High Pressure Research* **1996**, *14*, 235-248.
328. Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A.; NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *The Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62*, 7512-7515.

Literatur

329. Markowski, T.; Modellverbindungen der Archaeobakterienlipide - Synthese, Charakterisierung und Testung in Trägersystemen für Arzneistoffe. *Dissertation* **2010**.
330. Korematsu, A.; Li, Y.-J.; Nakaya, T.; Synthesis and properties of polyurethanes containing phosphatidylcholine analogues in the main chains and long-chain alkyl groups in the side chains. *Polymer Bulletin* **1997**, *38*, 133-140.
331. Schmidt, R. R.; Jankowski, K.; New types of nonionic surfactants with sugar head groups. *Liebigs Annalen* **1996**, *1996*, 867-879.
332. Eisner, U.; Syntheses de substances aliphatiques a longues chaines ramifiees et hydroxylees. *Bulletin de la Societe Chimique de France* **1955**, 212-218.
333. Dif, A.; Boulmedais, F.; Pinot, M.; Roullier, V.; Baudy-Floc'h, M.; Coquelle, F. M.; Clarke, S.; Neveu, P.; Vignaux, F.; Le Borgne, R.; Dahan, M.; Gueroui, Z.; Marchi-Artzner, V.; Small and Stable Peptidic PEGylated Quantum Dots to Target Polyhistidine-Tagged Proteins with Controlled Stoichiometry. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 14738-14746.

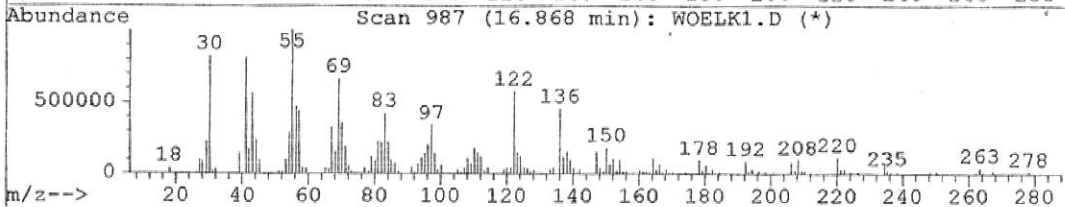
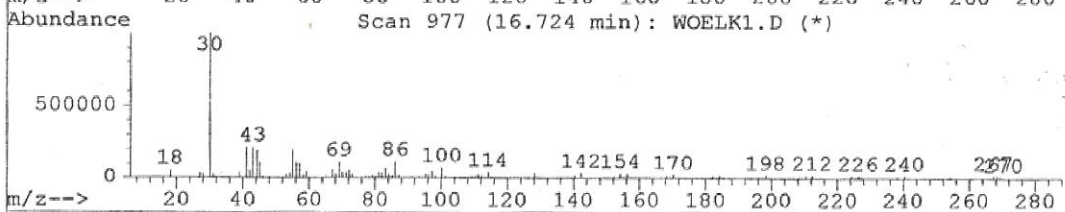
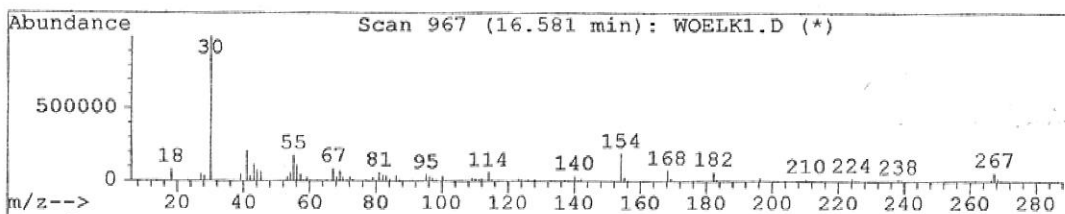
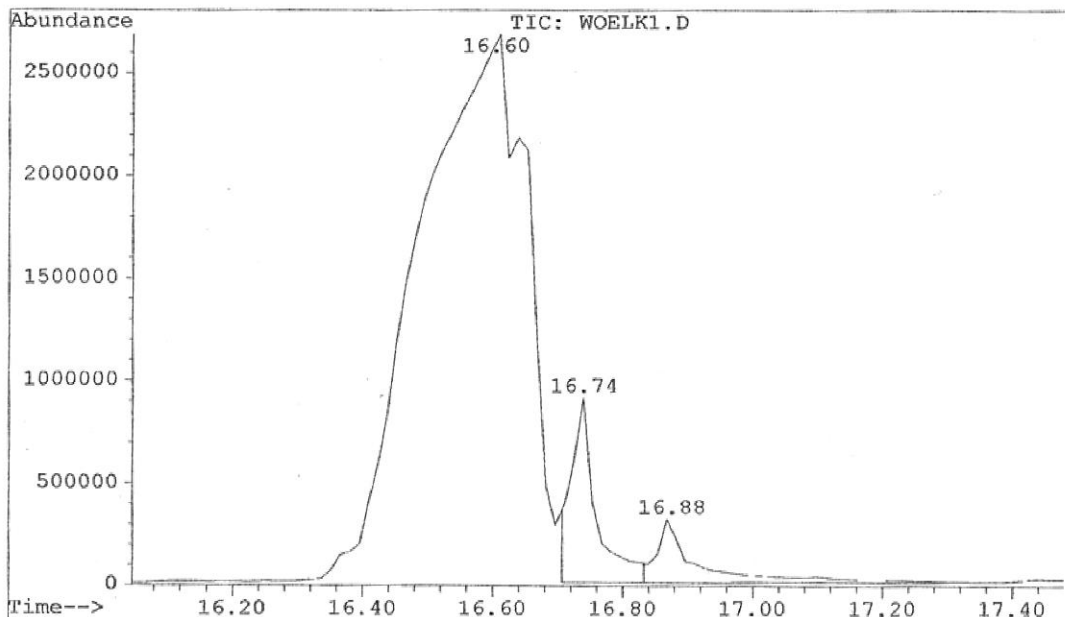
Anhang

GC-MS Spektren:	ii
Ergänzende DSC-Kurven:	viii
Ergänzende ITC-Experimente:	x
Ergänzungen zu den ζ -Potentialmessungen:.....	xi
FT-IR-Messungen:	xii
Ergänzende SAXS-Ergebnisse:	xiii
TEM-Aufnahmen	xiv
Ergänzende ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren:.....	xvi
Wölk et al., Chemistry – A European Journal. 2013, 19, 12824-12838.	xxix

GC-MS Spektren:

Oleylamin (tech., 70%) von Sigma Aldrich:

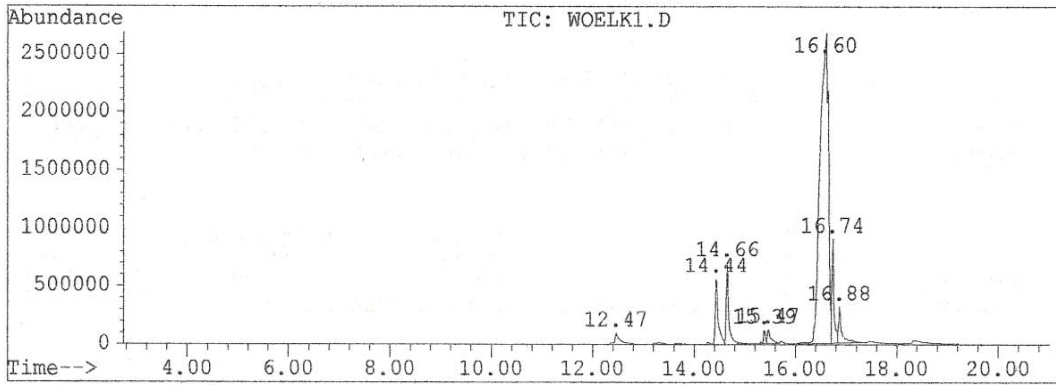
File : C:\HPCHEM\1\DATA\1\WOELK1.D
 Operator : E.L.
 Acquired : 27 Jan 109 2:30 pm using AcqMethod SCAN1
 Instrument : 5972 - In
 Sample Name: OA M
 Misc Info : 2,7/1-70/10-250
 Vial Number: 1



Anhang

Area Percent Report -- Sorted by Signal

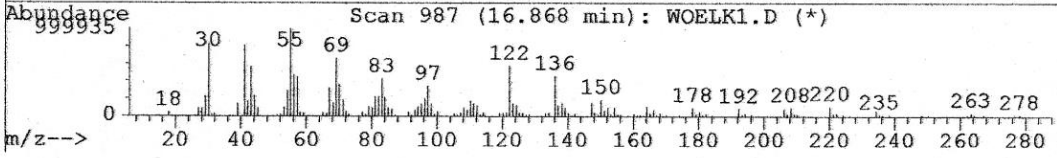
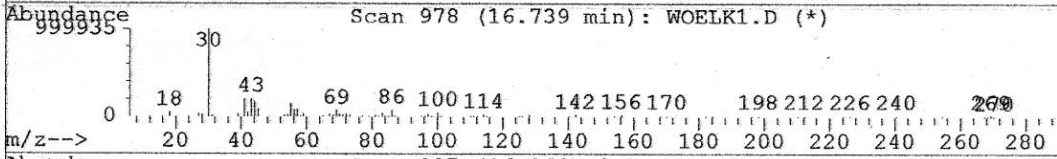
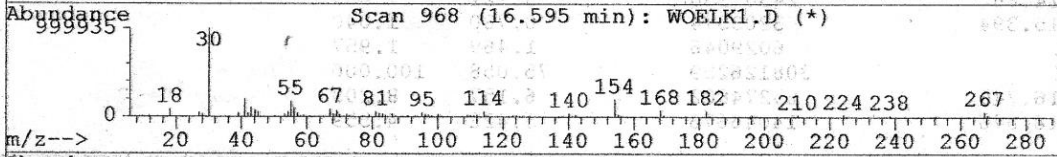
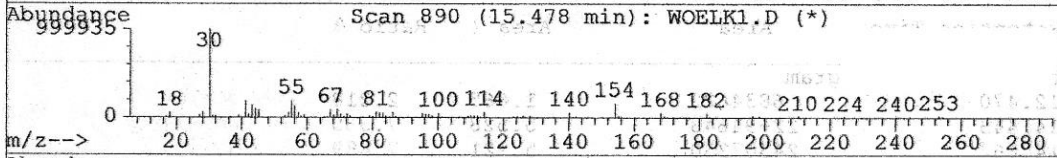
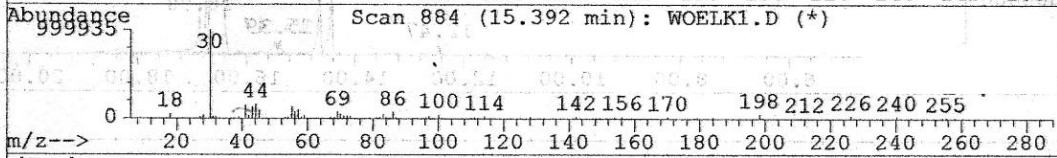
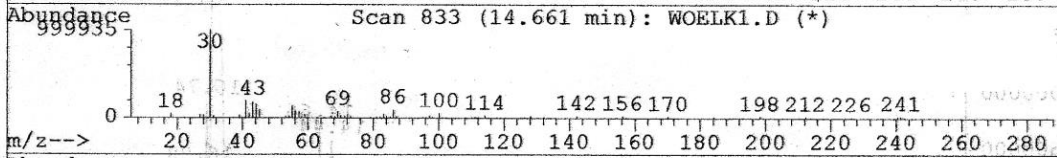
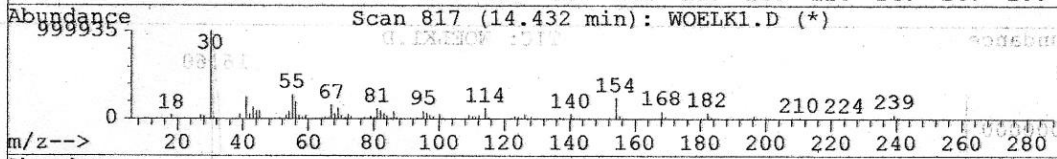
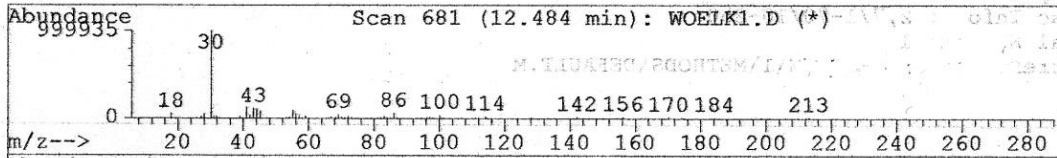
Information from Data File:
File : C:\HPCHEM\1\DATA\1\WOELK1.D
Operator : E.L.
Acquired : 27 Jan 109 2:30 pm using AcqMethod SCAN1
Sample Name: OA M
Misc Info : 2,7/1-70/10-250
Vial Number: 1
CurrentMeth: C:\HPCHEM\1\METHODS\DEFAULT.M



Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
12.470	6834622	1.665	2.218
14.443	22694648	5.528	7.365
14.662	24307230	5.921	7.889
15.394	3203374	0.780	1.040
15.468	6029046	1.469	1.957
16.604	308126259	75.058	100.000
16.740	25274802	6.157	8.203
16.876	14046676	3.422	4.559

Anhang

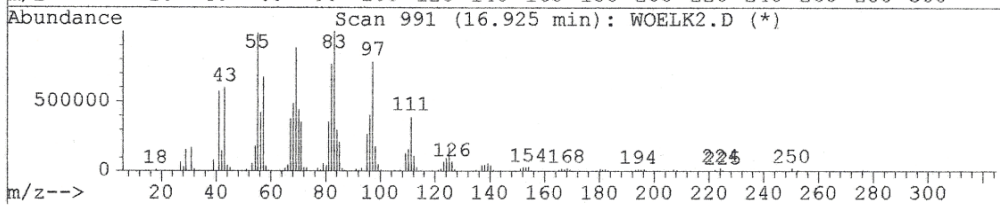
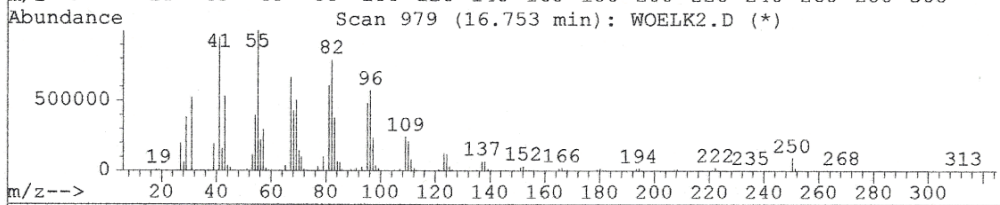
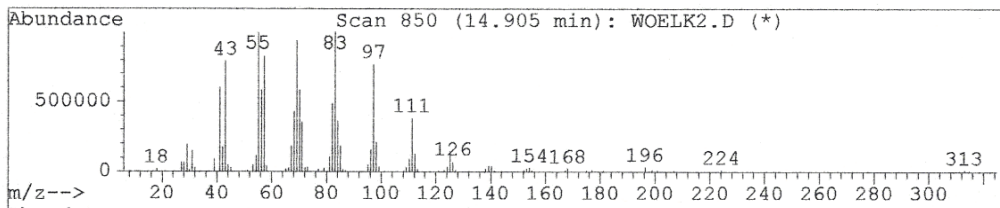
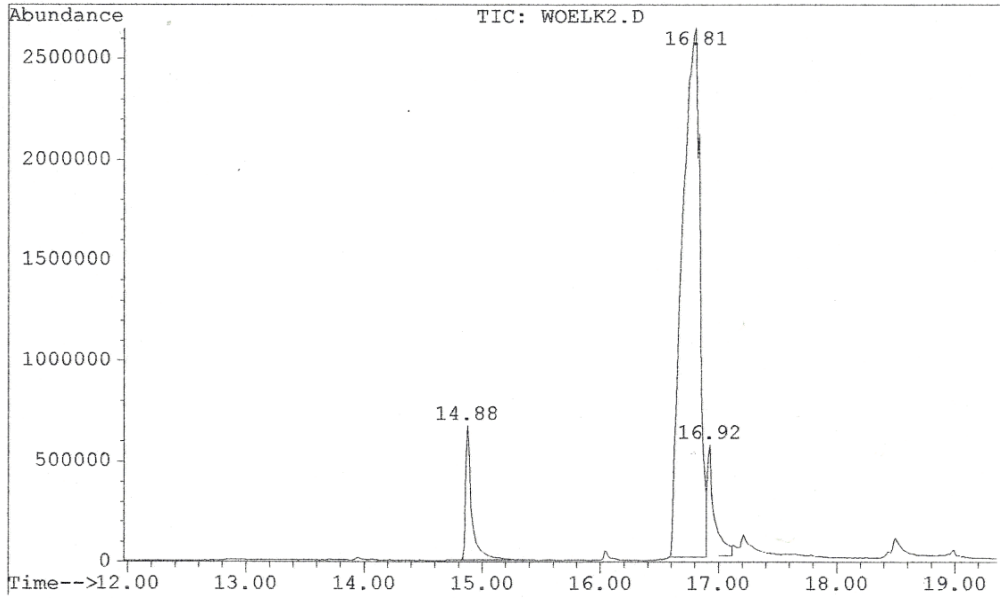
File : C:\HPCHEM\1\DATA\1\WOELK1.D
Operator : E.L.
Acquired : 27 Jan 109 2:30 pm using AcqMethod SCAN1
Instrument : 5972 - In
Sample Name: OA M
Misc Info : 2,7/1-70/10-250
Vial Number: 1



Anhang

Oleylalkohol (tech., 85%) von Sigma Aldrich:

File : C:\HPCHEM\1\DATA\1\WOELK2.D
Operator : E.L.
Acquired : 28 Jan 109 6:20 am using AcqMethod SCAN1
Instrument : 5972 - In
Sample Name: OAL
Misc Info : 2,7/1-70/10-250
Vial Number: 1



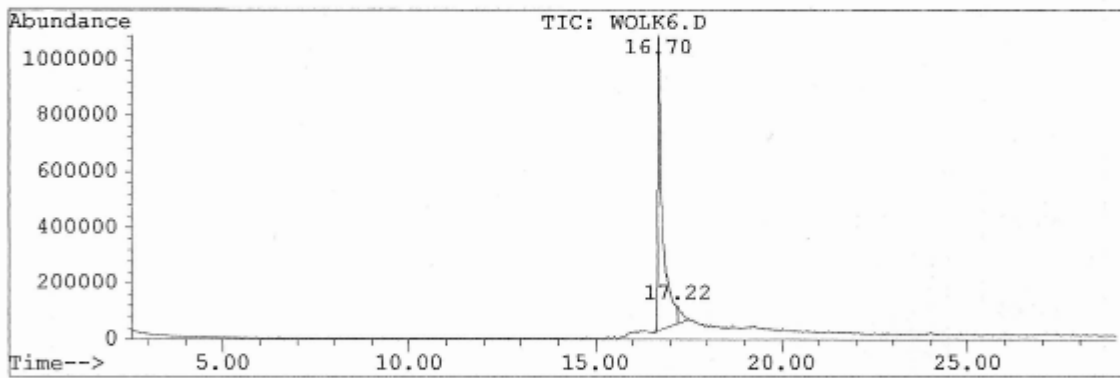
Anhang

Oleylamin (rein):

Area Percent Report -- Sorted by Signal

Information from Data File:

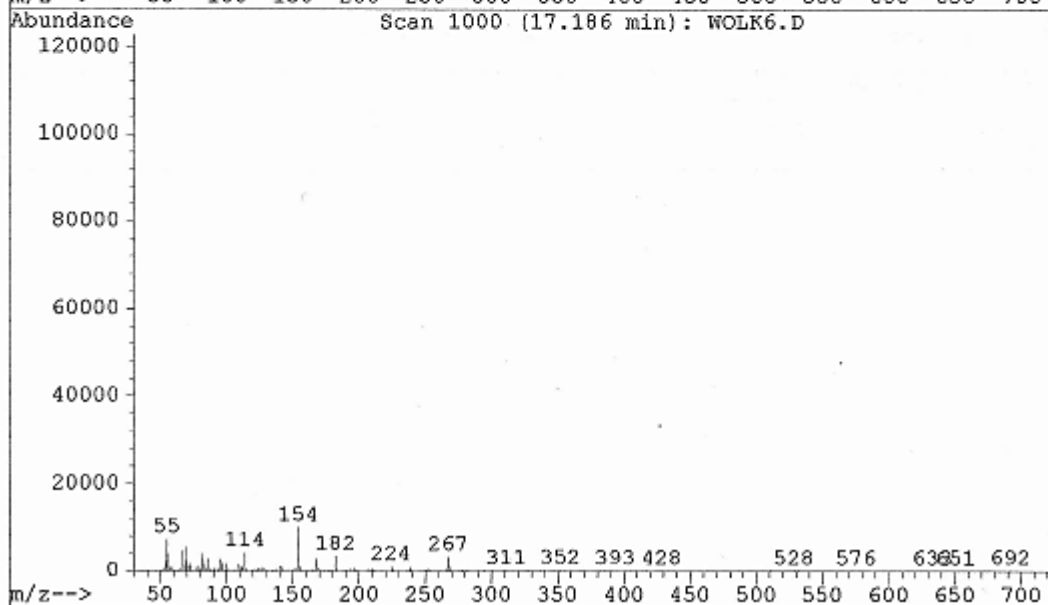
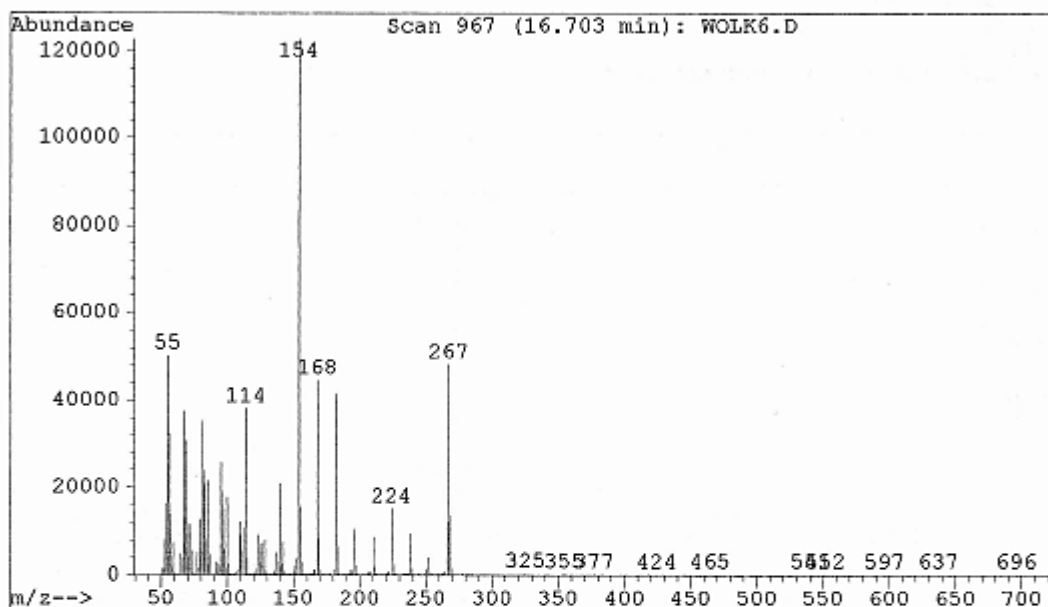
File : C:\HPCHEM\1\DATA\1\WOLK6.D
Operator : Schwarzer
Acquired : 15 Jan 114 7:08 am using AcqMethod SCHWA70
Sample Name: C18H37N
Misc Info : 2,5/1-70/10-250
Vial Number: 1
CurrentMeth: C:\HPCHEM\1\METHODS\DEFAULT.M



Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
16.703	91454672	94.712	100.000
17.223	5106240	5.288	5.583

Anhang

File : C:\HPCHEM\1\DATA\1\WOLK6.D
Operator : Schwarzer
Acquired : 15 Jan 114 7:08 am using AcqMethod SCHWA70
Instrument : 5972 - In
Sample Name: C18H37N
Misc Info : 2,5/1-70/10-250
Vial Number: 1



Ergänzende DSC-Kurven:

Nicht reproduzierbare DSC-Kurven der Verbindungen **TT-VIII** und **HT-VIII** unter Verwendung einer Heizrate von 60 K h^{-1} :

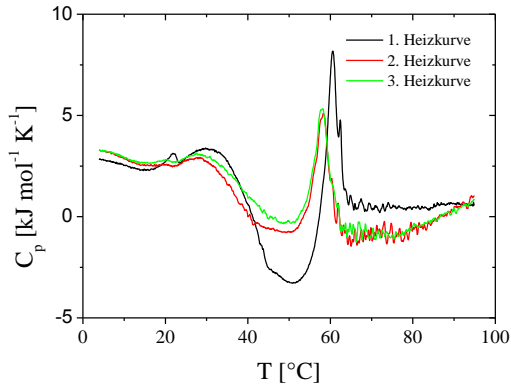


Abb.S-1: 1.-3. DSC-Heizkurve einer wässrigen Dispersion von **TT-VIII** ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$, Carbonatpuffer pH 10) im Temperaturbereich von 2 °C bis 95 °C bei einer Heizrate von 60 K h^{-1} .

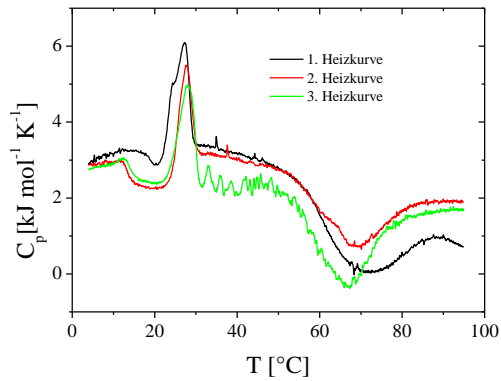


Abb.S-2: 1.-3. DSC-Heizkurve einer wässrigen Dispersion von **HT-VIII** ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$, Carbonatpuffer pH 10) im Temperaturbereich von 2 °C bis 95 °C bei einer Heizrate von 60 K h^{-1} .

Nicht reproduzierbare DSC-Kurven der Verbindungen **TO-VIII** und **HO-VIII** unter Verwendung verschiedener Heizraten von 60 K h^{-1} sowie 20 K h^{-1} :

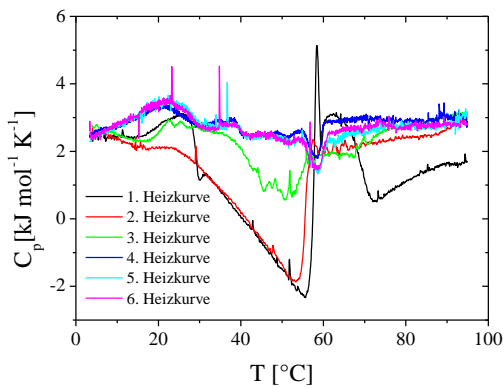


Abb.S-3: DSC-Heizkurven einer wässrigen Dispersion von **TO-VIII** ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$, Carbonatpuffer pH 10) im Temperaturbereich von 2 °C bis 95 °C. Die 1.-3. Heizkurven wurden bei einer Heizrate von 60 K h^{-1} , die 4.-6. Heizkurven bei einer Heizrate von 20 K h^{-1} aufgenommen.

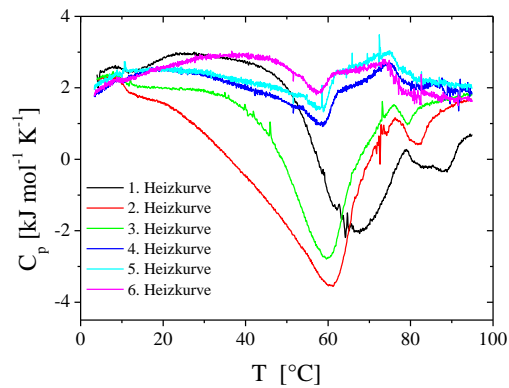


Abb.S-4: DSC-Heizkurven einer wässrigen Dispersion von **HO-VIII** ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$, Carbonatpuffer pH 10) im Temperaturbereich von 2 °C bis 95 °C. Die 1.-3. Heizkurven wurden bei einer Heizrate von 60 K h^{-1} , die 4.-6. Heizkurven bei einer Heizrate von 20 K h^{-1} aufgenommen.

DSC-Kurven von Lipiden der **TT**- und **HT**-Reihe in Acetatpuffer pH 5:

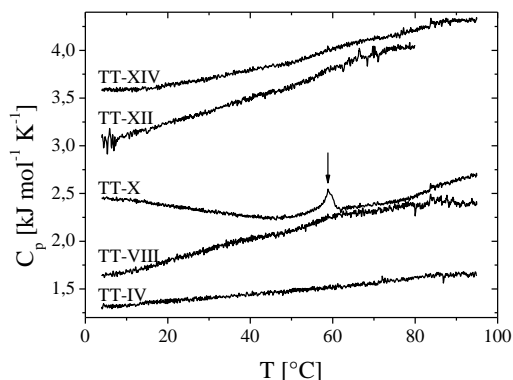


Abb.S-5: DSC-Heizkurven (3. Scan) einer wässrigen Dispersion von Lipiden der **TT**-Reihe ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$, Acetatpuffer pH 5) im Temperaturbereich von 2°C bis 95°C . Die Kurven wurden mit einer Heizrate von 60 K h^{-1} aufgenommen. Die Lipide zeigen im betrachteten Temperaturbereich keine Umwandlung. Lediglich das Lipid **TT-X** zeigt eine Umwandlung von sehr geringer Intensität bei 60°C (siehe Pfeil). Die Kurven wurden zur Veranschaulichung vertikal verschoben.

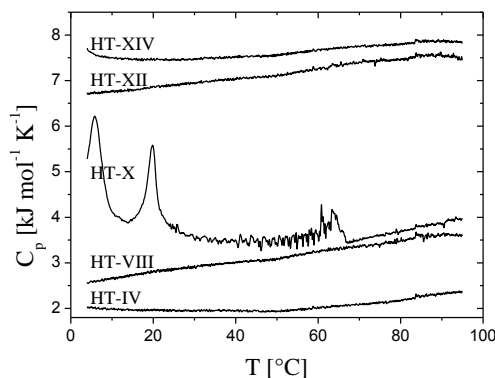


Abb.S-6: DSC-Heizkurven (3. Scan) einer wässrigen Dispersion von Lipiden der **HT**-Reihe ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$, Acetatpuffer pH 5) im Temperaturbereich von 2°C bis 95°C . Die Kurven wurden mit einer Heizrate von 60 K h^{-1} aufgenommen. Die Lipide zeigen im betrachteten Temperaturbereich keine Umwandlung. Lediglich das Lipid **HT-X** zeigt mehrere Umwandlungen. Die Kurven wurden zur Veranschaulichung vertikal verschoben.

DSC-Kurven von **TT-IV** in HEPES-Puffer pH 6,3:

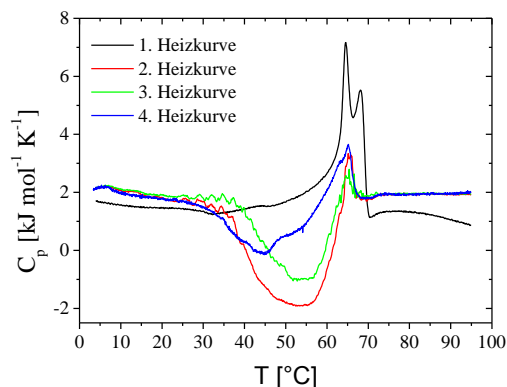


Abb.S-7: DSC-Heizkurven einer wässrigen Dispersion von **TT-IV** ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$, HEPES-Puffer pH 7,3) im Temperaturbereich von 2°C bis 95°C . Die 1-3. Heizkurve wurden bei einer Heizrate von 60 K h^{-1} , die 4. Heizkurve wurde bei einer Heizrate von 20 K h^{-1} aufgenommen.

Ergänzende ITC-Experimente:

Untersuchung der DNA-Komplexierung mit kationischen Liposomen:

Die anschließend dargestellten ITC-Experimente verdeutlichen, dass diese Methode der Komplexbildungsuntersuchung zwischen multilamellaren kationischen Liposomen und DNA mit Problemen hinsichtlich der Reproduzierbarkeit behaftet und somit ungeeignet ist. Um diese Methode anzuwenden gilt es ein reproduzierbares Liposomenherstellungsverfahren zu etablieren, um Unterschiede in der Lamellarität bei gleicher Lipidkonzentration zu vermeiden.

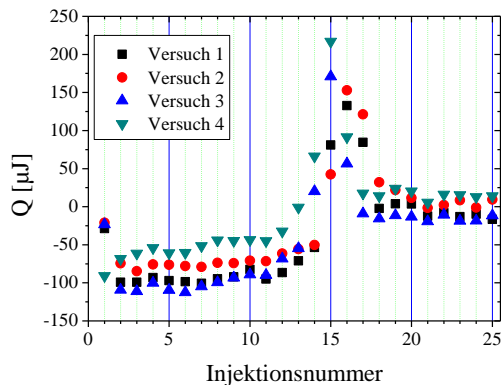


Abb.S-8: ITC-Experiment mit Liposomen, welche durch Filmbildungsmethode und anschließender Ultraschallbehandlung hergestellt wurden. Es wurden 4 unabhängige Versuche mit 4 verschiedenen Liposomenchargen durchgeführt. Experimentelle Daten: Die Spritze (250 µl) war mit Liposomen dispersion ($c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$ in HEPES-Puffer pH 7,3; Zusammensetzung: **lipid 6**/DOPE 2/1 (n/n)) und die Zelle mit 100 µg ml^{-1} sspDNA-Lösung in HEPES-Puffer gefüllt. Es wurden jeweils 10 µl in Intervallen von 600 s injiziert. Die erste Injektion wurde verworfen. Die Temperatur betrug 25°C , die Rührgeschwindigkeit 150 rpm. **Lipid 6** entspricht *N*-[2-(*N,N*-Bis{2-[*N*-(2,6-diamino-1-oxohexyl)amino]ethyl}-*N'*,2-di[(9*Z*)-octadec-9-enyl]propandiamid.

Bestimmung des Titrationsendpunkts (TEP) der ITC-Experimente zur Komplexbildung zwischen **TO-VI** und sspDNA:

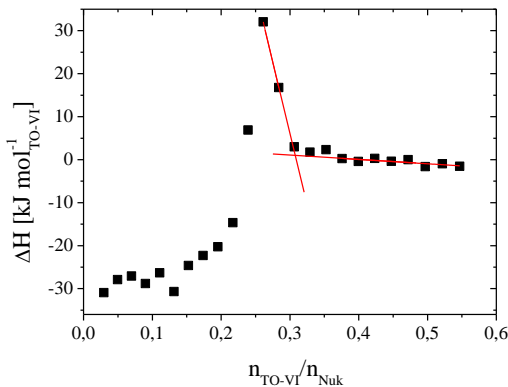


Abb.S-9: Korrigierte Prozesswärmern (auf die Stoffmenge zutitriertes **TO-VI** normiert) als Funktion des molaren **TO-VI**/Nukleotid-Verhältnisses für die Titration von sspDNA ($0,45 \text{ mM}_{\text{Nukleotid}}$) mit **TO-VI** ($0,84 \text{ mM}$) in HEPES-Puffer pH 7,3. Der Schnittpunkt der roten Linien gibt den ermittelten TEP wieder.

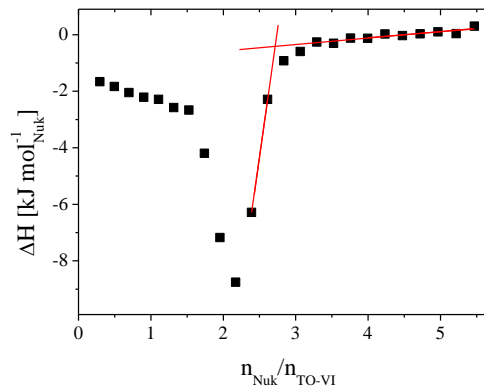


Abb.S-10: Korrigierte Prozesswärmern (auf die Stoffmenge zutitriertes Nukleotid normiert) als Funktion des molaren Nukleotid/**TO-VI**-Verhältnisses für die Titration von **TO-VI** ($0,26 \text{ mM}$) mit sspDNA ($4,85 \text{ mM}_{\text{Nukleotid}}$) in HEPES-Puffer pH 7,3. Der Schnittpunkt der roten Linien gibt den ermittelten TEP wieder.

Ergänzungen zu den ζ -Potentialmessungen:

Bestimmung des isoelektrischen Punkts (*IEP*) mittels nicht linearer Kurvenanpassung nach BOLTZMANN:

Abweichend zu Abb. 55 wurde hier das N/P-Verhältnis auf der Abszisse aufgetragen. Die Umrechnung erfolgte nach folgender Formel: $N/P = 6n_{\text{TO-VI}}/n_{\text{Nuk}}$. Der Vorteil dieser Auftragung ist, dass die Kurven besser untereinander verglichen werden können und der *IEP* direkt aus der BOLTZMANN-Funktion ermittelbar ist.

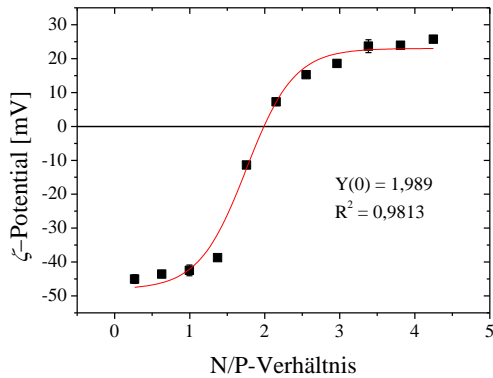


Abb.S-11: Bestimmung des *IEP* durch sigmoidalen Fit nach BOLTZMANN (rote Linie) angewendet auf die Funktion des ζ -Potentials in Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis der Titration **TO-VI**-zu-sspDNA. Das N/P-Verhältnis an dem die BOLTZMANN-Funktion 0mV ergibt, wurde als *IEP* angegeben.

In Abweichung zu den Zetapotentialkurven in Kap. 3.4.3.2 wurde an Stelle des Molenbruchs das entsprechende N/P-Verhältnis auf der Abszisse aufgetragen.

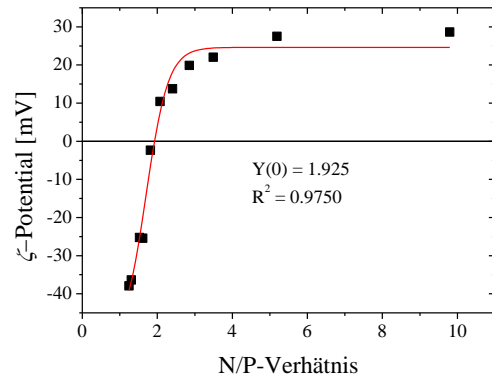


Abb.S-12: Bestimmung des *IEP* durch sigmoidalen Fit nach BOLTZMANN (rote Linie) angewendet auf die Funktion des ζ -Potentials in Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis der Titration sspDNA-zu-**TO-VI**. Das N/P-Verhältnis an dem die BOLTZMANN-Funktion 0mV ergibt, wurde als *IEP* angegeben.

In Abweichung zu den Zetapotentialkurven in Kap. 3.4.3.2 wurde an Stelle des Molenbruchs das entsprechende N/P-Verhältnis auf der Abszisse aufgetragen.

FT-IR-Messungen:

Die Versuche wurden von Herrn Dr. S. DRESCHER durchgeführt. Die Aufnahme der FT-IR-Spektren in Abhängigkeit von der Temperatur wurde mit einem Bruker Vector 22 FT-Spektrometer mit einer Auflösung von 2 cm^{-1} durchgeführt (Bruker Optik GmbH, Karlsruhe, Germany). Dafür wurde die **TO-VI**-Suspension ($c = 50\text{ mg ml}^{-1}$ in D_2O oder $c = 100\text{ mg ml}^{-1}$ in Carbonatpuffer pH 10) zwischen zwei CaF_2 -Scheiben mit einem $6\text{ }\mu\text{m}$ Teflonspacer platziert und vor der Messung 2 h bei 10°C equilibriert. Anschließend wurden im Bereich von 10°C bis 75°C an jedem Messpunkt 64 Scans durchgeführt, wobei die Equilibrierungszeit zwischen den einzelnen Temperaturschritten 8 min betrug. Die Spektren der reinen Lösungsmittel wurden als Referenz aufgenommen und für die Auswertung mittels OPUS-Software (Bruker Optik GmbH, Karlsruhe, Germany) von den Messspektren subtrahiert.

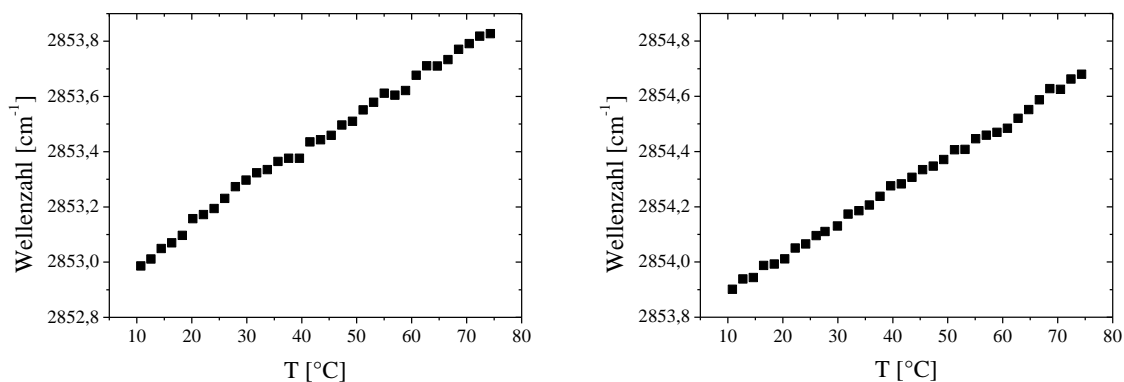


Abb.S-13: Wellenzahlen der symmetrischen CH_2 -Streckschwingung von **TO-VI** in wässrigen Dispersionen (Links: $c = 100\text{ mg ml}^{-1}$ in Carbonatpuffer pH 10, Rechts: $c = 50\text{ mg ml}^{-1}$ in ungepuffertem D_2O pH~8) als Funktion ansteigender Temperatur. Die Wellenzahlen sind in beiden Fällen bei allen betrachteten Temperaturen im Bereich für Alkylketten mit einem hohen Anteil an *gauche*-Konformeren (Reis, O.; Winter, R.; Zerda, T. W. The effect of high external pressure on DPPC-cholesterol multilamellar vesicles: a pressure-tuning Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1996, 1279, 5-16; Mantsch, H. H.; McElhaney, R. N. Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. *Chemistry and Physics of Lipids* 1991, 57, 213-226).

Des Weiteren sind die DSC-Kurven für wässrige Dispersionen bei pH 10 und pH 7,3 dargestellt, um ergänzend zu den FT-IR-Messungen zu zeigen, dass im betrachteten Temperaturbereich kein Phasenübergang detektiert wurde, welcher durch Alkylkettenkonformationsänderungen verursacht wird. Die Ursache der breiten Umwandlung bei pH 10 ist nicht eindeutig geklärt. Konformationsänderungen im Kopfgruppenbereich oder Mizellaggregationsprozesse kommen als mögliche Erklärung in Frage.

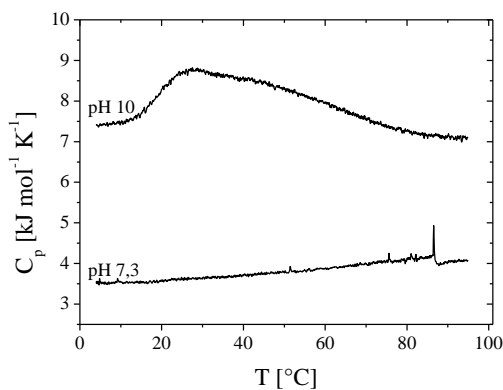


Abb.S-14: DSC-Heizkurven (2. Scan) von wässrigen **TO-VI**-Dispersion ($c = 1\text{ mg ml}^{-1}$, Carbonatpuffer pH 10, HEPES-Puffer pH 7.3) im Temperaturbereich von 2°C bis 95°C . Die Kurven wurden mit einer Heizrate von 60 K h^{-1} aufgenommen. Die Lipide zeigen im betrachteten Temperaturbereich keine scharfe Umwandlung.

Ergänzende SAXS-Ergebnisse:

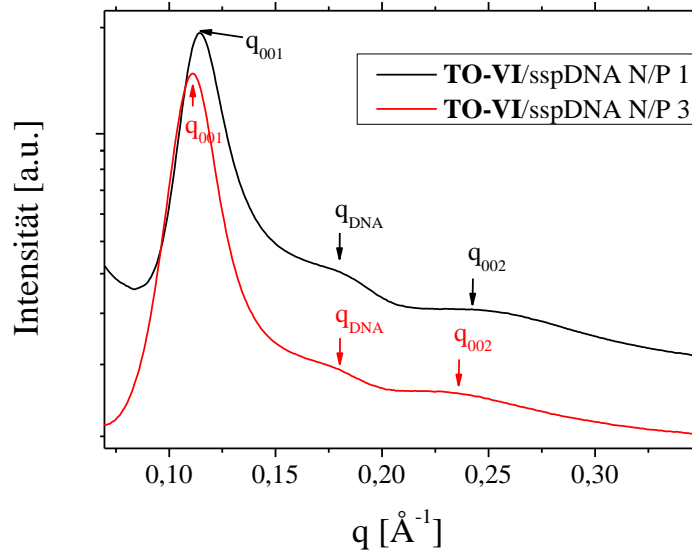


Abb.S-15: SAXS-Diffraktogramme von **TO-VI/sspDNA**-Komplexen mit verschiedenen N/P-Verhältnissen (N/P 1 und N/P 3) in HEPES-Puffer pH 7,3 bei 25 °C. Die BRAGG-Reflexe der L_{α}^C -Phase sind gekennzeichnet. Die experimentellen Bedingungen für beide Proben waren identisch.

TEM-Aufnahmen

Im folgenden Teil sind TEM-Aufnahmen von negativ kontrastierten **TO-VI**/sspDNA-Lipoplexen in verschiedenen N/P-Verhältnissen dargestellt. Die Präparation der Proben ist im experimentellen Teil beschrieben:

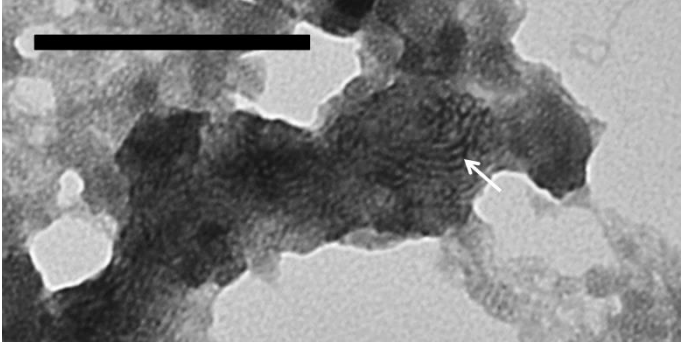


Abb.S-16: TEM-Aufnahme von **TO-VI**/sspDNA-Lipoplexen N/P 1 in HEPES-Puffer pH 7,3 präpariert aus einer Lösung der Konzentration $c = 0,05 \text{ mg ml}^{-1}$. Der weiße Pfeil deutet auf eine schichtförmige Struktur im Lipoplex. Der Balken entspricht 200 nm.

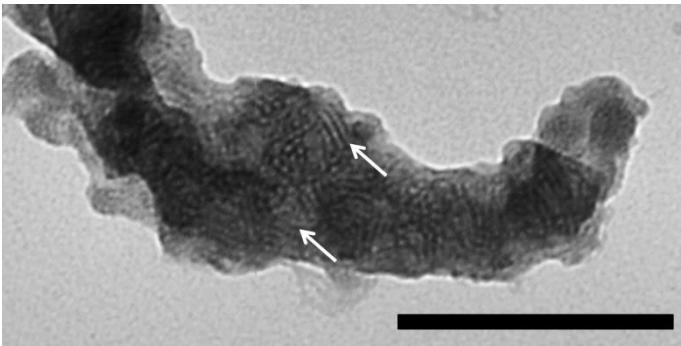


Abb.S-17: TEM-Aufnahme von **TO-VI**/sspDNA-Lipoplexen N/P 1 in HEPES-Puffer pH 7,3 präpariert aus einer Lösung der Konzentration $c = 0,05 \text{ mg ml}^{-1}$. Die weißen Pfeile deuten auf eine schichtförmige Struktur im Lipoplex. Der Balken entspricht 200 nm.

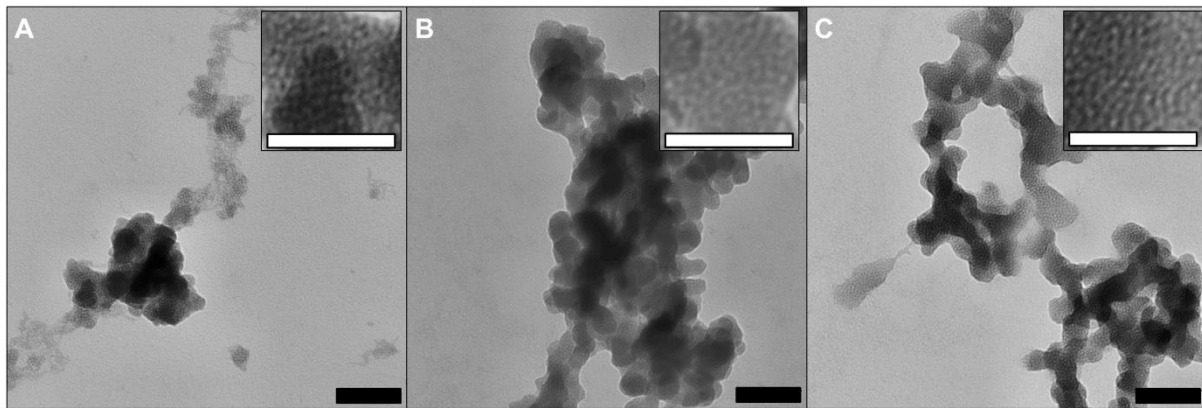


Abb.S-18: TEM-Aufnahme von **TO-VI**/sspDNA-Lipoplexen bei verschiedenen N/P-Verhältnissen in HEPES-Puffer pH 7,3 präpariert aus einer Lösung der Konzentration $c = 0,05 \text{ mg ml}^{-1}$. Folgende N/P-Verhältnisse sind abgebildet: A – N/P 1, B – N/P 2 und C – N/P 3. Die Bildeinsätze zeigen Vergrößerungen der Lipoplexe. Die schwarzen Balken entsprechen 100 nm, die weißen Balken 50 nm.

Im folgenden Teil sind TEM-Aufnahmen von verschiedenen Lipiddispersionen (negativ kontrastierte Proben) in Carbonatpuffer pH 10 dargestellt. Die Präparation der Proben ist im experimentellen Teil beschrieben:

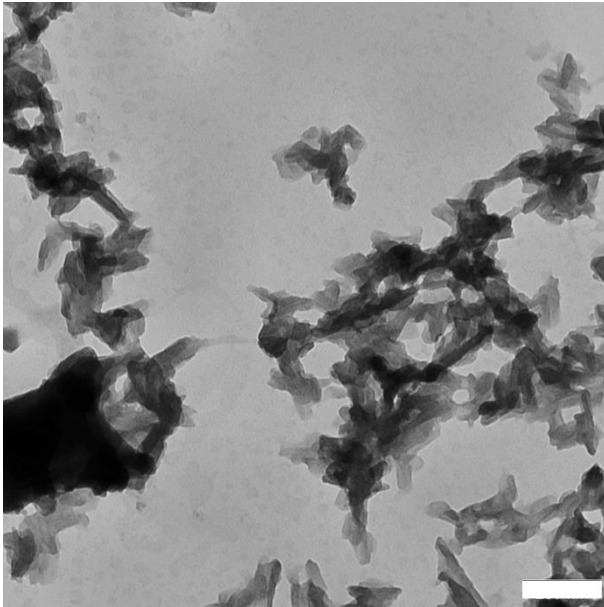


Abb.S-19: TEM-Aufnahme von **TO-XII** präpariert aus einer Lösung der Konzentration $c = 0,05 \text{ mg ml}^{-1}$ in Carbonatpuffer pH 10. Der Balken entspricht 200 nm.

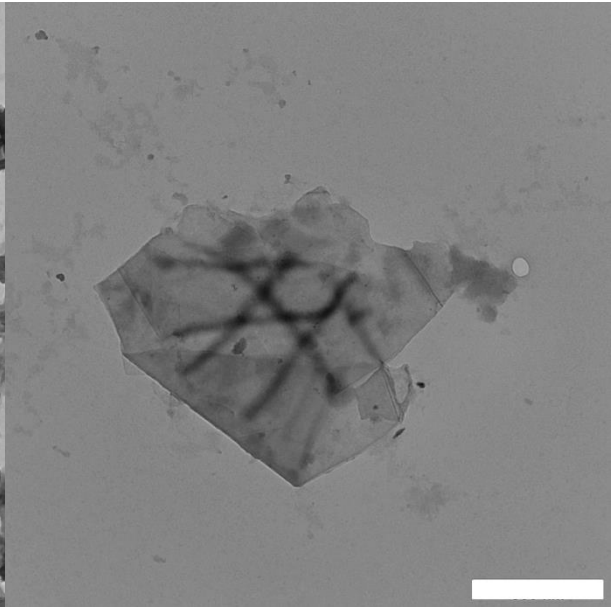


Abb.S-20: TEM-Aufnahme von **TT-XII** präpariert aus einer Lösung der Konzentration $c = 0,05 \text{ mg ml}^{-1}$ in Carbonatpuffer pH 10. Der Balken entspricht 500 nm.

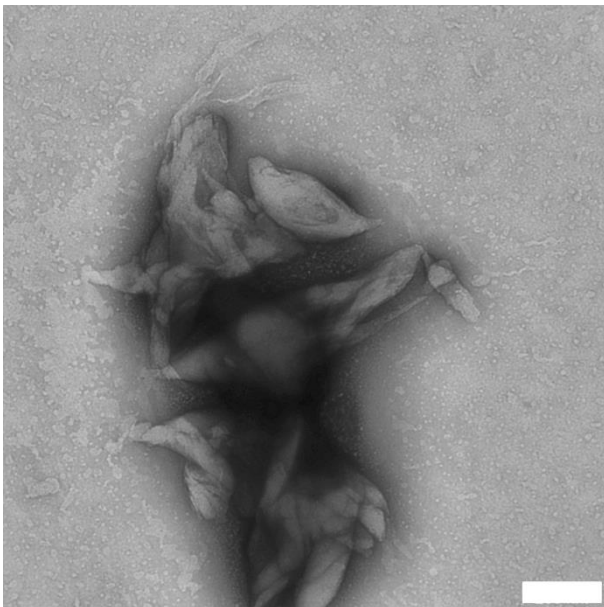


Abb.S-21: TEM-Aufnahme von **TO-IV** präpariert aus einer Lösung der Konzentration $c = 0,05 \text{ mg ml}^{-1}$ in Carbonatpuffer pH 10. Der Balken entspricht 200 nm.

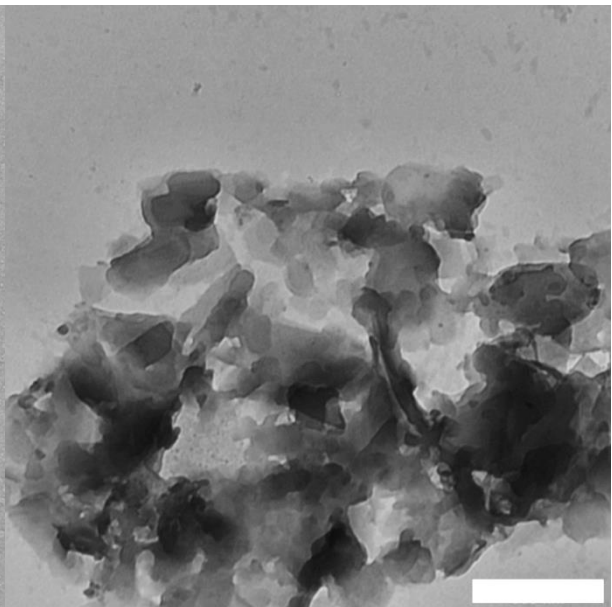


Abb.S-22: TEM-Aufnahme von **TT-XIV** präpariert aus einer Lösung der Konzentration $c = 0,05 \text{ mg ml}^{-1}$ in Carbonatpuffer pH 10. Der Balken entspricht 500 nm.

Ergänzende ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren:**(9Z)-Octadec-9-enylamin - Oleylamin (rein):**

$^1\text{H-NMR}$: Lösungsmittel: CDCl_3 Messfrequenz: 400 MHz T: 27 °C
 $\delta[\text{ppm}] = 0,85$ [t, $^3J(\text{H,H}) = 6,8$ Hz, 3H; $-\text{CH}_2\text{CH}_3$]; 1,27-1,29 [m, 22H; $-\text{CH}_2$ -Alkyl]; 1,40-1,45 [m, 2H; $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$]; 1,98-2,05 [m, 4H; $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$]; 2,67 [t, $^3J(\text{H,H}) = 7,1$ Hz, 2H; $-\text{CH}_2\text{NH}_2$]; 5,30-5,38 [m, 2H; $-\text{CH}=\text{CH}-$]

$^{13}\text{C-NMR}$: Lösungsmittel: CDCl_3 Messfrequenz: 100 MHz T: 27 °C
 $\delta[\text{ppm}] = 14,0; 22,6; 26,8; 27,11; 27,13; 29,17; 29,24; 29,38; 29,44; 29,8; 31,8; 33,3; 42,0; 129,7; 129,8$

(10R,S)-10-Methylhexadecylamin:

$^1\text{H-NMR}$: Lösungsmittel: CDCl_3 Messfrequenz: 400 MHz T: 27 °C
 $\delta[\text{ppm}] = 0,86$ [d, $^3J(\text{H,H}) = 6,6$ Hz, 3H; $-\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$]; 0,88 [t, $^3J(\text{H,H}) = 6,9$ Hz, 3H; $-\text{CH}_2\text{CH}_3$]; 1,04-1,36 [m, 25H; $-\text{CH}_2$ -Alkyl, $-\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$]; 1,42-1,48 [m, 2H; $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$]; 1,95 [s, 2H; $-\text{NH}_2$]; 2,69 [t, $^3J(\text{H,H}) = 7,1$ Hz, 2H; $-\text{CH}_2\text{NH}_2$]

$^{13}\text{C-NMR}$: Lösungsmittel: CDCl_3 Messfrequenz: 100 MHz T: 27 °C
 $\delta[\text{ppm}] = 14,1; 19,7; 22,7; 26,9; 27,0; 27,1; 29,5; 29,63; 29,65; 29,68; 30,0; 31,9; 32,7; 33,4; 37,08; 37,09; 42,1$

Verbindung 1d:

$^1\text{H-NMR}$: Lösungsmittel: CDCl_3 Messfrequenz: 400 MHz T: 27 °C
 $\delta[\text{ppm}] = 0,87$ [t, $^3J(\text{H,H}) = 6,6$ Hz, 6H; $2 \times -(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$]; 1,13-1,46 [m, 54H; $-\text{CH}_2$ -Alkyl, $2 \times -\text{OCH}_2\text{CH}_3$]; 1,82-1,89 [m, 4H; $(-\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{COEt})_2$]; 4,16 [q, $^3J(\text{H,H}) = 7,1$ Hz, 4H; $2 \times -\text{OCH}_2\text{CH}_3$]

Verbindung 2b:

$^1\text{H-NMR}$: Lösungsmittel: CDCl_3 Messfrequenz: 400 MHz T: 27 °C
 $\delta[\text{ppm}] = 0,88$ [t, $^3J(\text{H,H}) = 7,0$ Hz, 3H; $-(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$]; 1,25-1,36 [m, 27H; $-\text{CH}_2$ -Alkyl, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$]; 1,87-1,98 [m, 2H; $(-\text{CH}_2)\text{CH}(\text{COEt})\text{COOH}$]; 3,37 [t, $^3J(\text{H,H}) = 7,3$ Hz, 1H; $(-\text{CH}_2)\text{CH}(\text{COEt})\text{COOH}$]; 4,23 [q, $^3J(\text{H,H}) = 7,1$ Hz, 2H; $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$]

Verbindung 2d:

$^1\text{H-NMR}$: Lösungsmittel: CDCl_3 Messfrequenz: 400 MHz T: 27 °C
 $\delta[\text{ppm}] = 0,88$ [t, $^3J(\text{H,H}) = 6,9$ Hz, 6H; $2 \times -(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$]; 1,08-1,32 [m, 51H; $-\text{CH}_2$ -Alkyl, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$]; 1,80-1,99 [m, 4H; $(-\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{COEt})\text{COOH}$]; 4,26 [q, $^3J(\text{H,H}) = 7,1$ Hz, 2H; $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$]

Verbindung 3b:

$^1\text{H-NMR}$: Lösungsmittel: CDCl_3 Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 $\delta[\text{ppm}] = 0,88$ [t, $^3J(\text{H,H}) = 7,0$ Hz, 3H; $-\text{CH}_2\text{CH}_3$]; 1,27-1,88 [m, 39H; $-\text{CH}_2$ -Alkyl, $(-\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NHBOC}$, $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$]; 1,98-2,02 [m, 4H; $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$]; 3,10-3,24 [m, 4H; $-\text{CH}_2\text{NHBOC}$, $-\text{CH}_2\text{NHCO}-$]; 4,07-4,08 [m, 1H; $-\text{COCH}(\text{NHfmoc})\text{CH}_2-$]; 4,21 [t, $^3J(\text{H,H}) = 6,9$ Hz, 1H; **H9**-Fluoren]; 4,39-4,40 [m, 2H; $-\text{CH}_2$ -Fluoren]; 4,58 [s, 1H; $-\text{NHBOC}$]; 5,30-5,38 [m, 2H; $-\text{CH}=\text{CH}-$]; 5,45 [s, 1H; $-\text{NHfmoc}$]; 6,03 [s, 1H; $-\text{NHCO}$]; 7,31 [t, $^3J(\text{H,H}) = 7,4$ Hz, 2H; **H3,H6**-Fluoren]; 7,40 [t, $^3J(\text{H,H}) = 7,4$ Hz, 2H; **H2,H7**-Fluoren]; 7,59 [d, $^3J(\text{H,H}) = 7,4$ Hz, 2H; **H1,H8**-Fluoren]; 7,76 [d, $^3J(\text{H,H}) = 7,5$ Hz, 2H; **H4,H5**-Fluoren]

Verbindung 3d:

$^1\text{H-NMR}$: Lösungsmittel: CDCl_3 Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 $\delta[\text{ppm}] = 0,83$ [d, $^3J(\text{H,H}) = 6,6$ Hz, 3H; $-\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$]; 0,88 [t, $^3J(\text{H,H}) = 6,9$ Hz, 3H; $-\text{CH}_2\text{CH}_3$]; 1,05-1,87 [m, 42H; $-\text{CH}_2$ -Alkyl, $-\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$, $(-\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NHBOC}$, $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$]; 3,10-3,24 [m, 4H; $-\text{CH}_2\text{NHBOC}$, $-\text{CH}_2\text{NHCO}-$]; 4,07-4,08 [m, 1H; $-\text{COCH}(\text{NHfmoc})\text{CH}_2-$]; 4,21 [t, $^3J(\text{H,H}) = 6,9$ Hz, 1H; **H9**-Fluoren]; 4,40-4,41 [m, 2H; $-\text{CH}_2$ -Fluoren]; 4,57 [s, 1H; $-\text{NHBOC}$]; 5,45 [s, 1H; $-\text{NHfmoc}$]; 6,01 [s, 1H; $-\text{NHCO}$]; 7,31 [t, $^3J(\text{H,H}) = 7,4$ Hz, 2H; **H3,H6**-Fluoren]; 7,40 [t, $^3J(\text{H,H}) = 7,5$ Hz, 2H; **H2,H7**-Fluoren]; 7,59 [d, $^3J(\text{H,H}) = 7,4$ Hz, 2H; **H1,H8**-Fluoren]; 7,76 [d, $^3J(\text{H,H}) = 7,5$ Hz, 2H; **H4,H5**-Fluoren]

Verbindung 4b:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,77 [t, ³J(H,H) = 6,8 Hz, 3H; -CH₂CH₃]; 1,16-1,75 [m, 39H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHBOC, -OC(CH₃)₃]; 1,88-2,91 [m, 4H; -CH₂CH=CHCH₂-]; 2,99-3,05 [m, 2H; -CH₂NHBOC]; 3,09-3,14 [dt, ³J₁(H,H) = 6,7 Hz, ³J₂(H,H) = 6,7 Hz, 2H; -CH₂NHCO-]; 3,21 [dd, ³J₁(H,H) = 7,9 Hz, ³J₂(H,H) = 4,4 Hz, 1H; -COCHNH₂CH₂-]; 4,82 [s, 1H; -NHBOC]; 5,19-5,27 [m, 2H; -CH=CH-]; 7,28 [t, ³J(H,H) = 5,6 Hz, 1H; -NHCO]

Verbindung 4d:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,83 [d, ³J(H,H) = 6,6 Hz, 3H; -CH(CH₂)₂CH₃]; 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 3H; -CH₂CH₃]; 1,05-1,89 [m, 42H; -CH₂-Alkyl, -CH(CH₂)₂CH₃, -(CH₂)₃CH₂NHBOC, -OC(CH₃)₃]; 3,10-3,14 [m, 2H; -CH₂NHBOC]; 3,22 [dt, ³J₁(H,H) = 7,3 Hz, ³J₂(H,H) = 6,5 Hz, 2H; -CH₂NHCO-]; 3,38-3,39 [m, 1H; -COCHNH₂CH₂-]; 4,58 [s, 1H; -NHBOC]; 7,31 [s, 1H; -NHCO]

Verbindung 5b:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,85 [t, ³J(H,H) = 6,7 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,22-1,85 [m, 68H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHBOC, -OCH₂CH₃, -OC(CH₃)₃]; 1,95-2,02 [m, 4H; -CH₂CH=CHCH₂-]; 3,00-3,23 [m, 5H; -CH₂NHBOC, -CH₂NHCO-, -COCH(Tetradecyl)CO-]; 4,09-4,21 [m, 2H; -OCH₂CH₃]; 4,34-4,42 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,69 [s, 1H; -NHBOC]; 5,27-5,35 [m, 2H; -CH=CH-]; 6,60/6,64 [2×s, 1H; -CH₂NHCO-]; 7,05 [d, ³J(H,H) = 8,3 Hz] / 7,08 [d, ³J(H,H) = 8,5 Hz] [2×d, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]

Verbindung 5c:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,8 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,26-1,93 [m, 68H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHBOC, -OCH₂CH₃, -OC(CH₃)₃]; 1,93-2,05 [m, 8H; 2×-CH₂CH=CHCH₂-]; 3,05-3,24 [m, 5H; -CH₂NHBOC, -CH₂NHCO-, -COCH(Oleyl)CO-]; 4,16-4,23 [m, 2H; -OCH₂CH₃]; 4,31-4,36 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,60 [s, 1H; -NHBOC]; 5,31-5,40 [m, 4H; 2×-CH=CH-]; 6,19/6,31 [2×s, 1H; -CH₂NHCO-]; 6,90 [d, ³J(H,H) = 8,0 Hz] / 6,95 [d, ³J(H,H) = 7,4 Hz] [2×d, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]

Verbindung 5f:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,8 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,25-1,93 [m, 72H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHBOC, -OCH₂CH₃, -OC(CH₃)₃]; 1,94-2,03 [m, 4H; -CH₂CH=CHCH₂-]; 3,04-3,25 [m, 5H; -CH₂NHBOC, -CH₂NHCO-, -COCH(Hexadecyl)CO-]; 4,15-4,23 [m, 2H; -OCH₂CH₃]; 4,31-4,37 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,60 [s, 1H; -NHBOC]; 5,33-5,38 [m, 2H; -CH=CH-]; 6,20/6,32 [2×s, 1H; -CH₂NHCO-]; 6,90 [d, ³J(H,H) = 7,9 Hz] / 6,95 [d, ³J(H,H) = 7,8 Hz] [2×d, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]

Verbindung 5g:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,83 [d, ³J(H,H) = 6,5 Hz, 3H; -CH(CH₂)₂CH₃]; 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,03-1,91 [m, 71H; -CH₂-Alkyl, -CH(CH₂)₂CH₃, -(CH₂)₃CH₂NHBOC, -OCH₂CH₃, -OC(CH₃)₃]; 3,04-3,25 [m, 5H; -CH₂NHBOC, -CH₂NHCO-, -COCH(Tetradecyl)CO-]; 4,15-4,23 [m, 2H; -OCH₂CH₃]; 4,31-4,38 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,58 [s, 1H; -NHBOC]; 6,23/6,34 [2×s, 1H; -CH₂NHCO-]; 6,91 [d, ³J(H,H) = 8,0 Hz] / 6,97 [d, ³J(H,H) = 7,7 Hz] [2×d, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]

Verbindung 5h:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,87 [t, ³J(H,H) = 7,0 Hz, 9H; 3×-(CH₂)₂CH₃]; 1,02-1,71 [m, 90H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHBOC, -OCH₂CH₃, -OC(CH₃)₃]; 1,77 [dt, ³J(H,H) = 4,4 Hz, ³J(H,H) = 12,7 Hz, 2H; -(CH₂)₂(CO)-]; 1,96 [dt, ³J(H,H) = 4,8 Hz, ³J(H,H) = 12,8 Hz, 2H; -(CH₂)₂(CO)-]; 3,05-3,22 [m, 4H; -CH₂NHBOC, -CH₂NHCO-]; 4,18-4,24

Anhang

[m, 2H; -OCH₂CH₃]; 4,32-4,35 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,57 [s, 1H; -NHBOC]; 6,37 [t, ³J(H,H) = 5,5 Hz, 1H; -CH₂NHCO-]; 8,38 [d, ³J(H,H) = 7,4 Hz, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]

Verbindung 6b:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,24-1,90 [m, 65H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHBOC, -OC(CH₃)₃]; 1,98-2,02 [m, 4H; -CH₂CH=CHCH₂-]; 3,06-3,29 [m, 5H; -CH₂NHBOC, -CH₂NHCO-, -COCH(Tetradecyl)CO-]; 4,39-4,43 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,75 [s, 1H; -NHBOC]; 5,30-5,37 [m, 2H; -CH=CH-]; 6,61-6,80 [m, 1H; -NHCO-]; 7,34-7,39 [m, 1H; -NHCO-]

Verbindung 6c:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 0,86 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,26-1,86 [m, 65H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHBOC, -OC(CH₃)₃]; 1,94-1,99 [m, 8H; 2×-CH₂CH=CHCH₂-]; 3,06-3,24 [m, 5H; -CH₂NHBOC, -CH₂NHCO-, -COCH(Oleyl)CO-]; 4,40-4,46 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,81 [s, 1H; -NHBOC]; 5,30-5,36 [m, 4H; 2×-CH=CH-]; 6,95-7,15 [m, 1H; -NHCO-]; 7,41-7,62 [m, 1H; -NHCO-]

Verbindung 6f:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,8 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,26-1,97 [m, 69H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHBOC, -OC(CH₃)₃]; 1,98-2,03 [m, 4H; -CH₂CH=CHCH₂-]; 3,03-3,26 [m, 5H; -CH₂NHBOC, -CH₂NHCO-, -COCH(Hexadecyl)CO-]; 4,35-4,40 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,68 [s, 1H; -NHBOC]; 5,33-5,39 [m, 2H; -CH=CH-]; 6,17-6,26 [m, 1H; -NHCO-]; 6,93-7,02 [m, 1H; -NHCO-]

Verbindung 6g:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 0,83 [d, ³J(H,H) = 6,6 Hz, 3H; -CH(CH₂)₂CH₃]; 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,7 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,06-1,89 [m, 68H; -CH₂-Alkyl, -CH(CH₂)₂CH₃, -(CH₂)₃CH₂NHBOC, -OC(CH₃)₃]; 3,06-3,29 [m, 5H; -CH₂NHBOC, -CH₂NHCO-, -COCH(Tetradecyl)CO-]; 4,40-4,47 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,71-4,77 [m, 1H; -NHBOC]; 6,71 [s, 1H; -NHCO-]; 7,38-7,43 [m, 1H; -NHCO-]

Verbindung 6h:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 9H; 3×-(CH₂)₂CH₃]; 1,13-2,03 [m, 91H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHBOC, -OC(CH₃)₃]; 3,04-3,24 [m, 4H; -CH₂NHBOC, -CH₂NHCO-]; 4,38-4,40 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,65 [s, 1H; -NHBOC]; 6,27 [s, 1H; -NHCO-]; 7,48 [s, 1H; -NHCO-]

Verbindung 7b:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 0,89 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,25-1,86 [m, 65H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHBOC, -OC(CH₃)₃]; 2,00-2,04 [m, 4H; -CH₂CH=CHCH₂-]; 2,53-2,60 [m, 6H; -CH₂N(CH₂CH₂NH₂)₂]; 2,80-2,82 [m, 4H; 2×-CH₂NH₂]; 3,05-3,41 [m, 7H; -CH₂NHBOC, 2×-CH₂NHCO-, -COCH(Tetradecyl)CO-]; 4,36-4,41 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,87/4,99 [2×s, 1H; -NHBOC]; 5,34-5,37 [m, 2H; -CH=CH-]; 7,49-7,52 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 6,88/7,52/7,66/8,24/8,34 [5×s, 2H; 2×-NHCO-]

Verbindung 7c:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 0,82 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,21-1,79 [m, 65H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHBOC, -OC(CH₃)₃]; 1,92-1,99 [m, 8H; 2×-CH₂CH=CHCH₂-]; 2,39-2,54 [m, 6H; -CH₂N(CH₂CH₂NH₂)₂]; 2,65-2,71 [m, 4H; 2×-CH₂NH₂]; 2,99-3,38 [m, 7H; -CH₂NHBOC, 2×-CH₂NHCO-, -COCH(Oleyl)CO-]; 4,29-4,37 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,94/5,19 [2×s, 1H; -NHBOC]; 5,27-5,32 [m, 4H; 2×-CH=CH-]; 7,60/7,91 [2×s, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 6,85/7,76/8,18 [3×s, 2H; 2×-NHCO-]

Verbindung 7f:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,8 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,23-1,88 [m, 69H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHBOC, -OC(CH₃)₃]; 1,95-2,02 [m, 4H; -CH₂CH=CHCH₂-]; 2,51-2,63 [m, 6H; -CH₂N(CH₂CH₂NH₂)₂]; 2,79-2,81 [m, 4H; 2×-CH₂NH₂]; 3,06-3,37 [m, 7H; -CH₂NHBOC, 2×-CH₂NHCO-, -COCH(Hexadecyl)CO-]; 4,33-4,41 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,81/4,93 [2×s, 1H; -NHBOC]; 5,30-5,39 [m, 2H; -CH=CH-]; 7,42-7,44 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 6,79/7,32/7,50/8,19/8,30 [5×s, 2H; 2×-NHCO-]

Verbindung 7g:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,83 [d, ³J(H,H) = 6,6 Hz, 3H; -CH(CH₂)₂CH₃]; 0,88 [t, ³J(H,H) = 7,0 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,06-1,86 [m, 68H; -CH₂-Alkyl, -CH(CH₂)₂CH₃, -(CH₂)₃CH₂NHBOC, -OC(CH₃)₃]; 2,49-2,61 [m, 6H; -CH₂N(CH₂CH₂NH₂)₂]; 2,75-2,79 [m, 4H; 2×-CH₂NH₂]; 3,04-3,39 [m, 7H; -CH₂NHBOC, 2×-CH₂NHCO-, -COCH(Tetradecyl)CO-]; 4,30-4,39 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,79/4,95 [2×s, 1H; -NHBOC]; 7,33-7,37 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 6,58/8,20/8,29 [3×s, 2H; 2×-NHCO-]

Verbindung 7h:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 9H; 3×-(CH₂)₂CH₃]; 1,13-1,85 [m, 91H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHBOC, -OC(CH₃)₃]; 2,54-2,62 [m, 6H; -CH₂N(CH₂CH₂NH₂)₂]; 2,78 [t, ³J(H,H) = 5,7 Hz, 4H; 2×-CH₂NH₂]; 3,03-3,40 [m, 6H; -CH₂NHBOC, 2×-CH₂NHCO-]; 4,39-4,44 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,89 [s, 1H; -NHBOC]; 7,80 [d, ³J(H,H) = 7,6 Hz, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 6,88/8,19 [2×s, 2H; 2×-NHCO-]

RTO-IV (8b):

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,85 [t, ³J(H,H) = 6,8 Hz, 6H; 2×-CH₃]; 1,21-1,82 [m, 56H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NH₂]; 1,96-1,99 [m, 4H; -CH₂CH=CHCH₂-]; 2,49-2,55 [m, 6H; -CH₂N(CH₂CH₂NH₂)₂]; 2,66-2,78 [m, 6H; 3×-CH₂NH₂]; 3,05-3,33 [m, 5H; 2×-CH₂NHCO-, -COCH(Tetradecyl)CO-]; 4,34-4,40 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 5,28-5,35 [m, 2H; -CH=CH-]; 7,00-7,01/7,63-7,81/8,25-8,37 [3×m, 3H; 3×-NHCO-]

¹³C-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃/CD₃OD Messfrequenz: 125 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 14,1; 22,7; 22,8; 26,96; 26,99; 27,2; 27,6; 27,7; 29,27; 29,29; 29,33; 29,45; 29,49; 29,63; 29,65; 29,68; 29,73; 29,75; 31,86; 31,88; 37,3; 37,9; 39,13; 39,18; 39,55; 39,59; 41,1; 41,3; 53,3; 53,4; 53,7; 54,2; 54,3; 55,6; 55,8; 129,7; 129,9; 170,3; 170,7; 171,3; 171,4; 171,5

OO-IV (8c):

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,85 [t, ³J(H,H) = 6,8 Hz, 6H; 2×-CH₃]; 1,24-1,88 [m, 56H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NH₂]; 1,93-1,99 [m, 8H; 2×-CH₂CH=CHCH₂-]; 2,45-2,56 [m, 6H; -CH₂N(CH₂CH₂NH₂)₂]; 2,64-2,76 [m, 6H; 3×-CH₂NH₂]; 3,04-3,41 [m, 5H; 2×-CH₂NHCO-, -COCH(Oleyl)CO-]; 4,31-4,37 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 5,27-5,35 [m, 4H; 2×-CH=CH-]; 7,16-7,17/7,83-7,98/8,16-8,23 [3×m, 3H; 3×-NHCO-]

¹³C-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃/CD₃OD Messfrequenz: 125 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 12,9; 21,8; 22,11; 22,14; 26,1; 26,3; 28,3; 28,4; 28,50; 28,58; 28,62; 28,7; 28,83; 28,88; 28,92; 28,98; 30,4; 31,0; 31,1; 31,7; 36,6; 36,7; 38,0; 38,1; 38,6; 38,7; 40,1; 40,2; 48,4; 52,69; 52,74; 52,85; 55,26; 55,33; 128,9; 129,0; 129,4; 129,5; 170,4; 170,5; 170,8; 171,5; 171,6

HO-IV (8f):

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,87 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-CH₃]; 1,23-1,89 [m, 60H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NH₂]; 1,95-2,02 [m, 4H; -CH₂CH=CHCH₂-]; 2,53-2,59 [m, 6H; -CH₂N(CH₂CH₂NH₂)₂]; 2,67-2,77 [m, 6H; 3×-CH₂NH₂]; 3,06-3,36 [m, 5H; 2×-CH₂NHCO-, -COCH(Hexadecyl)CO-]; 4,30-4,34 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 5,32-5,37 [m, 2H; -CH=CH-]; 6,73-6,75/7,44-7,46/8,19-8,32 [3×m, 3H; 3×-NHCO-]

Anhang

¹³C-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 125 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 14,1; 22,7; 22,8; 26,9; 27,2; 27,6; 29,27; 29,34; 29,38; 29,45; 29,49; 29,5; 29,6; 29,7; 29,8; 31,6; 31,9; 32,3; 32,8; 38,0; 39,55; 39,58; 41,6; 52,9; 53,4; 54,7; 56,8; 129,7; 129,9; 130,2; 130,4; 170,7; 170,2; 170,3

THM-IV (8g):

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 0,83 [d, ³J(H,H) = 6,6 Hz, 3H; -CH(CH₂)₂CH₃]; 0,88 [t, ³J(H,H) = 7,0 Hz, 6H; 2×-CH₃]; 1,06-1,89 [m, 59H; -CH₂-Alkyl, -CH(CH₂)₂CH₃, -(CH₂)₃CH₂NH₂]; 2,51-2,61 [m, 6H; -CH₂N(CH₂CH₂NH₂)₂]; 2,68-2,80 [m, 6H; 3×-CH₂NH₂]; 3,09-3,40 [m, 5H; 2×-CH₂NHCO-, -COCH(Tetradecyl)CO-]; 4,33-4,39 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 6,79-6,80/7,45-7,49/8,21-8,35 [3×m, 3H; 3×-NHCO-]

¹³C-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 125 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 14,7; 19,7; 22,7; 22,8; 26,9; 27,0; 27,1; 27,6; 29,3; 29,4; 29,5; 29,6; 29,7; 30,0; 31,6; 31,9; 32,2; 32,7; 37,1; 38,0; 39,5; 41,6; 41,7; 52,9; 53,3; 53,4; 54,5; 54,6; 56,7; 56,9; 170,2; 170,7; 171,2; 171,3; 171,5

DiTT-IV (8h):

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 0,87 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 9H; 3×-CH₃]; 1,13-1,94 [m, 82H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NH₂]; 2,57-2,65 [m, 6H; -CH₂N(CH₂CH₂NH₂)₂]; 2,72-2,80 [m, 2H; Lysin-CH₂NH₂]; 2,85 [t, ³J(H,H) = 5,1 Hz, 4H; 2×-CH₂NH₂]; 3,12-3,39 [m, 4H; 2×-CH₂NHCO-]; 4,58-4,62 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 7,63 [t, ³J(H,H) = 5,2 Hz, 1H; -NHCO-]; 7,37 [d, ³J(H,H) = 7,5 Hz, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 8,46 [t, ³J(H,H) = 4,4 Hz, 1H; -NHCO-]

¹³C-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 125 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 14,1; 22,7; 24,98; 25,04; 27,0; 29,3; 29,48; 29,51; 29,52; 29,64; 29,65; 29,7; 29,89; 29,90; 30,8; 31,9; 32,3; 36,6; 37,3; 37,4; 39,1; 39,6; 40,8; 52,6; 53,9; 55,0; 57,3; 171,4; 172,5; 174,5

Verbindung 9c:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 0,86 [t, ³J(H,H) = 6,7 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,25-1,86 [m, 128H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHCO-, 3×-(CH₂)₃CH₂NHBOC, 6×-OC(CH₃)₃]; 1,89-1,99 [m, 8H; 2×-CH₂CH=CHCH₂-]; 2,38-2,65 [m, 6H; -CH₂N(CH₂CH₂NHCO-)]; 2,93-3,58 [m, 17H; 3×-CH₂NHBOC, 5×-CH₂NHCO-, -COCH(Oleyl)CO-]; 4,05-4,45 [m, 3H; 3×-COCH(NHBOC)CH₂-]; 4,46-4,53 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,71-4,99 [m, 3H; 3×-NHBOC{ε}]; 5,26-5,36 [m, 4H; 2×-CH=CH-]; 5,46-5,64 [m, 3H; 3×-NHBOC{α}]; 6,13-6,22/6,65-6,66/6,98-6,99/7,39-7,68 [4×m, 5H; 5×-NHCO-]; 8,06-8,17 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]

Verbindung 9f:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,23-1,92 [m, 132H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHCO-, 3×-(CH₂)₃CH₂NHBOC, 6×-OC(CH₃)₃]; 1,96-2,02 [m, 4H; -CH₂CH=CHCH₂-]; 2,39-2,67 [m, 6H; -CH₂N(CH₂CH₂NHCO-)]; 2,92-3,60 [m, 17H; 3×-CH₂NHBOC, 5×-CH₂NHCO-, -COCH(Hexadecyl)CO-]; 4,21-4,47 [m, 3H; 3×-COCH(NHBOC)CH₂-]; 4,54-4,56 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,75-4,99 [m, 3H; 3×-NHBOC{ε}]; 5,33-5,38 [m, 2H; -CH=CH-]; 5,49-5,64 [m, 3H; 3×-NHBOC{α}]; 6,15-6,21/7,63-7,70/8,08-8,20 [3×m, 6H; 6×-NHCO]

Verbindung 9h:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 0,87 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 9H; 3×-(CH₂)₂CH₃]; 1,10-2,01 [m, 154H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHCO-, 3×-(CH₂)₃CH₂NHBOC, 6×-OC(CH₃)₃]; 2,50-2,57 [m, 6H; -CH₂N(CH₂CH₂NHCO-)]; 3,07-3,45 [m, 16H; 3×-CH₂NHBOC, 5×-CH₂NHCO-]; 4,05-4,25 [m, 3H; 3×-COCH(NHBOC)CH₂-]; 4,48-4,49 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,72-4,98 [m, 3H; 3×-NHBOC{ε}]; 5,38-5,58 [m, 3H; 3×-NHBOC{α}]; 6,67/7,18/7,37/7,95/8,36 [5×s, 6H; 6×-NHCO]

OO-VI:

¹H-NMR: Lösungsmittel: D₂O Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,83-0,84 [m, 6H; 2×-CH₃]; 1,25-1,80 [m, 74H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHCO-, 3×-(CH₂)₃CH₂NH₂]; 1,92-1,99 [m, 8H; 2×-CH₂CH=CHCH₂-]; 2,64-2,68 [m, 6H; -CH₂N(CH₂CH₂NHCO-)₂]; 2,72-2,75 [m, 6H; 3×-CH₂NH₂]; 2,99-3,36 [m, 14H; 5×-CH₂NHCO-, 3×-COCHNH₂CH₂-, -COCH(Oleyl)CO-]; 4,31-4,37 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 5,26-5,33 [m, 4H; 2×-CH=CH-]

¹³C-NMR: Lösungsmittel: D₂O Messfrequenz: 125 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 13,9; 22,2; 22,6; 27,1; 17,3; 28,3; 29,4; 29,6; 29,7; 29,8; 31,9; 32,7; 34,2; 36,7; 38,9; 39,2; 39,9; 40,0; 52,6; 52,8; 52,9; 54,5; 129,4; 129,6; 129,9; 130,0; 170,8; 177,0; 177,2; 177,3

HO-VI:

¹H-NMR: Lösungsmittel: D₂O Messfrequenz: 500 MHz T: 70 °C
 δ[ppm]= 0,79-0,81 [m, 6H; 2×-CH₃]; 1,23-1,86 [m, 78H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHCO-, 3×-(CH₂)₃CH₂NH₂]; 1,90-1,96 [m, 4H, -CH₂CH=CHCH₂-]; 2,64-2,67 [m, 6H; -CH₂N(CH₂CH₂NHCO-)₂]; 2,72-2,76 [m, 6H; 3×-CH₂NH₂]; 2,99-3,36 [m, 14H; 5×-CH₂NHCO-, 3×-COCHNH₂CH₂-, -COCH(Hexadecyl)CO-]; nicht ermittelbar da unter HDO peak [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 5,26-5,31 [m, 2H; -CH=CH-]

¹³C-NMR: Lösungsmittel: D₂O Messfrequenz: 125 MHz T: 70 °C
 δ[ppm]= 14,1; 22,8; 23,4; 23,4; 27,5; 27,6; 28,8; 29,7; 29,9; 30,2; 31,6; 32,2; 34,8; 37,6; 37,9; 39,4; 39,8; 40,7; 53,5; 54,3; 55,1; 128,9; 129,9; 171,5; 173,1; 177,2; 177,9

DiTT-VI:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,87 [m, ³J(H,H) = 6,93 Hz, 9H; 3×-CH₃]; 1,12-1,92 [m, 100H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHCO-, 3×-(CH₂)₃CH₂NH₂]; 2,52-2,58 [m, 6H; -CH₂N(CH₂CH₂NHCO-)₂]; 2,71-2,75 [m, 6H; 3×-CH₂NH₂]; 3,13-3,38 [m, 13H; 5×-CH₂NHCO-, 3×-COCHNH₂CH₂-]; 4,33-4,37 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 7,33/7,56/7,69/8,07 [4×s, 6H; 6×-NHCO-]

¹³C-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃/CD₃OD Messfrequenz: 125 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 13,5; 22,1; 22,4; 22,6; 24,5; 24,6; 26,6; 28,5; 28,9; 29,06; 29,08; 29,2; 29,3; 29,4; 29,5; 31,0; 31,1; 31,3; 31,5; 34,4; 36,06; 36,14; 36,9; 37,3; 38,4; 39,2; 40,4; 40,5; 52,8; 53,2; 53,3; 54,3; 54,4; 56,8; 171,5; 173,3; 173,6; 175,5; 175,7

Verbindung 10c:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,86 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,25-1,89 [m, 113H; -CH₂-Alkyl, 3×-(CH₂)₃CH₂NHBOC, 5×-OC(CH₃)₃]; 1,94-1,99 [m, 8H; 2×-CH₂CH=CHCH₂-]; 2,45-2,55 [m, 6H; -CH₂N(CH₂CH₂NHCO-)₂]; 3,06-3,28 [m, 15H; 3×-CH₂NHBOC, 4×-CH₂NHCO-, -COCH(Oleyl)CO-]; 4,18-4,30 [m, 2H; 2×-COCH(NHBOC)CH₂-]; 4,40-4,41 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,82-5,17 [m, 3H; 3×-NHBOC{ε}]; 5,32-5,36 [m, 4H; 2×-CH=CH-]; 5,59-5,66 [m, 2H; 2×-NHBOC{α}]; 6,75-6,77/7,08-7,11/7,35-7,71 [3×m, 5H; 5×-NHCO-]

Verbindung 10f:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,24-1,90 [m, 117H; -CH₂-Alkyl, 3×-(CH₂)₃CH₂NHBOC, 5×-OC(CH₃)₃]; 1,95-2,02 [m, 4H; -CH₂CH=CHCH₂-]; 2,45-2,58 [m, 6H; -CH₂N(CH₂CH₂NHCO-)₂]; 3,07-3,34 [m, 15H; 3×-CH₂NHBOC, 4×-CH₂NHCO-, -COCH(Hexadecyl)CO-]; 4,18-4,31 [m, 2H; 2×-COCH(NHBOC)CH₂-]; 4,40-4,42 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,79-5,16 [m, 3H; 3×-NHBOC{ε}]; 5,33-5,38 [m, 2H; -CH=CH-]; 5,57-5,59 [m, 2H; 2×-NHBOC{α}]; 6,69-6,71/7,48-7,55/7,70-7,72 [3×m, 5H; 5×-NHCO-]

OO-VIII:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-CH₃]; 1,27-1,87 [m, 68H; -CH₂-Alkyl, 3×-(CH₂)₃CH₂NH₂]; 1,94-2,01 [m, 8H; 2×-CH₂CH=CHCH₂-]; 2,49-2,60 [m, 6H; -CH₂N(CH₂CH₂NHCO-)₂]; 2,67-2,75 [m, 6H; 3×-CH₂NH₂]; 3,10-3,37 [m, 11H; 4×-CH₂NHCO-, 2×-COCHNH₂CH₂-, -COCH(Oleyl)CO-]; 4,30-4,34 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 5,34-5,36 [m, 4H; 2×-CH=CH-]; 7,20-7,22/7,69-7,71/7,85-7,87 [3×m, 4H; 4×-NHCO-], 7,56-7,58 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]

¹³C-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃/CD₃OD Messfrequenz: 125 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 13,9; 22,48; 22,55; 22,59; 22,7; 26,8; 27,0; 27,3; 27,4; 29,0; 29,13; 29,17; 29,23; 29,26; 29,33; 29,35; 29,41; 29,44; 29,47; 29,52; 29,57; 29,60; 29,64; 31,3; 31,57; 31,59; 31,62; 31,69; 31,71; 31,77; 31,83; 32,0; 32,4; 34,7; 34,8; 37,20; 37,23; 37,4; 37,5; 39,4; 40,75; 40,80; 40,84; 53,1; 53,73; 53,74; 53,9; 54,0; 54,6; 54,7; 129,6; 129,8; 130,2; 130,3; 170,6; 170,9; 171,0; 171,3; 171,5; 171,6; 175,7; 175,8; 175,9; 177,0

HO-VIII:

¹H-NMR: Lösungsmittel: D₂O Messfrequenz: 500 MHz T: 50 °C
 δ[ppm]= 0,85-0,86 [m, 6H; 2×-CH₃]; 1,26-1,95 [m, 72H; -CH₂-Alkyl, 3×-(CH₂)₃CH₂NH₂]; 1,98-2,01 [m, 4H; -CH₂CH=CHCH₂-]; 2,73-2,81 [m, 6H; -CH₂N(CH₂CH₂NHCO-)₂]; 3,02-3,07 [m, 6H; 3×-CH₂NH₂]; 3,13-3,47 [m, 9H; 4×-CH₂NHCO-, -COCH(Hexadecyl)CO-]; 3,98 [t, ³J(H,H) = 6,6 Hz, 2H; 2×-COCHNH₂CH₂-]; 4,31-4,35 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 5,32-5,36 [m, 2H; -CH=CH-]

¹³C-NMR: Lösungsmittel: D₂O Messfrequenz: 125 MHz T: 50 °C
 δ[ppm]= 14,0; 21,8; 22,5; 22,6; 22,8; 26,6; 27,2; 27,4; 27,5; 29,5; 29,6; 29,8; 30,0; 30,1; 31,1; 31,2; 32,1; 37,2; 37,3; 37,4; 39,5; 39,7; 50,0; 52,6; 52,9; 53,7; 129,8; 129,9; 170,8; 170,9; 171,3; 171,6; 172,2; 172,3; 176,0

Verbindung 11b:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,87 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,23-1,84 [m, 65H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHBOC -OC(CH₃)₃]; 1,98-2,02 [m, 4H; -CH₂CH=CHCH₂-]; 2,89-2,90 [m, 2H; -CH₂NH₂]; 3,06-3,42 [m, 7H; -CH₂NHBOC, 2×-CH₂NHCO-, -COCH(Tetradecyl)CO-]; 4,28-4,37 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,82-4,84 [m, 1H; -NHBOC]; 5,30-5,37 [m, 2H; -CH=CH-]; 7,35-7,44 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 6,59-6,69/7,47-7,67 [2×m, 2H; 2×-NHCO-]

Verbindung 11c:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,27-1,86 [m, 65H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHBOC -OC(CH₃)₃]; 1,95-2,01 [m, 4H; 2×-CH₂CH=CHCH₂-]; 2,87-2,90 [m, 2H; -CH₂NH₂]; 3,04-3,43 [m, 7H; -CH₂NHBOC, 2×-CH₂NHCO-, -COCH(Oleyl)CO-]; 4,28-4,34 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,74 [s, 1H; -NHBOC]; 5,30-5,38 [m, 4H; 2×-CH=CH-]; 7,07-7,20 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 6,31-6,40/7,44-7,45 [2×m, 2H; 2×-NHCO-]

Verbindung 11f:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,8 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,24-1,84 [m, 69H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHBOC -OC(CH₃)₃]; 1,95-2,01 [m, 4H; -CH₂CH=CHCH₂-]; 2,86-2,87 [m, 2H; -CH₂NH₂]; 3,05-3,42 [m, 7H; -CH₂NHBOC, 2×-CH₂NHCO-, -COCH(Hexadecyl)CO-]; 4,29-4,36 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,77-4,80 [m, 1H; -NHBOC]; 5,30-5,37 [m, 2H; -CH=CH-]; 7,29-7,30 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 6,44-6,53/7,52-7,57 [2×m, 2H; 2×-NHCO-]

Verbindung 11g:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,83 [d, ³J(H,H) = 6,6 Hz, 3H; -CH(CH₂)₂CH₃]; 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,5 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,06-1,85 [m, 70H; -CH₂-Alkyl, -CH(CH₂)₂CH₃, -(CH₂)₃CH₂NHBOC, -OC(CH₃)₃]; 2,91-3,46 [m, 9H; -CH₂NH₂, 2×-CH₂NHCO-, -CH₂NHBOC, -COCH(Tetradecyl)CO-]; 4,28-4,34 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,78 [s, 1H; -NHBOC]; 7,32-7,46 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 6,44-6,55/7,64-7,74 [2×m, 2H; 2×-NHCO-]

RTO-X (12b):

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,8 Hz, 6H; 2×-CH₃]; 1,25-1,84 [m, 56H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NH₂]; 1,99-2,01 [m, 4H; -CH₂CH=CHCH₂-]; 2,75-2,89 [m, 4H; 2×-CH₂NH₂]; 3,12-3,41 [m, 5H; -COCH(Tetradecyl)CO-, 2×-CH₂NHCO-]; 4,32-4,39 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 5,31-5,37 [m, 2H; -CH=CH-]; 6,64-6,73 [m, 1H; Oleyl-NHCO-]; 7,31-7,43 [m, 1H; -NHCH₂CH₂NH₂]; 7,54-7,68 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]

¹³C-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 125 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 14,1; 22,7; 27,0; 27,2; 27,6; 29,3; 29,5; 29,7; 31,5; 31,9; 39,6; 41,0; 41,7; 53,4; 129,7; 130,0; 171,0; 171,2; 171,3

OO-X (12c):

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,8 Hz, 6H; 2×-CH₃]; 1,26-1,90 [m, 56H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NH₂]; 1,95-2,01 [m, 8H; 2×-CH₂CH=CHCH₂-]; 2,71 [t, ³J(H,H) = 6,5 Hz, 2H; -(CH₂)₃CH₂NH₂]; 2,82 [t, ³J(H,H) = 6,0 Hz, 2H; -NHCH₂CH₂NH₂]; 3,05 [t, ³J(H,H) = 7,4 Hz, 1H; -COCH(Oleyl)CO-]; 3,14-3,36 [m, 4H; 2×-CH₂NHCO-]; 4,31-4,35 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 5,31-5,37 [m, 4H; 2×-CH=CH-]; 6,43-6,45 [m, 1H; Oleyl-NHCO-]; 7,02-7,03 [m, 1H; -NHCH₂CH₂NH₂]; 7,33 [d, ³J(H,H) = 7,7 Hz, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]

¹³C-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 125 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 14,1; 22,6; 22,7; 26,9; 27,2; 27,6; 29,17; 29,28; 29,29; 29,38; 29,39; 29,48; 29,58; 29,63; 29,68; 29,71; 31,5; 31,7; 31,9; 32,1; 32,3; 32,5; 32,6; 39,6; 41,2; 41,4; 41,5; 42,1; 53,4; 55,0; 129,7; 129,9; 130,2; 130,4; 170,8; 171,1; 171,2

HO-X (12f):

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,87 [t, ³J(H,H) = 6,8 Hz, 6H; 2×-CH₃]; 1,25-1,86 [m, 60H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NH₂]; 1,95-2,01 [m, 4H; -CH₂CH=CHCH₂-]; 2,70 [t, ³J(H,H) = 6,4 Hz, 2H; -(CH₂)₃CH₂NH₂]; 2,82 [t, ³J(H,H) = 5,7 Hz, 2H; -NHCH₂CH₂NH₂]; 3,07 [t, ³J(H,H) = 7,4 Hz, 1H; -COCH(Hexadecyl)CO-]; 3,16-3,35 [m, 4H; 2×-CH₂NHCO-]; 4,29-4,34 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 5,34-5,37 [m, 2H; -CH=CH-]; 6,56 [s, 1H; Oleyl-NHCO-]; 7,15 [s, 1H; -NHCH₂CH₂NH₂]; 7,49 [s, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]

¹³C-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 125 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 14,1; 22,7; 26,9; 27,2; 27,6; 29,3; 29,4; 29,5; 29,66; 29,70; 31,5; 31,6; 31,9; 32,2; 32,4; 32,6; 39,6; 41,2; 41,3; 41,4; 42,1; 53,4; 53,5; 54,8; 55,1; 129,7; 130,0; 170,9; 171,1; 171,2

THM-X (12g):

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,83 [d, ³J(H,H) = 6,6 Hz, 3H; -CH(CH₂)₂CH₃]; 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,6 Hz, 6H; 2×-CH₃]; 1,06-1,85 [m, 59H; -CH₂-Alkyl, -CH(CH₂)₂CH₃, -(CH₂)₃CH₂NH₂]; 2,70-2,74 [m, 2H; -(CH₂)₃CH₂NH₂]; 2,83 [t, ³J(H,H) = 5,8 Hz, 2H; -NHCH₂CH₂NH₂]; 3,08-3,36 [m, 5H; -COCH(Tetradecyl)CO-, 2×-CH₂NHCO-]; 4,29-4,36 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 6,56-6,57 [m, 1H; Tetradecyl-NHCO-]; 7,15-7,19 [m, 1H; -NHCH₂CH₂NH₂]; 7,46-7,48 [d, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]

¹³C-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃/CD₃OD Messfrequenz: 125 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 13,5; 19,2; 22,27; 22,32; 22,4; 26,5; 26,6; 26,7; 27,1; 27,2; 28,88; 28,96; 28,99; 29,1; 29,23; 29,26; 29,29; 29,6; 30,36; 30,42; 30,8; 30,9; 31,2; 31,3; 31,5; 31,6; 32,4; 36,7; 39,2; 40,25; 40,31; 40,36; 40,44; 41,4; 41,5; 49,2; 52,9; 53,1; 53,5; 53,8; 170,8; 170,9; 171,2; 171,3; 171,6; 171,8

Verbindung 13c:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,8 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,26-1,83 [m, 104H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHCO-, 2×-(CH₂)₃CH₂NHBOC, 4×-OC(CH₃)₃]; 1,95-2,01 [m, 8H; 2×-CH₂CH=CHCH₂-]; 3,10-3,43 [m, 13H; 2×-CH₂NHBOC, 4×-CH₂NHCO-, -COCH(Oleyl)CO-]; 4,06-4,07 [m, 2H; 2×-COCH(NHBOC)CH₂-]; 4,29-4,34 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,72-4,88 [m, 2H; 2×-NHBOC{ε}]; 5,34-5,40 [m, 4H; 2×-CH=CH-]; 5,52-5,68 [m, 2H; 2×-NHBOC{α}]; 6,56-6,78/7,08-7,21/7,31-7,52 [3×m, 5H; 5×-NHCO-]

Verbindung 13f:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,23-1,84 [m, 108H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHCO-, 2×-(CH₂)₃CH₂NHBOC, 4×-OC(CH₃)₃]; 1,95-2,02 [m, 4H; -CH₂CH=CHCH₂-]; 3,10-3,41 [m, 13H; 2×-CH₂NHBOC, 4×-CH₂NHCO-, -COCH(Tetradecyl)CO-]; 4,05-4,08 [m, 2H; 2×-COCH(NHBOC)CH₂-]; 4,29-4,35 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,71-4,88 [m, 2H; 2×-NHBOC{ε}]; 5,31-5,39 [m, 2H; -CH=CH-]; 5,41-5,68 [m, 2H; 2×-NHBOC{α}]; 6,55-6,74/7,08-7,17/7,29-7,50 [3×m, 5H; 5×-NHCO-]

OO-XII:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃/CD₃OD Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,83 [t, ³J(H,H) = 6,8 Hz, 6H; 2×-CH₃]; 1,22-1,74 [m, 68H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHCO-, 2×-(CH₂)₃CH₂NH₂]; 1,91-1,97 [m, 8H; 2×-CH₂CH=CHCH₂-]; 2,68-2,74 [m, 4H; 2×-CH₂NH₂]; 3,05-3,41 [m, 11H; 4×-CH₂NHCO-, 2×-COCHNH₂CH₂-, -COCH(Oleyl)CO-]; 4,18-4,22 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 5,29-5,33 [m, 4H; 2×-CH=CH-]

¹³C-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃/CD₃OD Messfrequenz: 125 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 13,5; 22,26; 22,31; 22,34; 22,54; 22,59; 26,6; 26,8; 27,1; 28,3; 28,4; 28,8; 28,9; 29,1; 29,2; 29,3; 29,35; 29,39; 29,6; 30,1; 30,46; 30,51; 30,7; 30,8; 31,2; 31,5; 32,2; 34,24; 34,29; 34,32; 38,2; 38,3; 38,4; 38,6; 38,7; 38,8; 39,2; 39,3; 40,16; 40,28; 40,34; 53,1; 53,2; 54,33; 54,36; 54,42; 129,3; 129,6; 129,8; 130,0; 170,6; 170,7; 170,9; 171,3; 171,8; 172,0; 175,62; 175,65; 175,9; 176,1

HO-XII:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,86 [t, ³J(H,H) = 6,7 Hz, 6H; 2×-CH₃]; 1,24-1,82 [m, 72H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NHCO-, 2×-(CH₂)₃CH₂NH₂]; 1,94-2,00 [m, 4H; -CH₂CH=CHCH₂-]; 2,69-2,70 [m, 4H; 2×-CH₂NH₂]; 3,03-3,43 [m, 11H; -COCH(Hexadecyl)CO-, 4×-CH₂NHCO-, 2×-COCHNH₂CH₂-]; 4,29-4,32 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 5,30-5,36 [m, 2H; -CH=CH-]; 6,88-6,89/7,47-7,50/7,62-7,63/7,74-7,75 [4×m, 5H; 5×-NHCO-]

¹³C-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 125 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 14,1; 22,6; 22,8; 22,9; 27,0; 27,2; 27,6; 29,0; 29,29; 29,34; 29,5; 29,63; 29,69; 29,73; 31,2; 31,5; 31,9; 32,6; 32,9; 33,06; 33,11; 34,87; 34,94; 34,98; 38,2; 38,3; 38,8; 39,0; 39,6; 39,7; 41,6; 41,7; 41,8; 53,2; 53,3; 54,4; 54,7; 55,1; 129,7; 129,9; 130,2; 130,4; 170,95; 171,04; 171,1; 171,3; 171,4; 171,5; 175,4; 176,2; 176,3

Verbindung 14b:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,23-1,87 [m, 89H; -CH₂-Alkyl, 2×-(CH₂)₃CH₂NHBOC, 3×-OC(CH₃)₃]; 1,99-2,02 [m, 4H; -CH₂CH=CHCH₂-]; 3,03-3,52 [m, 11H; 2×-CH₂NHBOC, 3×-CH₂NHCO-, -COCH(Tetradecyl)CO-]; 4,06-4,07 [m, 1H; -COCH(NHBOC)CH₂-]; 4,28-4,35 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,72-4,80 [m, 2H; 2×-NHBOC{ε}]; 5,30-5,38 [m, 2H; -CH=CH-]; 5,42-5,43 [m, 1H; -NHBOC{α}]; 6,59-6,78/7,17-7,19/7,45-7,47/7,59-7,61 [4×m, 4H; 4×-NHCO-]

Verbindung 14c:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,86 [t, ³J(H,H) = 6,8 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,25-1,83 [m, 89H; -CH₂-Alkyl, 2×-(CH₂)₃CH₂NHBOC, 3×-OC(CH₃)₃]; 1,94-1,99 [m, 8H; 2×-CH₂CH=CHCH₂-]; 3,01-3,48 [m, 11H; 2×-CH₂NHBOC, 3×-CH₂NHCO-, -COCH(Oleyl)CO-]; 4,05-4,07 [m, 1H; -COCH(NHBOC)CH₂-]; 4,31-4,35 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-];

4,79-4,85 [m, 2H; 2×-NHBOC{ε}]; 5,32-5,39 [m, 4H; 2×-CH=CH-]; 5,52-5,53 [m, 1H; -NHBOC{α}]; 6,83-6,84/7,00-7,01/7,32-7,33/7,57-7,60 [4×m, 4H; 4×-NHCO-]

Verbindung 14f:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,24-1,86 [m, 93H; -CH₂-Alkyl, 2×-(CH₂)₃CH₂NHBOC, 3×-OC(CH₃)₃]; 1,96-2,03 [m, 4H; -CH₂CH=CHCH₂-]; 3,05-3,49 [m, 11H; 2×-CH₂NHBOC, 3×-CH₂NHCO-, -COCH(Hexadecyl)CO-]; 4,03-4,07 [m, 1H; -COCH(NHBOC)CH₂-]; 4,27-4,33 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,69-4,81 [m, 2H; 2×-NHBOC{ε}]; 5,33-5,39 [m, 2H; -CH=CH-]; 5,40-5,41 [m, 1H; -NHBOC{α}]; 6,40-6,44/6,87-6,88/7,03-7,06/7,39-7,48 [4×m, 4H; 4×-NHCO-]

Verbindung 14g:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,83 [d, ³J(H,H) = 6,6 Hz, 3H; -CH(CH₂)₂CH₃]; 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,5 Hz, 6H; 2×-(CH₂)₂CH₃]; 1,06-1,87 [m, 92H; -CH₂-Alkyl, -CH(CH₂)₂CH₃, 2×-(CH₂)₃CH₂NHBOC, 3×-OC(CH₃)₃]; 3,03-3,51 [m, 11H; 2×-CH₂NHBOC, 3×-CH₂NHCO-, -COCH(Tetradecyl)CO-]; 4,06-4,07 [m, 1H; -COCH(NHBOC)CH₂-]; 4,30-4,35 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 4,75-4,83 [m, 2H; 2×-NHBOC{ε}]; 6,70-6,77 [m, 1H; -NHBOC{α}]; 7,02-7,08/7,50-7,52/7,62-7,65 [3×m, 4H; 4×-NHCO-]

RTO-XIV:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-CH₃]; 1,24-1,86 [m, 62H; -CH₂-Alkyl, 2×-(CH₂)₃CH₂NH₂]; 1,99-2,02 [m, 4H; -CH₂CH=CHCH₂-]; 2,69-2,74 [m, 4H; 2×-CH₂NH₂]; 3,01 [m, ³J(H,H) = 7,5 Hz, 1H; -COCH(Tetradecyl)CO-]; 3,15-3,47 [m, 7H; 3×-CH₂NHCO-, -COCHNH₂CH₂-]; 4,27-4,31 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 5,31-5,38 [m, 2H; -CH=CH-]; 6,56-6,58/7,61-7,63/7,73-7,75 [3×m, 3H; 3×-NHCO-]; 7,29 [d, ³J(H,H) = 7,3 Hz, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]

¹³C-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃/CD₃OD Messfrequenz: 125 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 13,9; 22,52; 22,59; 22,66; 22,72; 29,16; 29,20; 29,4; 29,50; 29,54; 29,6; 31,4; 31,6; 31,76; 31,82; 31,9; 32,2; 34,65; 34,72; 38,6; 38,8; 38,9; 39,1; 39,4; 40,9; 41,0; 53,1; 53,2; 54,8; 129,6; 129,8; 170,9; 171,0; 171,5; 171,6; 171,8; 176,0; 176,2

OO-XIV:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-CH₃]; 1,27-1,87 [m, 62H; -CH₂-Alkyl, 2×-(CH₂)₃CH₂NH₂]; 1,96-2,01 [m, 8H; 2×-CH₂CH=CHCH₂-]; 2,70-2,76 [m, 4H; 2×-CH₂NH₂]; 3,01 [m, ³J(H,H) = 7,1 Hz, 1H; -COCH(Oleyl)CO-]; 3,16-3,48 [m, 7H; 3×-CH₂NHCO-, -COCHNH₂CH₂-]; 4,26-4,31 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 5,34-5,38 [m, 4H; 2×-CH=CH-]; 6,53-6,55/7,66-7,68/7,60-7,74 [3×m, 3H; 3×-NHCO-]; 7,31-7,36 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]

¹³C-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃/CD₃OD Messfrequenz: 125 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 13,5; 22,1; 22,26; 22,33; 26,6; 26,8; 27,1; 28,8; 28,9; 29,1; 29,30; 29,35; 29,39; 29,6; 29,7; 30,4; 30,5; 31,1; 31,2; 31,5; 32,2; 34,2; 38,5; 38,7; 39,2; 39,3; 39,88; 39,92; 40,0; 53,0; 53,2; 53,6; 54,2; 54,3; 129,3; 129,6; 129,8; 130,0; 170,7; 171,2; 171,8; 172,0; 175,9; 176,0

HO-XIV:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,87 [t, ³J(H,H) = 6,8 Hz, 6H; 2×-CH₃]; 1,23-1,83 [m, 66H; -CH₂-Alkyl, 2×-(CH₂)₃CH₂NH₂]; 1,95-2,02 [m, 4H; -CH₂CH=CHCH₂-]; 2,68-2,73 [m, 4H; 2×-CH₂NH₂]; 3,02 [m, ³J(H,H) = 7,4 Hz, 1H; -COCH(Hexadecyl)CO-]; 3,13-3,44 [m, 7H; 3×-CH₂NHCO-, -COCHNH₂CH₂-]; 4,28-4,32 [m, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 5,32-5,37 [m, 2H; -CH=CH-]; 6,70/7,69/7,74 [3×s, 3H; 3×-NHCO-]; 7,39 [d, ³J(H,H) = 6,8 Hz, 1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]

Anhang

¹³C-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 125 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 14,1; 22,7; 22,8; 22,9; 27,0; 27,2; 27,6; 29,28; 29,34; 29,5; 29,6; 29,7; 29,8; 31,8; 31,9; 32,0; 32,6;
32,8; 34,9; 38,7; 39,6; 40,0; 41,57; 41,64; 53,4; 54,9; 55,0; 129,7; 130,0; 130,2; 130,4; 170,8; 171,39; 171,41;
176,3

THM-XIV:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 0,88 [d, ³J(H,H) = 6,6 Hz, 3H; -CH(CH₂)₂CH₃]; 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,7 Hz, 6H; 2×-CH₃]; 1,06-1,84
[m, 65H; -CH₂-Alkyl, -CH(CH₂)₂CH₃, 2×-(CH₂)₃CH₂NH₂]; 2,70-2,74 [m, 4H; 2×-CH₂NH₂]; 3,00 [m, ³J(H,H)
= 6,5 Hz, 1H; -COCH(Tetradecyl)CO-]; 3,17-3,49 [m, 7H; 3×-CH₂NHCO-, -COCHNH₂CH₂-]; 4,27-4,31 [m,
1H; -COCH(NHCO-)CH₂-]; 6,52/7,23/7,60/7,74 [4×s, 4H; 4×-NHCO-]

¹³C-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 125 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 14,1; 19,7; 22,7; 22,8; 22,9; 26,96; 27,05; 27,12; 27,7; 29,35; 29,44; 29,5; 29,6; 29,7; 30,0; 31,8; 32,0;
32,1; 32,8; 34,9; 37,1; 38,6; 39,6; 40,1; 41,7; 53,4; 54,9; 55,0; 170,8; 171,36; 171,41; 176,4

Verbindung 15b:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,8 Hz, 6H; 2×-CH₃]; 1,25-1,29 [m, 50H; -CH₂-Alkyl]; 1,51-1,55 [m, 2H;
-CH₂CH₂CH₂NHCO-]; 1,85-1,97 [m, 2H; -CH₂CH(CONH-)₂]; 1,99-2,02 [m, 4H; -CH₂CH=CHCH₂-]; 3,17
[t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 1H; -COCH(Hexadecyl)CO-]; 3,23-3,36 [m, 2H; -CH₂NHCO-]; 5,32-5,37 [m, 2H;
-CH=CH-]; 6,29 [t, ³J(H,H) = 5,4 Hz, 1H; -NHCO-]

Verbindung 16b:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,8 Hz, 6H; 2×-CH₃]; 1,24-1,28 [m, 50H; -CH₂-Alkyl]; 1,47-1,51 [m, 2H;
-CH₂CH₂CH₂NHCO-]; 1,82-1,87 [m, 2H; -CH₂CH(CONH-)₂]; 1,96-2,03 [m, 4H; -CH₂CH=CHCH₂-]; 2,84
[t, ³J(H,H) = 5,9 Hz, 1H; -CH₂NH₂]; 2,94 [t, ³J(H,H) = 7,4 Hz, 1H; -COCH(Hexadecyl)CO-]; 3,20-3,35 [m, 4H;
2×-CH₂NHCO-]; 5,30-5,39 [m, 2H; -CH=CH-]; 6,61 [t, ³J(H,H) = 5,4 Hz, 1H; -NHCO-]; 6,98 [t, ³J(H,H) =
5,2 Hz, 1H; -NHCO-]

Lipid XVp:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 0,87 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-CH₃]; 1,23-1,81 [m, 60H; -CH₂-Alkyl, -(CH₂)₃CH₂NH₂]; 1,98-2,02
[m, 4H; -CH₂CH=CHCH₂-]; 2,72 [t, ³J(H,H) = 6,7 Hz, 2H; -CH₂NH₂]; 2,92 [t, ³J(H,H) = 7,5 Hz, 1H;
-COCH(Hexadecyl)CO-]; 3,18-3,41 [m, 7H; 3×-CH₂NHCO-, -COCHNH₂CH₂-]; 5,30-5,37 [m, 2H; -CH=CH-];
6,89-6,93/7,53-7,55/7,63-7,64 [3×m, 3H; 3×-NHCO-]

¹³C-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃/CD₃OD Messfrequenz: 125 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 14,1; 22,6; 22,8; 22,9; 26,9; 27,2; 27,6; 27,7; 29,25; 29,30; 29,34; 29,40; 29,42; 29,46; 29,58; 29,60;
29,64; 29,69; 29,75; 31,88; 31,91; 32,7; 32,8; 32,9; 34,7; 34,8; 38,9; 39,0; 39,6; 39,9; 41,6; 41,7; 55,1; 129,7;
129,9; 170,7; 171,9; 172,0; 176,0; 176,6

Verbindung 18:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 1,95 [s, 3H; -OCOCH₃]; 2,02 [s, 3H; -OCOCH₃]; 2,04 [s, 3H; -OCOCH₃]; 2,12 [s, 3H; -OCOCH₃];
2,45 [t, ⁴J(H,H) = 2,4 Hz, 1H; -C≡CH]; 3,90 [dt, ³J₁(H,H) = 6,7 Hz ³J₂(H,H) = 1,1 Hz, 1H; **H5**-Galactose]; 4,08-
4,16 [m, 2H; **H6**-Galactose]; 4,35 [d, ⁴J(H,H) = 2,4 Hz, 2H; -CH₂C≡CH]; 4,71 [d, ³J(H,H) = 7,9 Hz, 1H;
H1-Galactose]; 5,03 [dd, ³J₁(H,H) = 10,4 Hz, ³J₂(H,H) = 3,4 Hz, 1H; **H3**-Galactose]; 5,18 [dd, ³J₁(H,H) =
10,4 Hz, ³J₂(H,H) = 7,9 Hz, 1H; **H2**-Galactose]; 5,37 [dd, ³J₁(H,H) = 3,4 Hz, ³J₂(H,H) = 1,0 Hz, 1H; **H4**-
Galactose]

Verbindung 19:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 1,98 [s, 3H; -OCOCH₃]; 2,04 [s, 3H; -OCOCH₃]; 2,06 [s, 3H; -OCOCH₃]; 2,15 [s, 3H; -OCOCH₃]; 3,30 [ddd, ⁴J₁(H,H) = 3,5 Hz, ³J₂(H,H) = 4,6 Hz, ³J₃(H,H) = 13,4 Hz, 1H; -CH₂CHH'N₃]; 3,50 [ddd, ⁴J₁(H,H) = 3,6 Hz, ³J₂(H,H) = 8,5 Hz, ³J₃(H,H) = 13,3 Hz, 1H; -CH₂CHH'N₃]; 3,69 [ddd, ⁴J₁(H,H) = 3,3 Hz, ³J₂(H,H) = 8,4 Hz, ³J₃(H,H) = 10,8 Hz, 1H; -CHH'CH₂N₃]; 4,04 [ddd, ⁴J₁(H,H) = 3,6 Hz, ³J₂(H,H) = 4,7 Hz, ³J₃(H,H) = 10,7 Hz, 1H; -CHH'CH₂N₃]; 3,92 [dt, ³J₁(H,H) = 6,7 Hz, ³J₂(H,H) = 1,0 Hz, 1H; **H5**-Galactose]; 4,12-4,18 [m, 2H; **H6**-Galactose]; 4,55 [d, ³J(H,H) = 8,0 Hz, 1H; **H1**-Galactose]; 5,02 [dd, ³J₁(H,H) = 10,5 Hz, ³J₂(H,H) = 3,4 Hz, 1H; **H3**-Galactose]; 5,23 [dd, ³J₁(H,H) = 10,5 Hz, ³J₂(H,H) = 8,0 Hz, 1H; **H2**-Galactose]; 5,39 [dd, ³J₁(H,H) = 3,4 Hz, ³J₂(H,H) = 1,0 Hz, 1H; **H4**-Galactose]

Verbindung 23a:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 400 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 2,45 [s, 3H; -CH₃]; 3,59-3,72 [m, 14H; HO(CH₂CH₂O)₃CH₂-]; 4,15-4,18 [m, 2H; -CH₂O-Ts]; 7,33-7,35 [m, 2H; *m*-H-Ts], 7,79-7,81 [m, 2H; *o*-H-Ts]

Verbindung 25a:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 400 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 1,39 [s, 9H; OC(CH₃)₃]; 3,37 [t, ³J(H,H) = 5,1 Hz, 2H; N₃CH₂-]; 3,66-3,73 [m, 14H; -O(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂N₃]; 3,94 [s, 2H; -OCH₂COO-]

Verbindung 26:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 400 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 1,46 [s, 9H; OC(CH₃)₃]; 2,86 [t, ³J(H,H) = 5,2 Hz, 2H; NH₂CH₂-]; 3,51 [t, ³J(H,H) = 5,2 Hz, 2H; NH₂CH₂CH₂-]; 3,60-3,70 [m, 12H; -O(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂NH₂]; 4,00 [s, 2H; -OCH₂COO-]

Verbindung 28:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,87 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-CH₃]; 1,24-1,30 [m, 46H; -CH₂-Alkyl]; 1,43-1,48 [m, 2H; -CH₂CH₂CH₂NHCO-]; 1,80-1,82 [m, 2H; -CH₂CH(CONH-)₂]; 1,94-2,00 [m, 8H; 2×-CH₂CH=CHCH₂-]; 2,92 [t, ³J(H,H) = 7,5 Hz, 1H; -COCH(Oleyl)CO-]; 3,12-3,26 [m, 2H; Alkyl-CH₂NHCO-]; 3,36-3,44 [m, 6H; -NHCO(CH₂)₂NHCO-, -CH₂N₃]; 3,64-3,70 [m, 14H; -O(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂N₃-]; 3,97-3,98 [m, 2H; -OCH₂COO-]; 5,31-5,36 [m, 4H; 2×-CH=CH-]; 6,87/7,27/7,45 [3×s, 3H; -NHCO-]

Verbindung 29:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,87 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-CH₂CH₃]; 1,26-1,49 [m, 48H; -CH₂-Alkyl]; 1,80-1,83 [m, 2H; -CH₂CH(CONH-)₂]; 1,94-2,00 [m, 14H; 2×-CH₂CH=CHCH₂-, 2×-COCH₃]; 2,05 [s, 3H; -COCH₃]; 2,14 [s, 3H; -COCH₃]; 2,92 [t, ³J(H,H) = 7,5 Hz, 1H; -COCH(Oleyl)CO-]; 3,08-3,44 [m, 6H; 3×-CH₂NHCO-]; 3,61-3,65 [m, 12H; -O(CH₂CH₂O)₃-]; 3,87 [t, ³J(H,H) = 5,4 Hz, 2H; -OCH₂CH₂-Triazin]; 3,95 [t, ³J(H,H) = 6,7 Hz, 1H; **H5**-Galactose]; 3,97 [s, 2H; -OCH₂COO-]; 4,10-4,16 [m, 2H; **H6**-Galactose]; 4,49-4,57 [m, 2H; -OCH₂CH₂-Triazin]; 4,67 [d, ³J(H,H) = 8,0 Hz, 1H; **H1**-Galactose]; 4,80 [d, ³J(H,H) = 12,5 Hz, 1H; Triazin-CHH'-Galactose]; 4,95 [d, ³J(H,H) = 12,5 Hz, 1H; Triazin-CHH'-Galactose]; 5,02 [dd, ³J₁(H,H) = 3,4 Hz, ³J₂(H,H) = 10,5 Hz, 1H; **H3**-Galactose]; 5,20 [dd, ³J₁(H,H) = 8,0 Hz, ³J₂(H,H) = 10,4 Hz, 1H; **H2**-Galactose]; 5,33-5,37 [m, 4H; 2×-CH=CH-]; 5,39 [d, ³J(H,H) = 3,2 Hz, 1H; **H4**-Galactose]; 6,79/7,27/7,48 [3×s, 3H; -NHCO-]; 7,70 [s, 1H; **H5**-Triazin]

Verbindung 30:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,88 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-CH₃]; 1,26-1,31 [m, 46H; -CH₂-Alkyl]; 1,48-1,50 [m, 2H; -CH₂CH₂CH₂NHCO-]; 1,80-1,82 [m, 2H; -CH₂CH(CONH-)₂]; 1,95-2,01 [m, 10H; 2×-CH₂CH=CHCH₂-COCH₂CH₂CH₂COOH]; 2,25-2,30 [m, 2H; -COCH₂CH₂CH₂COOH]; 2,40 [t, ³J(H,H) = 6,8 Hz, 2H;

Anhang

-CH₂COOH]; 3,12 [t, ³J(H,H) = 7,6 Hz, 1H; -COCH(Oleyl)CO-]; 3,15-3,28 [m, 2H; -CH₂NHCO-]; 3,33-3,47 [m, 4H; -NHCO(CH₂)₂NHCO-]; 5,32-5,37 [m, 4H; 2×-CH=CH-]; 6,55/7,01/7,58 [3×s, 3H; -NHCO-]

Verbindung 31:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 0,86 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-CH₂CH₃]; 1,25-1,29 [m, 46H; -CH₂-Alkyl]; 1,45-1,48 [m, 11H; -CH₂CH₂CH₂NHCO-, -OC(CH₃)₃]; 1,79-1,80 [m, 2H; -CH₂CH(CONH-)₂]; 1,89-1,99 [m, 10H; 2×-CH₂CH=CHCH₂-, -COCH₂CH₂CH₂CO-]; 2,22 [t, ³J(H,H) = 6,7 Hz, 4H; -COCH₂CH₂CH₂CO-]; 2,98 [t, ³J(H,H) = 7,5 Hz, 1H; -COCH(Oleyl)CO-]; 3,14-3,19 [m, 2H; Alkyl-CH₂NHCO-]; 3,33-3,37 [m, 4H; -NHCO(CH₂)₂NHCO-]; 3,40-3,43 [m, 2H; -NHCOCH₂CH₂O-]; 3,55 [t, ³J(H,H) = 5,1 Hz, 2H; -NHCOCH₂CH₂O-]; 3,60-3,67 [m, 12H; -O(CH₂CH₂O)₃-]; 4,08 [s, 2H; -OCH₂COO-]; 5,32-5,35 [m, 4H; 2×-CH=CH-]; 6,69/6,78/7,04/7,51 [4×s, 4H; -NHCO-]

Verbindung 32:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 0,87 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-CH₃]; 1,25-1,33 [m, 46H; -CH₂-Alkyl]; 1,47-1,49 [m, 2H; -CH₂CH₂CH₂NHCO-]; 1,81-1,82 [m, 2H; -CH₂CH(CONH-)₂]; 1,92-2,01 [m, 10H; 2×-CH₂CH=CHCH₂-, -COCH₂CH₂CH₂CO-]; 2,23 [t, ³J(H,H) = 6,8 Hz, 4H; -COCH₂CH₂CH₂CO-]; 2,46 [t, ⁴J(H,H) = 2,3 Hz, 3H; 3×-C≡CH]; 3,04 [t, ³J(H,H) = 7,1 Hz, 1H; -COCH(Oleyl)CO-]; 3,18-3,22 [m, 2H; Alkyl-CH₂NHCO-]; 3,35-3,39 [m, 4H; -NHCO(CH₂)₂NHCO-]; 3,43-3,44 [m, 2H; -NHCOCH₂CH₂O-]; 3,56 [t, ³J(H,H) = 4,9 Hz, 2H; -NHCOCH₂CH₂O-]; 3,61-3,74 [m, 12H; -O(CH₂CH₂O)₃-]; 3,85 [s, 6H; -C(CH₂O-)₃]; 3,92 [s, 2H; -OCH₂COO-]; 4,14 [d, ⁴J(H,H) = 2,4 Hz, 6H; 3×-CH₂C≡CH]; 5,33-5,36 [m, 4H; 2×-CH=CH-]; 6,83/6,87/7,00/7,09/7,65 [5×s, 5H; 5×-NHCO-]

Verbindung 33:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 0,86 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-CH₂CH₃]; 1,25-1,34 [m, 46H; -CH₂-Alkyl]; 1,46-1,48 [m, 2H; -CH₂CH₂CH₂NHCO-]; 1,80-1,82 [m, 2H; -CH₂CH(CONH-)₂]; 1,96-2,22 [m, 50H; 2×-CH₂CH=CHCH₂-, 12×-COCH₃, -COCH₂CH₂CH₂CO-]; 2,97-2,99 [m, 1H; -COCH(Oleyl)CO-]; 3,18-3,19 [m, 2H; -CH₂CH₂CH₂NHCO-]; 3,34-3,91 [m, 40H; 2×-CH₂NHCO-, -NH(CH₂CH₂O)₄CH₂CO-, 3×H₅-Galactose, -C(CH₂O-)₃, 3×Galactose-CHH'-CH₂-Triazin]; 4,06-4,16 [m, 6H; 3×H₆-Galactose]; 4,23-4,27 [m, 3H; 3×Galactose-CHH'-CH₂-Triazin]; 4,46-4,58 [m, 9H; 3×OCH₂-Triazin, 3×H₁-Galactose]; 4,97-4,98 [m, 3H; 3×H₃-Galactose]; 5,14-5,15 [m, 3H; 3×H₂-Galactose]; 5,31-5,35 [m, 7H; 2×-CH=CH-, 3×H₄-Galactose]; 5,59-5,68/6,83-6,99 [2×m, 4H; 4×-NHCO-]; 7,53-7,63 [m, 3H; 3×H₅-Triazin]

Lipid XVI:

¹H-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 0,87 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-CH₃]; 1,25-1,47 [m, 48H; -CH₂-Alkyl]; 1,74-1,77 [m, 2H; -CH₂CH(CONH-)₂]; 1,94-2,00 [m, 8H; 2×-CH₂CH=CHCH₂-]; 3,06-3,37 [m, 7H; -COCH(Oleyl)CO-, 3×-CH₂NHCO-]; 3,55-3,73 [m, 15H; -O(CH₂CH₂O)₃-, H₂,H₄,H₅-Galactose]; 3,83-3,86 [m, 4H; -OCH₂CH₂-Triazin, H₆-Galactose]; 3,97-4,61 [m, 3H; -OCH₂COO-, H₃-Galactose]; 4,40 [d, ³J(H,H) = 7,3 Hz, 1H; H₁-Galactose]; 4,51-4,53 [m, 2H; -CH₂-Triazin]; 4,78 [d, ²J(H,H) = 12,3 Hz, 1H; Galactose-CHH'-Triazin]; 4,78 [d, ²J(H,H) = 12,5 Hz, 1H; Galactose-CHH'-Triazin]; 5,32-5,36 [m, 4H; 2×-CH=CH-]; 7,19-7,23/7,54-7,57/7,68-7,71 [3×m, 3H; 3×-NHCO-]; 7,92 [s, 1H; H₅-Triazin]

¹³C-NMR: Lösungsmittel: CDCl₃ Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
δ[ppm]= 14,1; 22,6; 27,0; 27,2; 27,5; 29,3; 29,44; 29,49; 29,57; 29,64; 29,68; 29,73; 31,9; 32,6; 38,4; 39,5; 39,6; 45,9; 50,2; 57,9; 61,8; 62,3; 69,1; 69,3; 70,1; 70,2; 70,3; 70,4; 70,5; 70,8; 71,3; 73,6; 74,7; 102,7; 124,6; 129,7; 129,9; 130,2; 130,4; 144,2; 170,9; 171,2; 172,1

Lipid XVII

¹H-NMR: Lösungsmittel: CD₃OD Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 0,90 [t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H; 2×-CH₃]; 1,30-1,32 [m, 46H; -CH₂-Alkyl]; 1,49-1,52 [m, 2H; -CH₂CH₂CH₂NHCO-]; 1,75-1,91 [m, 4H; -CH₂CH(CONH-)₂, -COCH₂CH₂CH₂CO-]; 1,96-2,05 [m, 8H; 2×-CH₂CH=CHCH₂-]; 2,20-2,24 [m, 4H; -COCH₂CH₂CH₂CO-]; 3,09-3,30 [m, 6H; Alkyl-CH₂NHCO-, -NHCO(CH₂)₂NHCO-]; 3,37 [t, ³J(H,H) = 5,5 Hz, 2H; -NHCOCH₂CH₂O-]; 3,47-3,57 [m, 12H; -NHCOCH₂CH₂O-, -COCH(Oleyl)CO-, 3×H₂,H₄,H₅-Galactose]; 3,62-3,65 [m, 12H; -O(CH₂CH₂O)₃-]; 3,70-3,78 [m, 6H; 3×H₆-Galactose]; 3,78 [s, 6H; -C(CH₂O)₃]; 3,83-3,85 [m, 3H; 3×H₃-Galactose]; 3,93 [s, 2H; -OCH₂COO-]; 4,00 [dt, ³J(H,H) = 5,0 Hz ²J(H,H) = 11,6 Hz, 3H; 3×Galactose-CHH'CH₂-Triazin]; 4,24 [dt, ³J(H,H) = 5,0 Hz ²J(H,H) = 11,7 Hz, 3H; 3×Galactose-CHH'CH₂-Triazin]; 4,29 [d, ³J(H,H) = 7,4 Hz, 3H; 3×H₁-Galactose]; 4,57 [s, 6H; 3×-CH₂-Triazin]; 4,64 [t, ³J(H,H) = 5,0 Hz, 6H; 3×Galactose-CH₂CH₂-Triazin]; 5,33-5,39 [m, 4H; 2×-CH=CH-]; 8,11 [s, 3H; 3×H₅-Triazin]

¹³C-NMR: Lösungsmittel: CD₃OD Messfrequenz: 500 MHz T: 27 °C
 δ[ppm]= 13,1; 21,7; 22,3; 26,6; 26,73; 26,76; 27,1; 28,8; 28,92; 28,98; 29,03; 29,15; 29,19; 29,23; 29,35; 29,39; 29,42; 29,48; 30,9; 31,6; 32,2; 34,80; 34,84; 38,5; 38,8; 38,9; 39,1; 50,3; 59,7; 61,2; 63,9; 67,7; 68,0; 68,9; 69,35; 69,37; 69,77; 69,78; 69,83; 69,94; 69,98; 70,39; 70,41; 71,0; 73,5; 75,4; 103,8; 124,9; 129,39; 129,45; 130,05; 130,11; 144,2; 170,8; 171,1; 171,7; 174,0; 174,3

Wölk et al., Chemistry – A European Journal. 2013, 19, 12824-12838.

Im folgenden Abschnitt ist die Veröffentlichung der synthetischen Arbeiten für die Darstellung der Malonamide der 2. Generation (**TO**-, **TT**- und **HT**-Reihe) eingefügt. Sie enthält analytische Daten zu den synthetisierten Zwischen- und Endverbindungen (siehe Verweise in Kap.6.4). Die Abkürzungen der synthetisierten Verbindungen in der Publikation entsprechen nicht den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Abkürzungen. Für die Erklärung der in der Publikation verwendeten Abkürzungen sei hier auf „Figure 1“ sowie „Scheme 1-3“ hingewiesen. Aus den „Supporting Information“ sind nur die für Analytik der Verbindungen relevanten Auszüge abgebildet.

DOI: 10.1002/chem.201204529

General Synthesis and Physicochemical Characterisation of a Series of Peptide-Mimic Lysine-Based Amino-Functionalised Lipids

Christian Wölk,^[a] Simon Drescher,^[a] Annette Meister,^[b] Alfred Blume,^[b]
 Andreas Langner,^[a] and Bodo Dobner^{*,[a]}

Abstract: A series of novel malonic acid diamides (second generation) with two long hydrophobic alkyl chains and an alkaline polar head group was synthesised and characterised as a new class of amino-functionalised lipids. These peptide-mimic lipids are suitable for polynucleotide transfer. The lipids bear a novel backbone consisting of a lysine unit and a malonic acid unit. Six different head-group structures, which

vary in size and number of amino groups that can be protonated, were attached to the backbone structure. Furthermore, different alkyl chains were used to build the lipophilic part (namely tetradecyl, hexadecyl, and

oleyl). Phase transitions of the new compounds in aqueous dispersions at pH 10 were analysed and discussed in terms of head group and alkyl chain variations. The shape and size of the formed aggregates of selected lipid dispersions were investigated by dynamic light scattering and transmission electron microscopy.

Keywords: amides • lipids • phase transitions • self-assembly • synthetic methods

Introduction

Amino-functionalised and cationic lipids offer various applications in the field of medicine. For example, they are used as non-viral nucleic acid delivery systems,^[1] drug-delivery systems for neoplastic diseases^[2] and, more recently, as vaccine carriers or adjuvants.^[3] Furthermore, their use as antimicrobial agents is described.^[4] During the last two decades the application of alkaline or cationic lipids as nucleic acid delivery systems (nucleic acid delivery with lipids is called “lipofection”) gained great importance. Within classical gene therapy, which means the treatment of diseases through the use of DNA-based drugs allowing the delivery of DNA to cells followed by expression of a therapeutic gene, cationic lipids are common and widely used delivery systems besides cationic polymers and viral vectors.^[1a,5] Additionally, the methods of gene silencing using antisense oligonucleotides and siRNA,^[6] respectively, are applications for amino-functionalised lipids. At present, viral vectors are the most-used nucleic acid delivery systems.^[7] However, fundamental problems are associated with viral vector systems,

namely toxicity, immunogenicity and limitations with respect to scale-up procedures.^[8] Due to these disadvantages synthetic chemical vectors became a promising alternative, and the lipid-based vectors are the most-used representatives of this group.^[7,8b,9]

Recently, we reported on a new class of amino-functionalised lipids with a malonic acid diamide structure as backbone and two hydrophobic alkyl chains.^[10] Therein, we varied the hydrophobic molecule part and the head-group region of the lipids with the aim to gain information about structure-function relationships. Within that previous work, some very effective amino-functionalised lipids have been prepared exceeding commercially available synthetic vectors, such as Lipofectamine, in their transfection efficacy. Furthermore, selected lipid-based vectors of these novel cytofectines have been investigated by physicochemical methods, such as X-ray scattering, differential scanning calorimetry (DSC) and Langmuir film balance measurements, which explained the observed structure–activity relationships.^[11]

Herein, we describe the synthesis of a series of malonic acid diamides with a modified backbone (called second generation) based on a malonic acid structure combined with a lysine unit (Figure 1). The hydrophobic part contains two long alkyl chains of variable length and saturation (tetradecyl, hexadecyl, and oleyl chains); the first alkyl chain is bound through an amide bond to the lysine unit and the second one is bound to the α -carbon of the malonic acid unit, thus resulting in a larger distance of the alkyl chains in comparison to the alkyl chains in glycerol-based phospholipids. Due to the complexity of the transfection pathway, no general schemes have emerged correlating the structure of amino-functionalised/cationic lipids with their transfection efficacy and, hence, the approaches for optimising the struc-

[a] Dipl.-Pharm. C. Wölk, Dr. S. Drescher, Prof. Dr. A. Langner, Prof. Dr. B. Dobner
 Institute of Pharmacy, MLU Halle-Wittenberg
 Wolfgang-Langenbeck-Strasse 4, 06120 Halle/Saale (Germany)
 Fax: (+49) 345-55-27018
 E-mail: bodo.dobner@pharmazie.uni-halle.de

[b] Dr. A. Meister, Prof. Dr. A. Blume
 Institute of Chemistry, MLU Halle-Wittenberg
 Von-Danckelmann-Platz 4, 06120 Halle/Saale (Germany)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201204529>. It contains further experimental details and the detailed characterisation of the lipid precursors **9a–c**, **11a–c**, **12a–c**, **13a–c**, **15a–c**, and **16a–c**.

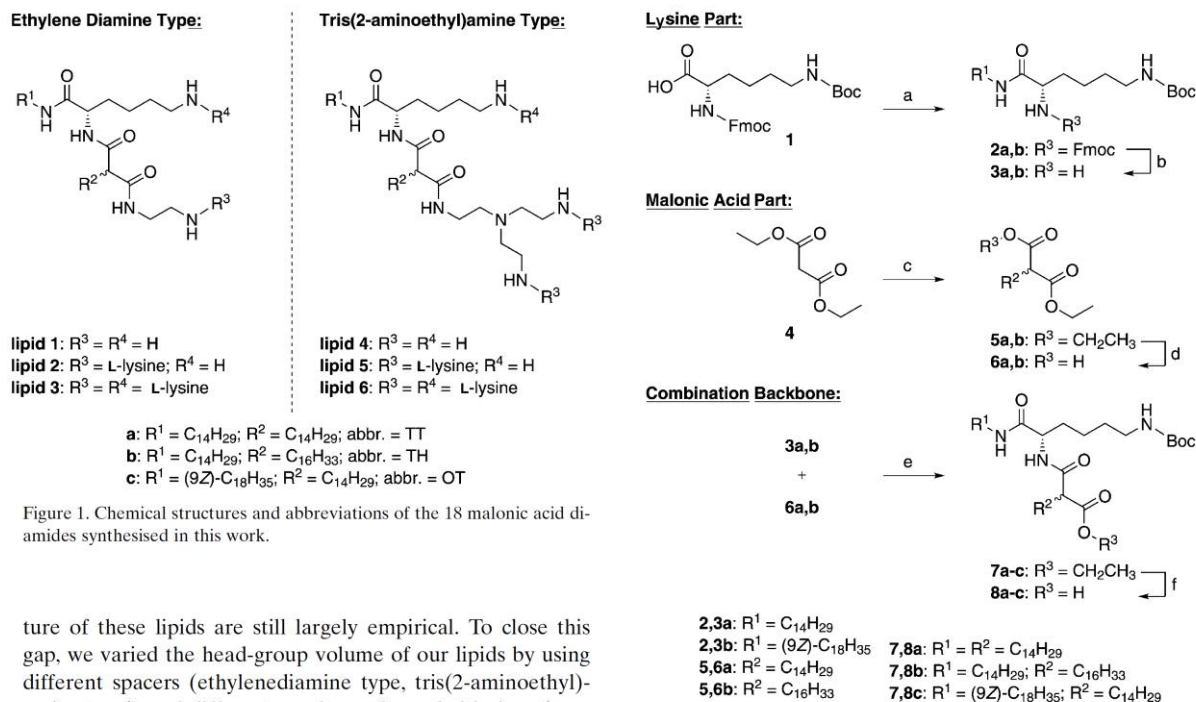


Figure 1. Chemical structures and abbreviations of the 18 malonic acid di-amides synthesised in this work.

ture of these lipids are still largely empirical. To close this gap, we varied the head-group volume of our lipids by using different spacers (ethylenediamine type, tris(2-aminoethyl)amine type), and different numbers of coupled lysines (zero to three). We chose the amide bond as the main connecting bond between the different building blocks of the lipid because of its biodegradability (which is necessary for low toxicity),^[12] and its higher stability to hydrolysis compared with the ester bond. Furthermore, we used the proteinogenic amino acid lysine as a main unit for the head group and the backbone, because of its biocompatibility and known ability to form complexes with DNA as a main element of histones and poly-L-lysine.^[13] The structural modifications result in 18 novel amino-functionalised lipids with peptide-like structure elements (peptide-mimic lipids, Figure 1).

The main focus of this work is the detailed description of the lipid synthesis. Furthermore, the report summarises the chemical and physicochemical properties of the novel lipids. We investigated the pure aqueous lipid dispersions at pH 5 and 10 by means of DSC to obtain information about the thermal behaviour of the pure lipids and to explore the influence of structural variations in the lipophilic part and the head-group region of the molecules on the thermal behaviour. In addition, we investigated the formed aggregate structures of selected aqueous lipid dispersions at pH 10 by means of dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM).

Results and Discussion

Synthetic methods: The synthetic strategy developed in this work allows easy variation of the alkyl chains by different combinations of separately prepared molecule parts. Scheme 1 describes the synthesis of the lipid backbone. The

Scheme 1. Synthesis of the lipid backbone: a) tetradecylamine/oleylamine, PyBOP, DIPEA, CH₂Cl₂, RT; b) piperidine, DMF; c) tetradecyl bromide/hexadecyl bromide, NaH, toluene; d) 1) KOH, ethanol, RT; 2) HCl, H₂O; e) PyBOP, DIPEA, CH₂Cl₂, RT; f) 1) KOH, THF, H₂O; 2) H₂SO₄, H₂O. See text for details.

starting material was the orthogonally amine-protected L-lysine derivative **1** with an amine labile 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) protective group in the α position and an acid labile *tert*-butoxycarbonyl (Boc)-protected amino group in the ϵ position. Compound **1** was first coupled with tetradecylamine and oleylamine with (benzotriazol-1-yl)oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) as coupling agent and diisopropylethylamine (DIPEA) as accessory base, yielding the orthogonally protected lysine amides **2** (yield: 72–82%). The property that DIPEA cleaves the Fmoc group very slowly in comparison with other tertiary amines (50% DIPEA in dimethylformamide (DMF): $t_{1/2}$ = 10.1 h^[14]) ensures its application as proton catching agent for this coupling reaction. PyBOP is an effective coupling agent for the synthesis of amides successfully used in peptide synthesis.^[15] Afterwards, the Fmoc deprotection of compounds **2** with piperidine yields the ϵ -Boc-protected lysine derivatives **3** with a free α -amino group needed for a further amide coupling reaction. Piperidine cleaves the Fmoc group very fast (20% in DMF: $t_{1/2}$ = 3 s; 5% in DMF: $t_{1/2}$ = 20 s^[14]). In addition, we also used DMF as solvent, according to the Merrifield peptide synthesis technique.^[16]

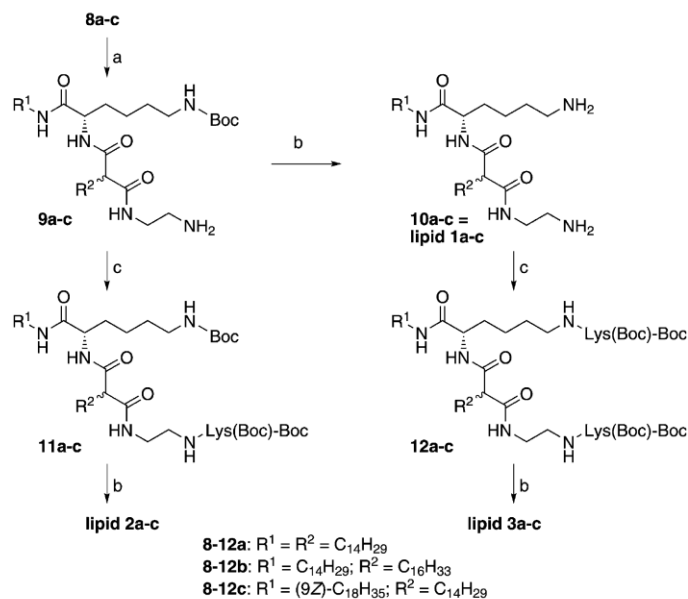
The starting material for the synthesis of the second part of the backbone was the malonic acid diethyl ester **4**, which was transformed into the monoalkylated derivatives **5** by

treatment with sodium hydride and tetradecyl and hexadecyl bromide. This reaction is described in various procedures,^[17] but our experience showed that the use of toluene as solvent and sodium hydride as deprotonating agent gave the best results. The following monosaponification step by using potassium hydroxide yields the malonic acid monoethyl esters **6**.^[18] The two backbone parts **3** and **6** can readily be prepared in higher quantities (up to 10 g). A different combination of both parts in the following amide coupling step allows an easy alkyl chain variation, which opens the way for a wide spectrum of lipids for further structure–function relationship studies. The carboxylic acids **6** and the amines **3** were coupled with PyBOP/DIPEA, resulting in the formation of the amides **7** (yield: 93–97%). We used DIPEA in this coupling reaction because of its increasing effect on the yields in sterically hindered reactions.^[19] In a further saponification step the ethyl ester function of compounds **7** was converted into the free carboxylic acid of compounds **8**. This reaction was carried out under mild conditions by using only an excess of potassium hydroxide of 0.5 equivalents with regard to compounds **7**.

The synthesis of the head-group region was designed in such a way that the number of free amino groups that can be protonated and, hence, the resulting volume of the head group could be easily varied for further structure-activity relationship studies. For this purpose, the lipid backbone prepared so far offers two connecting positions for the amino-functionalised head group: on the one hand, the ϵ -amino group of the lysine, which can be coupled with various carboxylic acids, and on the other hand, the free carboxylic acid moiety of the malonic acid unit that can be connected with different amines. Thus, the lipid backbone consists, in principle, of two different head groups, which can be synthesised and connected separately allowing a huge variety of structures.

The free carboxylic acid moiety of compounds **8** can be coupled with either ethylenediamine, resulting in the lipids **1–3a–c**, or with tris(2-aminoethyl)amine, yielding lipids **4–6a–c**. Both amine spacers further increase the structural diversity of the lipids prepared in this work.

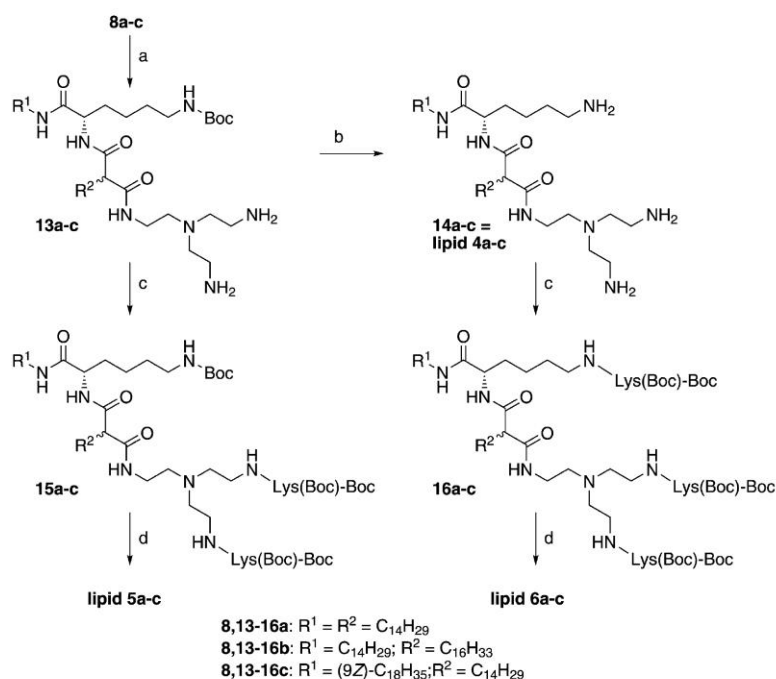
The synthesis of lipids **1–3a–c**, which contain ethylenediamine as spacer, is described in Scheme 2. The carboxylic acids **8** were coupled with ethylenediamine through amide bond formation by using PyBOP and triethylamine (TEA). This reaction step needs no monoprotection of the ethylene-



Scheme 2. Synthesis of the lipids with an ethylenediamine moiety: a) ethylenediamine, PyBOP, TEA, CH_2Cl_2 ; b) 1) TFA, CH_2Cl_2 ; 2) H_2O , NH_3 ; c) Boc-Lys(Boc)-OSu, TEA, CH_2Cl_2 .

diamine due to the large excess (about 20 equiv) of ethylenediamine used in this coupling reaction. After chromatographic purification, the resulting compounds **9** were treated with trifluoroacetic acid (TFA) to cleave the Boc groups and to yield compounds **10** (lipids **1a–c**) that contain the smallest head group, with two amino moieties that can be protonated. For a further enlargement of the head-group region we used the Boc-protected *N*-hydroxysuccinimide ester of the proteinogenic amino acid L-lysine (Boc-Lys(Boc)-OSu)—an activated amide bond forming ester successfully used in peptide synthesis.^[20] Compounds **9**, as well as **10**, were coupled with one or two molecules of Boc-Lys(Boc)-OSu, resulting in the formation of the Boc-protected compounds **11** and **12**, respectively. The subsequent cleavage of the Boc groups with TFA yields lipids **2a–c**, with three amino groups, and lipids **3a–c**, bearing four amino groups. The final purification of lipids **1–3a–c** was carried out with column chromatography on silica gel and a gradient technique by using chloroform, methanol, and ammonia as eluents.

For the synthesis of lipids **4–6a–c**, we used tris(2-aminoethyl)amine instead of ethylenediamine as spacer to finally increase the number of amino groups that can be protonated and, hence, to enlarge the head-group region. The synthetic procedures are comparable to the aforementioned syntheses (Scheme 3). Starting from compounds **8**, the amidation of the carboxylic acid moieties with tris(2-aminoethyl)amine by using PyBOP/TEA led to the formation of compounds **13**. After the subsequently performed cleavage of the Boc group, compounds **14** (lipids **4a–c**) were obtained. Both compounds **13** and **14** were used for the coupling with different numbers of lysine residues, leading to compounds **15**



Scheme 3. Synthesis of the lipids with a tris(2-aminoethyl)amine moiety: a) tris(2-aminoethyl)amine, PyBOP, TEA, CH_2Cl_2 ; b) 1) TFA, CH_2Cl_2 ; 2) H_2O , NH_3 ; c) Boc-Lys(Boc)-OSu, TEA, CH_2Cl_2 ; d) 1) HCl, H_2O , ethyl acetate; 2) DMAP, $CHCl_3$, methanol.

and **16**, respectively. For the final cleavage of the Boc moieties of **15** and **16**, we used a modified method because the TFA salts, which were achieved with the generally applied method, were difficult to work up. Instead, we used hydrochloric acid as the cleaving agent. Normally, HCl-saturated organic solvents, for example, ethyl acetate, are appropriate for this purpose,^[21] but due to the easier handling we utilised aqueous HCl, as described previously.^[22] Additionally, we worked with a two-phase system containing water and ethyl acetate as solvents because of the insolubility of the Boc-protected compounds in water. A comparable procedure was previously described for a toluene–water–HCl system.^[23] Furthermore, we used a novel method of workup: after the deprotection of the amino moieties of lipids **5a–c** and **6a–c**, we added 4-dimethylaminopyridine (DMAP) to the dissolved lipid–HCl salts and purified this mixture by column chromatography (see the Experimental Section, method b, yield: 97–99%). This technique eliminates the washing steps, which are connected with enormous loss of substance due to the high hydrophilicity of lipids **5a–c** and **6a–c** (see the Experimental Section, method a, yield: 21–27%). In this procedure, DMAP acts as a strong base and yields the free amino groups through transprotonation. During column chromatography (by using the gradient technique and chloroform, methanol, and ammonia as eluents), the resulting DMAP–HCl was eluted first as a lipophilic ion pair, followed by the lipids **5a–c** and **6a–c**.

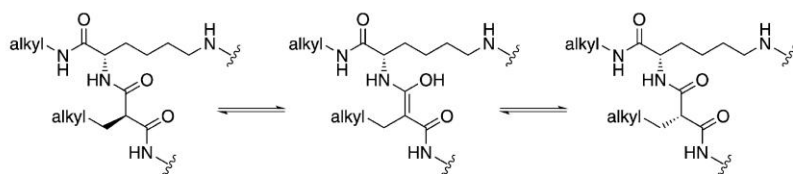
This module-like synthesis strategy allows a straightforward combination of different alkyl chains with diverse head groups, which are variable in size and number of amino groups, thereby resulting in a series of amino-functionalised lipids applicable for further structure influence investigations.

Stereochemical investigations:

To achieve biocompatibility of the lipids, we used the proteinogenic amino acid L-lysine within the lipid backbone and head group. Hence, we had to pay attention to the stereochemistry of the amino acid units. We applied the commercially available Boc-Lys(Boc)-OSu exhibiting an *S* configuration for the lysine coupling reaction. The coupling methods with *N*-hydroxysuccinimide esters are described to be free of racemisation.^[24] In addition, the coupling reaction by using PyBOP is

nearly free of racemisation.^[25] Furthermore, we chose every reaction step so that we used only reaction conditions that do not cause amino acid racemisation, that is, the protective group cleaving agents were used under conditions that are common in peptide synthesis, and the saponification reactions in the presence of amino acid moieties were performed under mild conditions. Therefore, we can assume that all of the lysine moieties in the lipids are *S* configured.

Surprisingly, the cleavage of Boc groups resulted in the formation of two different substances if the product mixture was investigated by thin-layer chromatography (TLC). However, ESI-MS measurements of these two substances, obtained by preparative TLC, showed the same mass spectra of the desired product. With regard to the synthetic pathway, we conclude the formation of diastereomers: the alkyl amide of the Boc-protected derivative of L-lysine (**3**) and the racemate of the alkylated malonic acid monoethyl ester (**6**) were connected by the formation of a rigid amide bond resulting in two diastereomers with *SR* and *SS* configuration. At first we tried to separate both diastereomers by column chromatography, but purification could not be realised, although the R_f values of the two substances indicated a distinct separation. Surprisingly, the extraction of one diastereomer from the TLC plate resulted again in two spots in a second TLC run, which reflected the “in situ” formation of the pair of diastereomers (see the Supporting Information). This indicates that the stereocentre at the α carbon of the malonic acid unit racemises in the alkaline milieu of the



Scheme 4. Postulated mechanism for the stereocentre racemisation at the malonic acid moiety of the lipids.

mobile phase during chromatography, which is also an explanation for our inability to separate the mixture. Scheme 4 shows a possible mechanism of the diastereomer transformation, including an enol as the intermediate structure.

For further investigations with respect to detailed physicochemical properties, polynucleotide binding properties, and gene transfer efficiencies (results will be published elsewhere), we will take into account the presence of two diastereomers.

Nuclear magnetic resonance investigations: All novel lipids (**lipids 1–6a–c**) were investigated by ^1H and ^{13}C NMR measurements. The general ^1H NMR spectra of our lipids are similar to those obtained from polymers. This is due to the complex molecular structures exhibiting a large number of protons with comparable chemical shifts. The NMR characteristics of the amide groups, such as anisotropy and *cis–trans* isomerism, further complicate the spectra.^[26] Hence, it is quite demanding to interpret ^1H NMR spectra on the basis of signal splitting and coupling constants. However, with the use of H,H COSY measurements, we were able to interpret the ^1H NMR spectra (examples of ^1H NMR and H,H COSY spectra are shown in the Supporting Information). For NMR measurements, the lipids were normally dissolved in CDCl_3 . Surprisingly, some of our lipids showed the formation of a transparent organo-gel, which is further connected with an extensive broadening of the proton signals. A decrease of the lipid concentration or the addition of small amounts of CD_3OD (which is able to break the hydrogen bonds between the lipids) led to the breakdown of the gel. However, the signal intensity and the comparability of the spectra were affected; for example, methanol can shift some ^1H NMR signals to higher/lower ppm values and almost all NH ^1H NMR signals are lost with the use of methanol. Surprisingly, the **lipids 6a–c** and **lipid 5b**, which have a large head group, are insoluble in common NMR solvents, except D_2O . Therefore, we had to carry out the ^1H NMR spectroscopy in D_2O at higher temperatures, at which the signals are narrower, because the lipid structures in water become more fluid.

^{13}C NMR measurements were carried out in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ mixtures (except the insoluble lipids, for which D_2O was used). As the ^{13}C NMR spectra of our lipids are also very complex, we could only assign related carbon NMR signal groups with carbon-atom groups bearing a related chemical shift (e.g., carbonyl carbon atoms; see the Experimental Section; examples for ^{13}C NMR and C,H COSY are shown in the Supporting Information). In ad-

dition, we observed a strong solvent dependency of the chemical shift and the number of ^{13}C NMR signals. In Figure 2, two regions of ^{13}C NMR spectra of **lipid 1c** are shown with various solvents and lipid concentrations. Figure 2F (39–56 ppm: CH_2NHCO , CH_2NH_2 , COCHR-CO and lysine α carbon) shows the signal broadening as a result of the formation of a gel. Furthermore, the solvent dependency of the number of peaks and chemical shifts is clearly shown (see Figure 2E and F, four peaks in the range between 39 and 43 ppm related to $2 \times \text{CH}_2\text{NHCO}$ and $2 \times \text{CH}_2\text{NH}_2$ carbon atoms in CDCl_3 , and Figure 2D, three peaks resulting from the same carbon atoms in the $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ mixture). The last observation also applies to the carbonyl region of the spectrum (Figure 2A–C); two signals, which correspond to three carbonyl carbon atoms, appeared in CDCl_3 , whereas six signals appeared in the $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ mixture for the same carbonyl atoms. The reason for this behaviour is the coexistent presence and absence of hydrogen bonds between the carbonyl functions and the solvent methanol.^[27] This behaviour makes the interpretation of spectra quite demanding and further complicates the comparability of spectra of different lipids. Hence, the choice of NMR solvent is a compromise between solubility and comparability.

Differential scanning calorimetry: The influence of alkyl chain and head group variations on the temperature-dependent aggregation behaviour of aqueous dispersions of the lipids synthesised in this work was investigated to extend the lipid characterisation. For this purpose, we used DSC measurements to examine possible phase transitions. We are aware that our substances are diastereomers and account for this in the analysis of the DSC curves.

The DSC investigations were carried out at two different pH values. At first pH 5 was used to achieve full protonation of the amino groups leading to cationic lipids applicable for gene transfer studies. At this pH value, the lipids form a transparent suspension, which is an indication of the formation of micellar aggregates. In acetate buffer at pH 5, the DSC curves of dispersions of **lipids 1–6c** and **lipids 2,4a** show no transition between 2 and 95°C (see the Supporting Information). DLS data and TEM images reveal the formation of micelles (data not shown).

Secondly, pH 10 was used for DSC measurements. At this pH value the lipids form a turbid suspension, which is a first indicator for the formation of lamellar or vesicular aggregates (see the Supporting Information for TEM images). Figure 3 summarises the DSC heating curves obtained for aqueous suspensions of all 18 lipids. The DSC scans were performed in a temperature range between 2 and 95°C in carbonate buffer at pH 10. We chose the alkaline conditions to ensure deprotonation of the amino groups. X-ray scattering data show that **lipids 1–4a–c** build up lamellar phases at

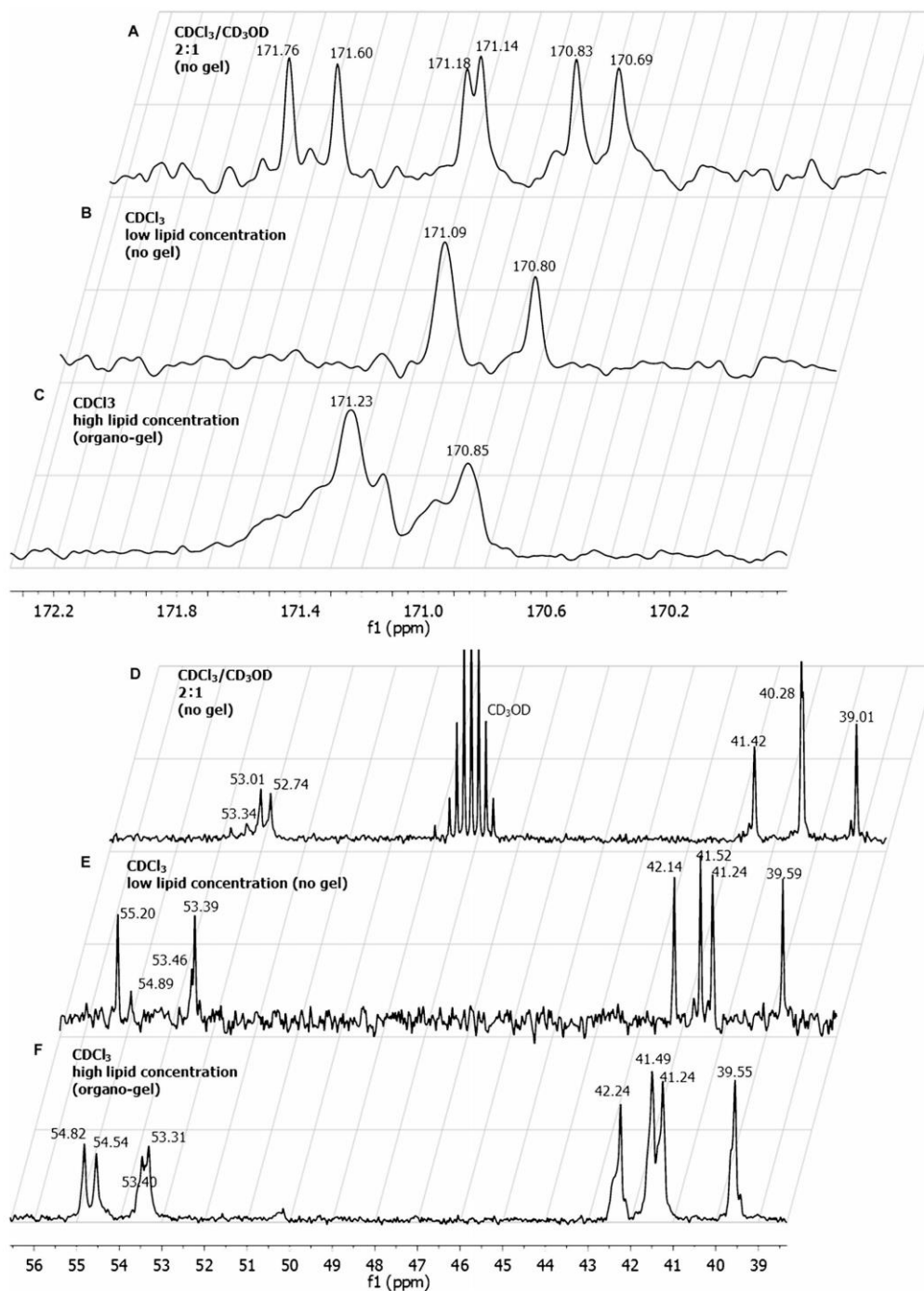


Figure 2. Details of the ^{13}C NMR spectrum of **lipid 1c** measured in different solvents and at different concentrations. A–C) Carbonyl region between 170.0 and 172.3 ppm; D–F) methylene carbon atoms next to amide nitrogen atoms and carbon atoms next to amine moieties in the region between 38 and 56 ppm. A,D) Lipid dissolved in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (2:1, v/v); B,E) lipid dissolved in CDCl_3 at low concentration; C,F) lipid dissolved in CDCl_3 at high concentration forming an organo-gel.

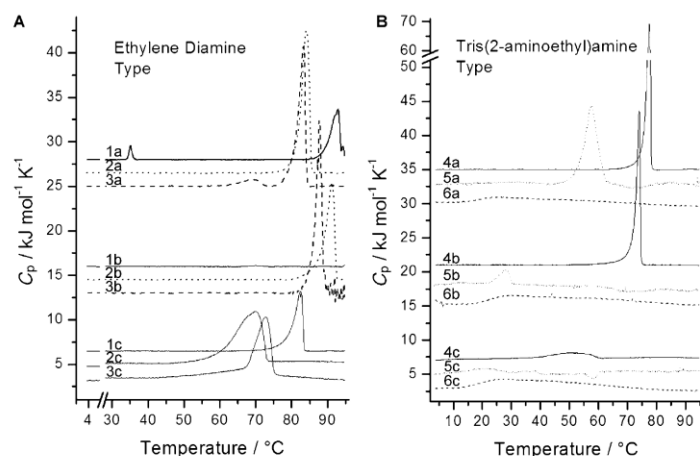


Figure 3. DSC heating curves of aqueous dispersions of the lipids ($c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ in carbonate buffer 10 mM at pH 10). A) Lipids with a head group of the ethylenediamine type (lipids 1–3a–c); B) lipids with a head group of the tris(2-aminoethyl)amine type (lipids 4–6a–c). The heating rate was 60 K h^{-1} , except for lipids 5a–c, which were measured with a heating rate of 20 K h^{-1} . Curves are shifted vertically for clarity.

this pH value.^[28] The broadening of the phase transition peaks for lipids with an oleyl chain (OT; see Figure 1) was expected because the oleylamine used contains up to 30% of other alkyl amines with different chain length and saturation.^[11b]

The peak maxima (main transition temperature, T_m) of the main endothermic transition peaks and the corresponding enthalpies (ΔH) for the lipids 1–6a–c are summarised in Table 1. Other DSC peaks, which appear at lower temperatures than the main DSC peak, are termed herein as pre-transitions (T_p as peak maximum). First, we compare the

transition temperatures of lipids 1–3a–c, which include an ethylenediamine-containing head group, to determine the dependence of the variation in the alkyl chain (Figure 3A). For the smallest lipid head group (lipids 1a–c), the main transition temperature increases from lipid 1a (92.9°C) to lipid 1b ($> 95^\circ\text{C}$) due to the longer alkyl chain that is bound to the malonic acid moiety (TT versus TH). In contrast, an unsaturated alkyl chain as residue R^1 (lipid 1c, see Figure 1) decreases the transition temperature to 82.5°C . A similar effect of changes in chain structure on the thermotropic behaviour was observed for the lipids 2a–c, including a larger head group

with one additional lysine residue and also for the lipids 3a–c consisting of two lysine moieties in the head group. The main transition temperatures follow the sequence: $T_m(\text{lipid } 2,3b) > T_m(\text{lipid } 2,3a) > T_m(\text{lipid } 2,3c)$. If we compare the T_m values of lipids with different head groups, while keeping the alkyl chains constant, we see that for all three alkyl-chain combinations (TT, TH, OT) the main transition temperature decreases by roughly 10 K after the insertion of the first lysine moiety and then stays nearly constant after the addition of the second lysine residue to the head group.

The DSC curves of lipids 4–6a–c, which contain a tris(2-aminoethyl)amine structure in the head group, differ from those for the lipids 1–3a–c described above (Figure 3B). On examining the dependence of T_m on the chain variation of the lipids 4a–c and lipids 5a–c, both the exchange of a tetradecyl chain by a hexadecyl chain and by an oleyl chain results in a decrease of the main transition temperature for lipid 4 [$T_m(\text{lipid } 4a) > T_m(\text{lipid } 4b) > T_m(\text{lipid } 4c)$], as well as for lipid 5 [$T_m(\text{lipid } 5a) > T_m(\text{lipid } 5b)$]. The dependence of T_m on the head group is similar to that observed for the lipids 1–3a–c. The introduction of two additional lysine residues decreases the main transition temperature [$T_m(\text{lipid } 4a,b) > T_m(\text{lipid } 5a,b)$].

Table 1. Main transition temperatures (T_m) and corresponding transition enthalpies (ΔH) of the DSC measurements (heating rate of 60 K h^{-1}) of the lipids.

Lipid	Alkyl chains ^[a]	Head group Type	Number of lysines	Number of primary amino groups	T_p [$^\circ\text{C}$] (ΔH [kJ mol^{-1}])	T_m [$^\circ\text{C}$] (ΔH [kJ mol^{-1}])
1a	TT	ethylenediamine	1	2	35.1 (1.7)	92.9 (20.0)
2a			2	3	–	84.2 (47.9)
3a			3	4	69.4 (2.8)	83.4 (842.4)
1b	TH		1	2	69.9 (0.6)	– ^[b]
2b			2	3	–	91.4 (41.3)
3b			3	4	–	86.9 (43.7)
1c	OT		1	2	–	82.5 (24.2)
2c			2	3	–	70.0 (51.7)
3c			3	4	–	72.7 (29.8)
4a	TT	tris(2-aminoethyl)amine	1	3	–	77.6 (52.9)
5a			3	5	–	57.4 (59.1) ^[c]
6a			4	6	–	–
4b	TH		1	3	–	74.1 (44.1)
5b			3	5	–	27.6 (9.2) ^[c]
6b			4	6	–	–
4c	OT		1	3	–	60.0 (11.8)
5c			3	5	– ^[d]	– ^[d]
6c			4	6	–	–

[a] TT = tetradecyl-/tetradecyl-; TH = tetradecyl-/hexadecyl-; OT = oleyl-/tetradecyl-. [b] The main transition appears at the end of the observed temperature range and could not be determined. [c] The heating rate was 20 K h^{-1} . [d] Data could not be determined because of irreproducible DSC curves.

The lipids **5a** and **5b** only show reproducible DSC curves at a heating rate of 20 K h^{-1} . If we used a heating rate of 60 K h^{-1} , we observed an irreproducible, slow decrease of the heat capacity, C_p , over a wide temperature range, followed by a rapid increase of C_p (see, for example, lipid **5a** in the Supporting Information). The lipid **5c** shows no reproducible DSC curves at either heating rate (see the Supporting Information). The DSC curves of lipids **6a–c** show no transition between 2 and 95°C , in either the heating or in the cooling scans. This probably indicates that no lamellar phases are formed if the head group becomes too large.

The T_m values of the series of lipids (see Table 1) show clear structure dependence. As mentioned for the class of lipids with an ethylenediamine-containing head group (lipids **1–3a–c**), we found the following relationships for the lipids with equal head groups: based on the lipids with two tetradecyl chains (TT), the elongation of the malonic acid bound alkyl chain to a hexadecyl chain increases T_m and, on the other hand, the exchange of the lysine-bound alkyl chain by an oleyl chain decreases the main transition temperature. In contrast, the lipids **4a–c** and lipids **5a–c** (with tris(2-aminoethyl)amine-containing head groups) show for both alkyl chain variations (TT \rightarrow TH and TT \rightarrow OT) a decrease in T_m . The decrease of T_m after the introduction of an oleyl chain is in line with results found for phospholipids; for example, *cis* double bonds reduce the effective alkyl chain length and disturb the chain packing that results in a decrease of T_m .^[29] For the exchange of one tetradecyl chain by a hexadecyl chain we would expect an increase of T_m based on principles found for phospholipids.^[29] However, only the lipids of the ethylenediamine type show the expected T_m dependencies ($T_m(\text{TH}) > T_m(\text{TT})$). The lipids of the tris(2-aminoethyl)amine type exhibit the opposite behaviour ($T_m(\text{TT}) > T_m(\text{TH})$). We cannot explain this different behaviour at the moment, but assume a head-group-dependent difference in the molecular conformation, resulting in different packing properties and, as a consequence, deviations from the expected variations of T_m with alkyl-chain length. Further physicochemical investigations such as X-ray scattering are necessary to prove this assumption.

As mentioned before, the attachment of one or two lysine residues to the head group decreases the transition temperature of the lipids **1–5a–c** on comparing the lipids with the same alkyl chain combination. The lipids **1a–c** exhibit the smallest head group (see Figure 1), resulting in a cylindrical lipid shape: a structure that allows dense packing of the lipids. The attachment of a lysine molecule to the head group increases the conical shape of the lipids by enlarging the head group. This leads to a decrease of T_m due to a distortion of the lipid packing. Furthermore, we assume a better head-group hydration because of the hydrophilic lysine moieties. This hydration is associated with changes in the properties of the bilayer/solute interface and, hence, also influences the transition temperature.^[30] Moreover, the attachment of two lysine residues at the tris(2-aminoethyl)amine head group results in a more conical lipid shape, which explains the observed decrease of the T_m value [$T_m(\text{lipids}$

4a–c) $> T_m(\text{lipids 5a–c})$]. The transition temperatures of the lipids **1–4a–c present a further head-group effect: all T_m values are equal to or higher than 60°C . These values are very high taking into account the presence of tetradecyl and oleyl chains. The comparison of the T_m values of lipids **1–4a–c** with values from glycerol-based phospholipids or cationic lipids containing the same alkyl-chain combination (see data from the literature^[31] in Table 2) clearly illustrates the**

Table 2. Main transition temperature (T_m) values from glycerol-based phospholipids or cationic lipids in different media taken from the literature.

Lipid ^[a]	Medium	T_m [$^\circ\text{C}$] (ΔH [kJ mol^{-1}])
DMPC	H_2O , pH 7	24.0
DMPC	H_2O , pH 12	23.6
DMPE	H_2O , pH 7	51.3
DMPE	H_2O , pH 12	21.5
DMTAP	Na_2HPO_4 (50 mM), NaH_2PO_4 , pH 7.4	38.4
MPPC	H_2O	34.0 (33.8)
PMPC	H_2O	26.0 (32.6)
MOPC	H_2O , ethylene glycol	-19.0 (20.1)
OMPC	H_2O , ethylene glycol	-27.0

[a] DMPC = 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, DMPE = 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine, DMTAP = 1,2-dimyristoyl-3-trimethylammonio propane chloride, MPPC = 1-myristoyl-2-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, PMPC = 1-palmitoyl-2-myristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, MOPC = 1-myristoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, OMPC = 1-oleoyl-2-myristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine.

significantly higher transition temperatures. In addition, a group of amino acid based cationic lipids with lysine as head group, two tetradecyl chains as the lipophilic part of the molecule and glutamate as the backbone show lower transition temperatures (T_m between 25.5 and 41.0°C) than the lipids **1–4a**.^[32] This observation indicates a very strong hydrogen-bonding interaction between the head group and/or lipid-backbone region in addition to the van der Waals interaction between the alkyl chains.^[30,33] Another piece of evidence that supports this assumption is the high transition enthalpy of the main transition of lipids **2–5a** (42.4 – 59.1 kJ mol^{-1} ; see Table 1). These values exceed the range of the L_α/L_β phase transition enthalpies of 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospholipids and glycolipid bilayers of comparable hydrocarbon-chain length (published ΔH values ≈ 21 – 25 kJ mol^{-1}).^[31c] Furthermore, high enthalpy values are also observed for lipids **2b**, **3b**, **4b** and **2c** (see Table 1). The enthalpy change that occurs during a transition in lamellar phases is caused by conformational changes within the lipid hydrocarbon chains, by changes in van der Waals interactions due to an increase in the molecular area at the bilayer/water interface, and also by contributions from the changes in heat of hydration of the head group and the breaking of hydrogen bonds in the backbone and/or head-group region. At present, we have no clear evidence for the assumption of better chain packing and additional hydrogen-bonding interactions in the head-group region. Additional experiments in-

cluding X-ray diffraction and infrared spectroscopy are necessary to prove this notion.

Comparing the lipid structures of **lipids 6a–c**, they only vary in the length and degree of saturation of the alkyl chains (see Figure 1). These lipids show no transitions in the DSC scans, presumably due to the formation of micellar aggregates. Based on the chemical structure (Figure 1), we can assume two explanations for the absence of transition peaks in the DSC curves: 1) lipids with six primary amino groups are very hydrophilic and, hence, soluble in carbonate buffer at pH 10; and 2) the lipids self-assemble into micelle-like aggregates that do not show endothermic transitions. To obtain further information about the shape and size of the aggregates of **lipids 6a–c** formed in aqueous dispersions, we investigated the aggregate size by using DLS and visualised the aggregates with TEM.

Particle size measurements: The results of the DLS measurements (intensity and mass-weighted radii of the particles) are summarised in Table 3. Besides the intensity-weighted

Table 3. Particle sizes of aggregates formed of **lipids 6a–c** ($c=1 \text{ mg mL}^{-1}$, in carbonate buffer at pH 10).

Lipid	Peak 1 r [nm] area [%] ^[a]	Peak 2 r [nm] (area [%]) ^[a]
intensity weighted:		
lipid 6a	4.4 ± 0.1 (22.2 ± 1.7)	196.2 ± 160.3 (68.8 ± 14.4)
lipid 6b	4.4 ± 0.1 (17.9 ± 0.6)	46.9 ± 2.1 (76.1 ± 4.5)
lipid 6c	6.1 ± 0.2 (10.7 ± 0.5)	85.9 ± 1.3 (85.7 ± 1.4)
mass weighted:		
lipid 6a	3.8 ± 0.3 (99.1 ± 0.3)	155.6 ± 76.2 (0.9 ± 0.3)
lipid 6b	4.1 ± 0.2 (99.2 ± 0.1)	34.6 ± 2.8 (0.7 ± 0.1)
lipid 6c	5.4 ± 0.2 (97.7 ± 0.1)	95.6 ± 3.6 (2.2 ± 0.1)

[a] The averages of the particle radii and the corresponding peak areas are given with the corresponding standard deviations ($n=3$).

particle size, we also used the mass-weighted particle size distribution because this is more meaningful for polydisperse samples with different particle species.^[34] All investigated lipids reproducibly showed two species of particles with different radii in aqueous dispersions (carbonate buffer at pH 10, $c=1 \text{ mg mL}^{-1}$). This observation refutes the theory that the **lipids 6a–c** are molecularly dissolved in aqueous media. The dominant species has a particle size (radius) of between 4 and 6 nm for all investigated lipid dispersions. This particle size indicates that aggregates of a micellar type are probably present in the aqueous suspension. The theoretical length of the lipid molecules, which is in the range between 2.5 and 3.0 nm (see the Supporting Information), supports this hypothesis. Under the assumption that the radius of a micelle equals approximately the length of one lipid molecule and bearing in mind that DLS determines the hydrodynamic radius, the radii determined by DLS measurements are in line with the theoretical values. Another supporting fact is the shape of our lipid molecules: the large hydrophilic head group of **lipids 6a–c** with three lysine molecules within the head group causes a distinct con-

ical shape, which prefers the formation of micelles.^[35] Furthermore, a second species of aggregate with a larger radius (about 1–2% of all aggregates in the mass-weighted particle size distribution) was observed (see Table 3). These aggregates, with radii in the range between 35 and 155 nm, are too large for micellar structures. It is conceivable that these aggregates are agglomerates of micelles. To visualise the shape of the aggregates, TEM investigations were performed.

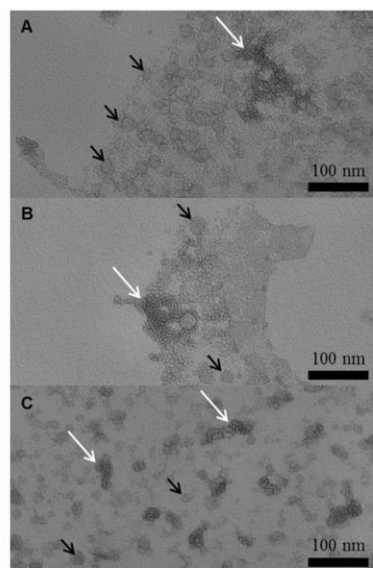


Figure 4. TEM images of lipid dispersions ($c=0.05 \text{ mg mL}^{-1}$ in carbonate buffer at pH 10): A) **lipid 6a**; B) **lipid 6b**; C) **lipid 6c**. The samples were stained with uranyl acetate. Black arrows point to small round aggregates (micelles). White arrows point to larger agglomerates.

Transmission electron microscopy: Figure 4 shows TEM images of lipid dispersions containing 0.05 mg mL^{-1} of lipid (**lipids 6a–c**, Figure 4A–C, respectively) in carbonate buffer at pH 10. The samples were negatively stained with uranyl acetate. All three images show two species of aggregates with different particle sizes that are roughly in agreement with the DLS results mentioned above. We observed nearly round aggregates with radii of about 10 nm (see Figure 4, black arrows) and some larger agglomerates, which consist of small spherical aggregates (micelles) with radii smaller than 4 nm (see Figure 4, white arrows). These observations are in agreement with the micelle hypothesis proposed above for aqueous dispersions of **lipids 6a–c**.

Conclusion

A new structure type of amino-functionalised lipids has been synthesised. These lipids exhibit a complex malonic

acid diamide backbone and represent the second generation of the malonic acid diamides. The lipids contain six head-group types of variable size and different numbers of amino moieties, as well as three different types of alkyl chain. The use of lysine as a major component of the lipids and the high number of amide bonds determine the peptide-mimic character of the lipids. The modular nature of the synthesis of the lipid backbone, as well as the head-group attachment, results in a wide variation in the lipid structures. The combination of different alkyl chains with head groups of variable size and number of amino groups allow a detailed investigation of structure dependencies for subsequent research activities.

Head-group dependent and alkyl-chain dependent influences on the main transition temperatures of the lipids **1–5a–c** at pH 10 were found: the introduction of lysine in the head group decreases the T_m value. The alkyl-chain effect was different between lipids of the ethylenediamine type ($T_m(\text{TH}) > T_m(\text{TT}) > T_m(\text{OT})$) and tris(2-aminoethyl)amine type ($T_m(\text{TT}) > T_m(\text{TH}) > T_m(\text{OT})$). The observed high transition temperature and enthalpy values indicate strong interactions in the head group and backbone region. This assumption is supported by observations from NMR measurements.

Special thermal behaviour was observed for lipids **6**, bearing the largest head group with six primary amino moieties. These lipids exhibit no phase transition in the observed temperature region. DLS and TEM investigations indicate that these lipids form micellar aggregates in an aqueous environment. The micelles tend to agglomerate, resulting in the formation of larger aggregates.

First results suggest that the gene-transfer efficiencies of these lipids are very promising. Further physicochemical investigations with respect to the complexation ability of polynucleotides (as pure lipid or in a mixture with other lipids), including other scattering techniques and transfection experiments to test the transfection efficiency of the amino-functionalised lipids, are currently under way.

Experimental Section

General: All materials and reagents were purchased from Sigma Aldrich Co. Ltd. unless stated otherwise. All solvents were analytically pure and dried before use. Thin-layer chromatography was carried out on aluminium sheets pre-coated with silica gel 60 F254 (Merek, Darmstadt) and developed with bromothymol blue dip. For column chromatography under normal pressure, silica gel 60 (0.063–0.200 mm) was used. Mass spectrometry analyses were performed with a Finnigan MAT 710C instrument (ThermoSeparation Products, San Jose, CA) for ESI-MS, and with an LTQ Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen) for HRMS. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on Varian Gemini 2000 and Varian Inova 500 instruments. In general, we used CDCl_3 for ^1H NMR spectroscopy and a $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ mixture (2:1, v/v) for ^{13}C NMR spectroscopy. In some cases, we had to vary the solvent composition and the solvent (by using D_2O) due to solubility problems. Elemental analyses were performed with a CHNS-932 apparatus (Leco Corporation, St. Joseph, MI). MilliQ water was produced with a Milli-Q Advantage A10 pure-water system (Millipore, Billerica, MA).

Lipid precursor synthesis: The synthesis of the monoalkylated malonic acid diethyl esters (**5a** and **b**) and monoethyl esters (**6a** and **b**) was described previously.^[10a,17a,b,f]

Synthesis of orthogonally protected alkyl lysine amides (2a and b): Tetradecylamine or oleylamine (10 mmol) and DIPEA (10 mmol, 1.29 g) were dissolved in CH_2Cl_2 (10 mL). A solution of Fmoc-Lys(Boc)-OH (**1**; 10 mmol, 4.69 g) and PyBOP (10 mmol, 5.20 g) in CH_2Cl_2 (50 mL) was added under an argon atmosphere whilst stirring, which was continued for 3 h at room temperature. Afterwards, the reaction mixture was diluted with CHCl_3 and washed with saturated aqueous NaHCO_3 . The organic layer was washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and the solvent was evaporated in vacuo. The crude compounds **2a** and **b** were purified by column chromatography using silica gel 60 and $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ with the gradient technique.

(2S)-6-[(tert-Butoxycarbonyl)amino-2-[(9H-fluoren-9-yl)methoxycarbonyl]amino-N-tetradecylhexanamide (**2a**), $\text{C}_{40}\text{H}_{61}\text{N}_3\text{O}_5$; Yield: 82%; R_f = 0.81 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:1, v/v); m.p. 129–132°C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 27°C): δ = 0.88 (t, $^3J(\text{H,H})$ = 7.0 Hz, 3H; CH_2CH_3), 1.23–1.84 (m, 39H; $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NHBoc}$, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 3.09–3.22 (m, 4H; CH_2NHCO , CH_2NHBoc), 4.10–4.11 (m, 1H; COCHNHFMocCH_2), 4.20 (t, $^3J(\text{H,H})$ = 7.0 Hz, 1H; H9-fluorene), 4.38–4.39 (m, 2H; CH_2 -fluorene), 4.63 (s, 1H; NHBoc), 5.58 (s, 1H; NHFmoc), 6.20 (s, 1H; NHCO), 7.30 (t, $^3J(\text{H,H})$ = 7.5 Hz, 2H; H3,H6-fluorene), 7.39 (t, $^3J(\text{H,H})$ = 7.5 Hz, 2H; H2,H7-fluorene), 7.58 (d, $^3J(\text{H,H})$ = 7.4 Hz, 2H; H1,H8-fluorene); 7.75 ppm (d, $^3J(\text{H,H})$ = 7.5 Hz, 2H; H4,H5-fluorene); MS: m/z : 686 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{40}\text{H}_{61}\text{N}_3\text{O}_5$: C 72.36, H 9.26, N 6.33; found: C 72.43, H 9.33, N 6.33.

(2S)-6-[(tert-Butoxycarbonyl)amino-2-[(9H-fluoren-9-yl)methoxycarbonyl]amino-N-[(9Z)-octadec-9-enyl]hexanamide (**2b**), $\text{C}_{44}\text{H}_{67}\text{N}_3\text{O}_5$; Yield: 72%; R_f = 0.72 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:1, v/v); m.p. 115–116°C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 27°C): δ = 0.88 (t, $^3J(\text{H,H})$ = 6.7 Hz, 3H; CH_2CH_3), 1.27–1.86 (m, 39H; $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NHBoc}$, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 1.96–2.01 (m, 4H; $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 3.10–3.23 (m, 4H; CH_2NHCO , CH_2NHBoc), 4.09–4.10 (m, 1H; COCHNHFMocCH_2), 4.20 (t, $^3J(\text{H,H})$ = 6.9 Hz, 1H; H9-fluorene), 4.38–4.40 (m, 2H; CH_2 -fluorene), 4.60 (s, 1H; NHBoc), 5.33–5.38 (m, 2H; $\text{CH}=\text{CH}$), 5.54 (s, 1H; NHFmoc), 6.14 (s, 1H; NHCO), 7.30 (t, $^3J(\text{H,H})$ = 7.4 Hz, 2H; H3,H6-fluorene), 7.39 (t, $^3J(\text{H,H})$ = 7.4 Hz, 2H; H2,H7-fluorene), 7.58 (d, $^3J(\text{H,H})$ = 7.4 Hz, 2H; H1,H8-fluorene), 7.76 ppm (d, $^3J(\text{H,H})$ = 7.5 Hz, 2H; H4,H5-fluorene); MS: m/z : 741 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{44}\text{H}_{67}\text{N}_3\text{O}_5$: C 73.60, H 9.41, N 5.85; found: C 73.63, H 9.40, N 5.58.

Fmoc cleavage (3a and b): Alkyl lysine amides **2a** and **b** (10 mmol) and piperidine (64.6 mmol, 5.5 g) were dissolved in DMF (55 mL) and stirred for 3 h at room temperature. Afterwards, the reaction batch was diluted with water and extracted three times with heptane. The organic layers were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and the solvent was evaporated in vacuo. The crude compounds **3a** and **b** were purified by column chromatography using silica gel 60 and $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ with the gradient technique.

(2S)-2-Amino-6-[(tert-butoxycarbonyl)amino-N-tetradecylhexanamide (**3a**), $\text{C}_{25}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_5$; Yield: 99%; R_f = 0.82 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$, 90:10:0.5, v/v/v); m.p. 67–69°C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 27°C): δ = 0.87 (t, $^3J(\text{H,H})$ = 6.9 Hz, 3H; CH_2CH_3), 1.25–1.87 (m, 39H; $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NHBoc}$, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 3.11–3.12 (m, 2H; CH_2NHBoc), 3.22 (dd, $^3J_1(\text{H,H})$ = 13.5, $^3J_2(\text{H,H})$ = 6.7 Hz, 2H; CH_2NHCO), 3.33 (dd, $^3J_1(\text{H,H})$ = 7.9, $^3J_2(\text{H,H})$ = 4.3 Hz, 1H; $\text{COCHNH}_2\text{CH}_2$), 4.56 (s, 1H; NHBoc), 7.25 ppm (s, 1H; NHCO); MS: m/z : 442 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 883 $[\text{2M}+\text{H}]^+$, 464 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 905 $[\text{2M}+\text{Na}]^+$; elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{25}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_5$: C 67.98, H 11.64, N 9.51; found: C 68.24, H 11.45, N 9.38.

(2S)-2-Amino-6-[(tert-butoxycarbonyl)amino-N-[(9Z)-octadec-9-enyl]hexanamide (**3b**), $\text{C}_{29}\text{H}_{57}\text{N}_3\text{O}_5$; Yield: 94%; R_f = 0.54 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$, 90:10:0.5, v/v/v); m.p. 37–38°C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 27°C): δ = 0.86 (t, $^3J(\text{H,H})$ = 6.8 Hz, 3H; CH_2CH_3), 1.24–1.87 (m, 39H; $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NHBoc}$, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 1.95–2.02 (m, 4H; $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 3.10 (dt, $^3J_1(\text{H,H})$ = 6.4, $^3J_2(\text{H,H})$ = 6.4 Hz, 2H; CH_2NHBoc), 3.21 (dd, $^3J_1(\text{H,H})$ = 6.9, $^3J_2(\text{H,H})$ = 6.4 Hz, 2H; CH_2NHCO), 3.31 (dd, $^3J_1(\text{H,H})$ = 8.0, $^3J_2(\text{H,H})$ = 4.4 Hz, 1H;

COCHNH₂CH₂), 4.59 (s, 1H; *NHBoc*), 5.31–5.36 (m, 2H; *CH=CH*), 7.25 ppm (s, 1H; *NHCO*); MS: *m/z*: 496 [*M+H*]⁺, 991 [*2M+H*]⁺, 518 [*M+Na*]⁺, 1013 [*2M+Na*]⁺; elemental analysis calcd (%) for C₂₉H₅₇N₃O₃: C 70.25, H 11.59, N 8.48; found: C 70.04, H 11.27, N 8.51.

Coupling of the lipid backbone (7a–c): The appropriate lysine amide **3a** and **b** (1 mmol) and DIPEA (2 mmol, 250.5 mg) were dissolved in CH₂Cl₂ (3 mL). A solution of the appropriate alkyl malonic acid monoethyl ester **6a** and **b** (1 mmol) and PyBOP (1 mmol, 520.4 mg) in CH₂Cl₂ (15 mL) was added under an argon atmosphere whilst stirring, which was continued for 16 h. Afterwards, the reaction mixture was diluted with CHCl₃ and washed with aqueous NaHCO₃ (5 %). Then, the organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent was evaporated in vacuo. The crude compounds **7a–c** were purified by isocratic column chromatography using silica gel 60 and CHCl₃/Et₂O (1:1, v/v) as eluent.

2-[(N-[6-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-[(N-tetradecyl)amino]hexan-(2S)-2-yl]amino)carbonyl]hexadecanoic acid ethyl ester (7a), C₄₄H₈₅N₃O₆; Yield: 97%; R_f=0.47 (CHCl₃/Et₂O, 1:1, v/v); m.p. 84–87 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ=0.87 (t, ³J(H,H)=6.9 Hz, 6H; 2×(CH₂)₂CH₃), 1.25–1.92 (m, 68H; NHCH₂(CH₂)₁₂CH₃, (CH₂)₁₅CH₃, (CH₂)₃CH₂NHBoc, OCH₂CH₃, OC(CH₃)₃), 3.03–3.14 (m, 2H; CH₂NHBoc), 3.19–3.24 (m, 3H; CH₂NHCO, COCH(tetradecyl)CO), 4.15–4.22 (m, 2H; OCH₂CH₃), 4.32–4.37 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 4.61 (s, 1H; *NHBoc*), 6.26/6.36 (2×s, 1H; CH₂NHCO), 6.91 (³J(H,H)=8.0 Hz)/6.96 ppm (³J(H,H)=7.7 Hz) (2×d, 1H; COCH(NHCO)CH₂); MS: *m/z*: 750 [*M+H*]⁺, 774 [*M+Na*]⁺, 1526 [*2M+Na*]⁺; elemental analysis calcd (%) for C₄₄H₈₅N₃O₆: C 70.26, H 11.39, N 5.59; found: C 70.34, H 11.25, N 5.58.

2-[(N-[6-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-[(N-tetradecyl)amino]hexan-(2S)-2-yl]amino)carbonyl]octadecanoic acid ethyl ester (7b), C₄₆H₈₉N₃O₆; Yield: 96%; R_f=0.48 (CHCl₃/Et₂O, 1:1, v/v); m.p. 87–89 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ=0.88 (t, ³J(H,H)=6.9 Hz, 6H; 2×(CH₂)₂CH₃), 1.25–1.92 (m, 72H; NHCH₂(CH₂)₁₂CH₃, (CH₂)₁₅CH₃, (CH₂)₃CH₂NHBoc, OCH₂CH₃, OC(CH₃)₃), 3.03–3.15 (m, 2H; CH₂NHBoc), 3.18–3.24 (m, 3H; CH₂NHCO, COCH(hexadecyl)CO), 4.14–4.24 (m, 2H; OCH₂CH₃), 4.32–4.37 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 4.61 (s, 1H; *NHBoc*), 6.25/6.36 (2×s, 1H; CH₂NHCO), 6.91 (³J(H,H)=7.9 Hz)/7.00 ppm (³J(H,H)=7.7 Hz) (2×d, 1H; COCH(NHCO)CH₂); MS: *m/z*: 802 [*M+Na*]⁺, 778 [*M–H*][–], 814 [*M+Cl*][–]; elemental analysis calcd (%) for C₄₆H₈₉N₃O₆: C 70.81, H 11.50, N 5.39; found: C 71.01, H 11.19, N 5.39.

2-[(N-[6-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-[(9Z)-octadec-9-enyl]amino]-1-oxohexan-(2S)-2-yl]amino)carbonyl]hexadecanoic acid ethyl ester (7c), C₄₈H₉₁N₃O₆; Yield: 93%; R_f=0.44 (CHCl₃/Et₂O, 1:1, v/v); m.p. 70–71 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ=0.88 (t, ³J(H,H)=6.70 Hz, 6H; 2×(CH₂)₂CH₃), 1.25–1.92 (m, 68H; NHCH₂(CH₂)₁₂CH₃, CH₂CH=CHCH₂-(CH₂)₃CH₃, (CH₂)₁₅CH₃, (CH₂)₃CH₂NHBoc, OCH₂CH₃, OC(CH₃)₃), 1.93–2.05 (m, 4H; CH₂CH=CHCH₂), 3.02–3.25 (m, 5H; CH₂NHBoc, CH₂NHCO, COCH(tetradecyl)CO), 4.15–4.24 (m, 2H; OCH₂CH₃), 4.31–4.38 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 4.61 (s, 1H; *NHBoc*), 5.32–5.38 (m, 2H; *CH=CH*), 6.22/6.36 (2×s, 1H; CH₂NHCO), 6.91 (³J(H,H)=7.8 Hz)/6.98 ppm (³J(H,H)=7.6 Hz) (2×d, 1H; COCH(NHCO)CH₂); MS: *m/z*: 829 [*M+Na*]⁺; elemental analysis calcd (%) for C₄₈H₉₁N₃O₆: C 71.51, H 11.38, N 5.21; found: C 71.28, H 11.28, N 5.03.

Saponification of 7a–c (8a–c): The appropriate ester **7a–c** (1 mmol) was dissolved in a mixture of THF (15 mL) and water (5 mL), and potassium hydroxide (1.5 mmol, 84.2 mg) was added. The mixture was stirred for 46 h at room temperature. Then, a solution of H₂SO₄ (0.75 mmol, 73.6 mg) in water (13 mL) was added while stirring and cooling with an ice bath. The mixture was stirred for 15 min, followed by extraction with CHCl₃. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent was evaporated. The crude compounds **8a–c** were purified by column chromatography using silica gel 60 and CHCl₃/MeOH with the gradient technique.

2-[(N-[6-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-[(N-tetradecyl)amino]hexan-(2S)-2-yl]amino)carbonyl]hexadecanoic acid (8a), C₄₂H₈₁N₃O₆; Yield: 89%; R_f=0.39 (CHCl₃/MeOH, 9:1, v/v); m.p. 107–110 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ=0.88 (t, ³J(H,H)=6.9 Hz, 6H; 2×CH₂CH₃),

1.25–1.88 (m, 65H; NHCH₂(CH₂)₁₂CH₃, (CH₂)₁₅CH₃, (CH₂)₃CH₂NHBoc, OC(CH₃)₃), 3.02–3.26 (m, 5H; CH₂NHBoc, CH₂NHCO, COCH(tetradecyl)CO), 4.42–4.43 (m, 1H; COCH(NHCO)RCH₂), 4.73 (s, 1H; *NHBoc*), 6.65–6.83 (m, 1H; *NHCO*), 7.34–7.44 ppm (m, 1H; *NHCO*); MS: *m/z*: 747 [*M+Na*]⁺, 1471 [*2M+Na*]⁺, 1488 [*2M+K*]⁺, 723 [*M–H*][–], 1446 [*2M–H*][–]; elemental analysis calcd (%) for C₄₂H₈₁N₃O₆: C 69.66, H 11.27, N 5.80; found: C 69.36, H 10.99, N 5.78.

2-[(N-[6-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-[(N-tetradecyl)amino]hexan-(2S)-2-yl]amino)carbonyl]octadecanoic acid (8b), C₄₄H₈₅N₃O₆; Yield: 94%; R_f=0.30 (CHCl₃/MeOH, 9:1, v/v); m.p. 102–105 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ=0.88 (t, ³J(H,H)=6.8 Hz, 6H; 2×CH₂CH₃), 1.25–1.91 (m, 69H; NHCH₂(CH₂)₁₂CH₃, (CH₂)₁₅CH₃, (CH₂)₃CH₂NHBoc, OC(CH₃)₃), 3.03–3.25 (m, 5H; CH₂NHBoc, CH₂NHCO, COCH(hexadecyl)CO), 4.37–4.39 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 4.70 (s, 1H; *NHBoc*), 6.32–6.41 (m, 1H; *NHCO*), 7.07–7.16 ppm (m, 1H; *NHCO*); MS: *m/z*: 775 [*M+Na*]⁺, 1526 [*2M+Na*]⁺, 790 [*M+K*]⁺, 751 [*M–H*][–]; elemental analysis calcd (%) for C₄₄H₈₅N₃O₆: C 70.26, H 11.39, N 5.59; found: C 69.88, H 11.24, N 5.51.

2-[(N-[6-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-[(9Z)-octadec-9-enyl]amino]-1-oxohexan-(2S)-2-yl]amino)carbonyl]hexadecanoic acid (8c), C₄₆H₈₉N₃O₆; Yield: 95%; R_f=0.33 (CHCl₃/MeOH, 9:1, v/v); m.p. 75–78 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ=0.88 (t, ³J(H,H)=6.7 Hz, 6H; 2×CH₂CH₃), 1.25–1.90 (m, 65H; NHCH₂(CH₂)₁₂CH₃, CH₂CH=CHCH₂-(CH₂)₃CH₃, (CH₂)₁₅CH₃, (CH₂)₃CH₂NHBoc, OC(CH₃)₃), 1.94–2.02 (m, 4H; CH₂CH=CHCH₂), 3.05–3.27 (m, 5H; CH₂NHBoc, CH₂NHCO, COCH(tetradecyl)CO), 4.38–4.46 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 4.72 (s, 1H; *NHBoc*), 5.33–5.38 (m, 2H; *CH=CH*), 6.53–6.63 (m, 1H; *NHCO*), 7.30–7.35 ppm (m, 1H; *NHCO*); MS: *m/z*: 801 [*M+Na*]⁺, 777 [*M–H*][–], 1554 [*2M–H*][–]; elemental analysis calcd (%) for C₄₆H₈₉N₃O₆: C 71.00, H 11.27, N 5.40; found: C 70.78, H 11.12, N 5.47.

Coupling with ethylene diamine (9a–c) or tris(2-aminoethyl)amine (13a–c): Ethylene diamine (20 mmol, 1.20 g) or tris(2-aminoethyl)amine (20 mmol, 2.93 g), respectively, and TEA (2 mmol, 202 mg) were dissolved in CH₂Cl₂ (2 mL). A solution of the appropriate acid **8a–c** (1 mmol) and PyBOP (1 mmol, 520.4 mg) in CH₂Cl₂ (50 mL) was added slowly to the reaction mixture under argon atmosphere whilst stirring, which was continued for further 16 h. Afterwards, the dispersion was filtered and the filtrate was diluted with CHCl₃ and washed with aqueous K₂CO₃ (15 %). The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and solvent was evaporated. The crude product was purified by column chromatography using silica gel 60 and CHCl₃/MeOH/NH₃ with gradient technique.

Boc-Lys(Boc)-OSu coupling with primary amino groups (11a–c, 12a–c, 15a–c, 16a–c): The appropriate amount of amino-functionalised lipid, Boc-Lys(Boc)-OSu, and TEA were dissolved in CH₂Cl₂ (20 mL) and stirred for 16 h at room temperature. Following, the mixture was diluted with CHCl₃ (20 mL) and washed with aqueous K₂CO₃ (15 %). The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and solvent was evaporated. The crude product was purified by column chromatography using silica gel 60 and CHCl₃/MeOH with gradient technique. Reactants and stoichiometric ratios for the reaction with regard to the required product: **11a–c: 9a–c** (0.5 mmol), Boc-Lys(Boc)-OSu (0.5 mmol), TEA (0.5 mmol); **12a–c: 10a–c** (0.5 mmol), Boc-Lys(Boc)-OSu (1 mmol), TEA (1 mmol); **15a–c: 13a–c** (0.5 mmol), Boc-Lys(Boc)-OSu (1 mmol), TEA (1 mmol); **16a–c: 14a–c** (0.5 mmol), Boc-Lys(Boc)-OSu (1.5 mmol), TEA (1.5 mmol).

Removal of the Boc protective group with trifluoroacetic acid (lipids 1a–c, lipids 2a–c, lipids 3a–c, and lipids 4a–c): The appropriate amount of Boc-protected lipid (0.5 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (10 mL). The required amount of trifluoroacetic acid (**9a–c** 4 mL; **11a–c** 6 mL; **12a–c** 8 mL; **13a–c** 6 mL) was added stepwise while stirring at room temperature. Then, the solvent was evaporated at 25 °C. The residue was dissolved in CHCl₃ (20 mL) and ammonia solution (10 mL, 10 %) was added dropwise while stirring, with an ice bath. Afterwards, CHCl₃ (20 mL) and aqueous K₂CO₃ (10 mL, 10 %) were added to the dispersion. The organic layer was separated and the water layer was extracted twice with CHCl₃. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and the solvent was evaporated. The crude product was pu-

ried by column chromatography using silica gel 60 and $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ with the gradient technique.

N-(2-Aminoethyl)-*N'*-[6-amino-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl]-2-tetradecylpropanoic acid (**lipid 1a**), $\text{C}_{30}\text{H}_{70}\text{N}_3\text{O}_3$; Yield: 94%; $R_f = 0.36$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$, 80:20:2, v/v/v); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 27°C): $\delta = 0.88$ (t, $^3J(\text{H,H}) = 6.9$ Hz, 6H; $2 \times \text{CH}_3$), 1.25–1.88 (m, 56H; $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2.70 (t, $^3J(\text{H,H}) = 6.5$ Hz, 2H; $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2.83 (t, $^3J(\text{H,H}) = 5.9$ Hz, 2H; $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.00 (t, $^3J(\text{H,H}) = 7.6$ Hz, 1H; $\text{COCH}(\text{tetradecyl})\text{CO}$), 3.18–3.36 (m, 4H; $2 \times \text{CH}_2\text{NHCO}$), 4.30–4.34 (m, 1H; $\text{COCH}(\text{NHCO})\text{CH}_2$), 6.30–6.32 (m, 1H; tetradecyl-NHCO), 6.85–6.87 (m, 1H; $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 7.16 ppm (d, $^3J(\text{H,H}) = 7.9$ Hz, 1H; $\text{COCH}(\text{NHCO})\text{CH}_2$); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , 27°C): $\delta = 13.7$, 22.4, 22.4, 22.5, 26.7, 27.2, 27.27, 27.29, 29.0, 29.07, 29.09, 29.2, 29.3, 29.36, 29.39, 29.41, 29.43, 31.0, 31.31, 31.35, 31.7, 39.3, 40.52, 40.57, 41.60, 41.64, 53.3, 53.2, 53.3, 54.7, 171.0, 171.1, 171.2, 171.3, 171.6, 171.7 ppm; MS: m/z : 666 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 334 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 688 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 664 $[\text{M}-\text{H}]^-$; HRMS calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{70}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 666.6256; found: 666.6255.

N-(2-Aminoethyl)-*N'*-[6-amino-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl]-2-hexadecylpropanoic acid (**lipid 1b**), $\text{C}_{44}\text{H}_{88}\text{N}_3\text{O}_3$; Yield: 71%; $R_f = 0.27$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$, 80:20:2, v/v/v); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 27°C): $\delta = 0.88$ (t, $^3J(\text{H,H}) = 6.9$ Hz, 6H; $2 \times \text{CH}_3$), 1.25–1.90 (m, 60H; $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2.70 (t, $^3J(\text{H,H}) = 6.6$ Hz, 2H; $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2.82 (t, $^3J(\text{H,H}) = 5.9$ Hz, 2H; $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.01 (t, $^3J(\text{H,H}) = 7.7$ Hz, 1H; $\text{COCH}(\text{hexadecyl})\text{CO}$), 3.16–3.35 (m, 4H; $2 \times \text{CH}_2\text{NHCO}$), 4.28–4.35 (m, 1H; $\text{COCH}(\text{NHCO})\text{CH}_2$), 6.33–6.37 (m, 1H; tetradecyl-NHCO), 6.87–6.90 (m, 1H; $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 7.20 ppm (d, $^3J(\text{H,H}) = 7.7$ Hz, 1H; $\text{COCH}(\text{NHCO})\text{CH}_2$); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 27°C): $\delta = 13.7$, 22.2, 22.3, 22.4, 26.48, 27.1, 27.1, 28.82, 28.90, 28.93, 29.0, 29.15, 29.17, 29.19, 29.22, 29.24, 30.9, 31.0, 31.15, 31.17, 31.3, 31.5, 39.1, 40.34, 40.39, 40.42, 41.52, 52.8, 53.1, 53.4, 53.8, 170.8, 170.9, 171.2, 171.3, 171.6, 171.8 ppm; MS: m/z : 694 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 345 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 728 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$, 693 $[\text{M}-\text{H}]^-$; HRMS calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{88}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 694.6569; found: 694.6567.

N-(2-Aminoethyl)-*N'*-[6-amino-1-(*N*-(9*Z*)-octadec-9-enylamino)-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-2-tetradecylpropanoic acid (**lipid 1c**), $\text{C}_{48}\text{H}_{88}\text{N}_3\text{O}_3$; Yield: 92%; $R_f = 0.20$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$, 80:20:2, v/v/v); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 27°C): $\delta = 0.88$ (t, $^3J(\text{H,H}) = 6.9$ Hz, 6H; $2 \times \text{CH}_3$), 1.24–1.89 (m, 56H; $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NH}_2$), 1.95–2.02 (m, 8H; $2 \times \text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 2.70 (t, $^3J(\text{H,H}) = 6.7$ Hz, 2H; $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2.82 (t, $^3J(\text{H,H}) = 5.9$ Hz, 2H; $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.04 (t, $^3J(\text{H,H}) = 7.5$ Hz, 1H; $\text{COCH}(\text{tetradecyl})\text{CO}$), 3.14–3.33 (m, 4H; $2 \times \text{CH}_2\text{NHCO}$), 4.28–4.35 (m, 1H; $\text{COCH}(\text{NHCO})\text{CH}_2$), 5.33–5.38 (m, 2H; $\text{CH}=\text{CH}$), 6.45–6.46 (m, 1H; oleyl-NHCO), 7.02–7.03 (m, 1H; $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 7.33–7.40 ppm (m, 1H; $\text{COCH}(\text{NHCO})\text{CH}_2$); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 27°C): $\delta = 13.4$, 22.1, 22.27, 22.35, 26.4, 26.7, 26.98, 27.03, 28.76, 28.83, 28.87, 29.0, 29.1, 29.17, 29.22, 30.1, 30.76, 30.83, 30.99, 31.06, 31.1, 31.2, 31.4, 32.0, 39.0, 40.29, 40.32, 41.4, 52.8, 53.0, 53.3, 129.2, 129.4, 170.7, 170.8, 171.1, 171.2, 171.6, 171.7 ppm; MS: m/z : 720.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 361.1 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 754.5 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$, 718.6 $[\text{M}-\text{H}]^-$; HRMS calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{88}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 720.6725; found: 720.6750.

N-[6-Amino-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl]-*N'*-[2-(*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino)ethyl]-2-tetradecylpropanoic acid (**lipid 2a**), $\text{C}_{48}\text{H}_{90}\text{N}_7\text{O}_4$; Yield: 89%; $R_f = 0.15$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$, 65:35:5, v/v/v); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 27°C): $\delta = 0.88$ (t, $^3J(\text{H,H}) = 6.9$ Hz, 6H; $2 \times \text{CH}_3$), 1.25–1.88 (m, 62H; $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$, $2 \times (\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2.69–2.74 (m, 4H; $2 \times \text{CH}_2\text{NH}_2$), 2.99 (t, $^3J(\text{H,H}) = 7.5$ Hz, 1H; $\text{COCH}(\text{tetradecyl})\text{CO}$), 3.16–3.46 (m, 7H; $3 \times \text{CH}_2\text{NHCO}$, CHNH_2CH_2), 4.26–4.32 (m, 1H; $\text{COCH}(\text{NHCO})\text{CH}_2$), 6.47–6.49/6.62–6.64/7.56–7.58/7.66–7.74 (4×m, 3H; $3 \times \text{NHCO}$), 7.20–7.31 ppm (m, 1H; $\text{COCH}(\text{NHCO})\text{CH}_2$); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 27°C): $\delta = 13.5$, 22.3, 22.4, 22.5, 26.6, 27.1, 28.89, 28.94, 29.1, 29.20, 29.24, 29.3, 31.2, 31.4, 31.5, 31.8, 32.0, 34.4, 34.5, 38.4, 38.5, 38.6, 38.8, 39.17, 39.20, 40.7, 40.8, 49.2, 52.9, 53.1, 54.5, 54.6, 170.7, 170.8, 171.0, 171.5, 171.6, 171.9, 175.9, 176.0 ppm; MS: m/z : 794.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 398.1 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 828.5

$[\text{M}+\text{Cl}]^-$, 792.6 $[\text{M}-\text{H}]^-$; HRMS calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{90}\text{N}_7\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 794.7205; found: 794.7208.

N-[6-Amino-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl]-*N'*-[2-(*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino)ethyl]-2-hexadecylpropanoic acid (**lipid 2b**), $\text{C}_{62}\text{H}_{106}\text{N}_7\text{O}_4$; Yield: 70%; $R_f = 0.18$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$, 65:35:5, v/v/v); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 27°C): $\delta = 0.88$ (t, $^3J(\text{H,H}) = 6.9$ Hz, 6H; $2 \times \text{CH}_3$), 1.25–1.88 (m, 66H; $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$, $2 \times (\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2.69–2.74 (m, 4H; $2 \times \text{CH}_2\text{NH}_2$), 2.99 (t, $^3J(\text{H,H}) = 7.5$ Hz, 1H; $\text{COCH}(\text{hexadecyl})\text{CO}$), 3.16–3.46 (m, 7H; $3 \times \text{CH}_2\text{NHCO}$, CHNH_2CH_2), 4.26–4.32 (m, 1H; $\text{COCH}(\text{NHCO})\text{CH}_2$), 6.47–6.49/6.62–6.64/7.56–7.58/7.66–7.74 (4×m, 3H; $3 \times \text{NHCO}$), 7.20–7.31 ppm (m, 1H; $\text{COCH}(\text{NHCO})\text{CH}_2$); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 27°C): $\delta = 13.7$, 22.1, 22.3, 22.4, 26.7, 27.2, 29.0, 29.09, 29.19, 29.26, 29.36, 29.40, 29.45, 29.6, 29.7, 30.6, 31.19, 31.29, 31.7, 34.24, 38.57, 38.68, 38.78, 38.82, 39.3, 39.4, 40.02, 40.08, 49.5, 53.1, 53.2, 54.35, 54.40, 170.82, 170.87, 171.0, 171.3, 171.9, 172.0, 175.9, 176.0 ppm; MS: m/z : 822.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 844.7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 856.6 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$, 820.6 $[\text{M}-\text{H}]^-$; HRMS calcd for $\text{C}_{62}\text{H}_{106}\text{N}_7\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 822.7518; found: 822.7518.

N-[6-Amino-1-(*N*-(9*Z*)-octadec-9-enylamino)-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-*N'*-[2-(*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino)ethyl]-2-tetradecylpropanoic acid (**lipid 2c**), $\text{C}_{66}\text{H}_{106}\text{N}_7\text{O}_4$; Yield: 81%; $R_f = 0.09$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$, 65:35:5, v/v/v); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 27°C): $\delta = 0.88$ (t, $^3J(\text{H,H}) = 6.9$ Hz, 6H; $2 \times \text{CH}_3$), 1.23–1.86 (m, 62H; $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$, $2 \times (\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NH}_2$), 1.95–2.02 (m, 4H; $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 2.69–2.74 (m, 4H; $2 \times \text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.01 (t, $^3J(\text{H,H}) = 7.4$ Hz, 1H; $\text{COCH}(\text{tetradecyl})\text{CO}$), 3.13–3.46 (m, 7H; $3 \times \text{CH}_2\text{NHCO}$, CHNH_2CH_2), 4.27–4.32 (m, 1H; $\text{COCH}(\text{NHCO})\text{CH}_2$), 5.33–5.38 (m, 2H; $\text{CH}=\text{CH}$), 6.58–6.60/7.62–7.63/7.73–7.75 (3×m, 3H; $3 \times \text{NHCO}$), 7.29–7.30 ppm (m, 1H; $\text{COCH}(\text{NHCO})\text{CH}_2$); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 27°C): $\delta = 13.7$, 22.4, 26.7, 26.9, 27.2, 29.1, 29.2, 29.4, 31.25, 31.32, 31.57, 31.64, 31.8, 32.1, 32.3, 34.6, 38.5, 38.6, 38.8, 39.0, 39.3, 39.4, 40.8, 40.9, 53.1, 53.2, 53.7, 54.0, 54.7, 129.4, 129.7, 170.8, 171.0, 171.2, 171.4, 171.6, 171.8, 176.0, 176.2 ppm; MS: m/z : 848.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 425.0 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 882.6 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$, 846.7 $[\text{M}-\text{H}]^-$; HRMS calcd for $\text{C}_{66}\text{H}_{106}\text{N}_7\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 848.7675; found: 848.7671.

N-[2-(*N*-[(2*S*)-2,6-Diamino-1-oxohexyl]amino)ethyl]-*N'*-[6-(*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino)-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-yl]-2-tetradecylpropanoic acid (**lipid 3a**), $\text{C}_{51}\text{H}_{103}\text{N}_9\text{O}_5$; Yield: 31%; $R_f = 0.24$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$, 50:50:10, v/v/v); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 27°C): $\delta = 0.88$ (t, $^3J(\text{H,H}) = 7.0$ Hz, 6H; $2 \times \text{CH}_3$), 1.24–1.86 (m, 68H; $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$, $2 \times (\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NH}_2$, $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NHCO}$), 2.64–2.69 (m, 4H; $2 \times \text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.02–3.07 (m, 1H; $\text{COCH}(\text{tetradecyl})\text{CO}$), 3.18–3.49 (m, 10H; $4 \times \text{CH}_2\text{NHCO}$, $2 \times \text{CHNH}_2\text{CH}_2$), 4.27–4.31 (m, 1H; $\text{COCH}(\text{NHCO})\text{CH}_2$), 6.62–6.64/7.40–7.50/7.62–7.64/7.71–7.73 (4×m, 4H; $4 \times \text{NHCO}$), 7.34–7.36 ppm (d, $^3J(\text{H,H}) = 7.8$ Hz, 1H; $\text{COCH}(\text{NHCO})\text{CH}_2$); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 27°C): $\delta = 12.8$, 21.8, 22.03, 22.08, 22.09, 22.2, 22.3, 26.14, 26.15, 26.69, 26.70, 27.96, 28.07, 28.48, 28.50, 28.54, 28.56, 28.61, 28.69, 28.81, 28.84, 28.88, 29.28, 30.37, 30.7, 30.8, 30.9, 31.0, 31.1, 34.0, 34.08, 34.17, 34.20, 37.96, 38.02, 38.07, 38.3, 38.4, 38.71, 38.76, 40.06, 40.13, 40.14, 40.16, 52.7, 52.8, 54.1, 54.2, 170.36, 170.40, 170.8, 171.6, 171.7, 171.8, 175.5, 175.9, 176.0 ppm; MS: m/z : 922.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 461.9 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 944.6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 956.5 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$, 920.5 $[\text{M}-\text{H}]^-$; HRMS calcd for $\text{C}_{51}\text{H}_{103}\text{N}_9\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 922.8152; found: 922.8152.

N-[2-(*N*-[(2*S*)-2,6-Diamino-1-oxohexyl]amino)ethyl]-*N'*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl]-2-hexadecylpropanoic acid (**lipid 3b**), $\text{C}_{55}\text{H}_{107}\text{N}_9\text{O}_5$; Yield: 95%; $R_f = 0.26$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$, 50:50:10, v/v/v); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 27°C): $\delta = 0.85$ (t, $^3J(\text{H,H}) = 6.8$ Hz, 6H; $2 \times \text{CH}_3$), 1.24–1.96 (m, 68H; $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$, $2 \times (\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NH}_2$, $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NHCO}$), 2.93–2.98 (m, 4H; $2 \times \text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.08–3.56 (m, 9H; $\text{COCH}(\text{hexadecyl})\text{CO}$, $4 \times \text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.87–3.99 (m, 2H; $2 \times \text{CHNH}_2\text{CH}_2$), 4.22–4.28 ppm (m, 1H; $\text{COCH}(\text{NHCO})\text{CH}_2$); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 27°C): $\delta = 13.1$, 20.9, 21.1, 22.0, 22.3, 25.9, 26.0, 26.3, 26.4, 26.76, 26.83, 27.7, 27.8, 28.7, 29.0, 29.9, 30.2, 30.9, 31.3, 38.0, 38.3, 38.4, 38.5, 38.9, 39.0, 52.4, 52.5, 52.8, 53.1, 53.4, 168.1, 168.5, 168.7, 170.3, 170.6, 171.0, 172.1, 172.2 ppm; MS: m/z : 950.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 972.8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 984.7 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$, 948.7

[M–H][−]; HRMS calcd for C₅₃H₁₀₈N₉O₅ [M+H]⁺: 950.8468; found: 950.8470.

N-(2-[N-[(2S)-2,6-Diamino-1-oxohexyl]amino]ethyl)-N'-[6-(N-[(2S)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino)-1-[N-(9Z)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2S)-2-yl]-2-tetradecylpropanoic acid (**lipid 3c**), C₅₅H₁₀₆N₉O₅; Yield: 82%; R_f=0.24 (CHCl₃/MeOH/NH₃, 50:50:10, v/v/v); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27°C): δ=0.88 (t, ³J(H,H)=6.9 Hz, 6H; 2×CH₃), 1.24–1.88 (m, 68H; NHCH₂(CH₂)₆CH₂CH=CHCH₂(CH₂)₆CH₃, (CH₂)₁₃CH₃, 2×(CH₂)₃CH₂NH₂, (CH₂)₃CH₂NHCO), 1.96–2.03 (m, 4H; CH₂CH=CHCH₂), 2.70–2.74 (m, 4H; 2×CH₂NH₂), 3.01–3.06 (m, 1H; COCH(tetradecyl)CO), 3.17–3.46 (m, 10H; 4×CH₂NHCO, 2×CHNH₂CH₂), 4.26–4.30 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 5.32–5.38 (m, 4H; CH=CH), 6.58–6.63(7.41–7.48/7.61–7.63/7.71–7.73 (4×m, 4H; 4×NHCO), 7.32 ppm (d, ³J(H,H)=7.8 Hz, 1H; COCH(NHCO)CH₂); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃/CD₃OD, 27°C): δ=13.5, 22.13, 22.17, 22.23, 22.52, 22.57, 26.56, 26.58, 26.8, 27.06, 27.08, 28.2, 28.3, 28.89, 28.93, 29.05, 29.08, 29.1, 29.24, 29.27, 29.33, 29.36, 29.68, 29.75, 30.11, 30.18, 30.3, 30.7, 31.2, 31.48, 31.50, 32.16, 34.18, 34.22, 38.2, 38.3, 38.4, 38.5, 38.7, 38.8, 39.18, 39.23, 40.0, 40.14, 40.17, 40.19, 53.1, 53.2, 54.3, 54.4, 129.3, 129.5, 170.65, 170.73, 170.9, 171.3, 171.9, 172.0, 175.59, 175.63, 175.9, 176.1 ppm; MS: m/z: 976.8 [M+H]⁺, 489.0 [M+2H]²⁺, 1010.7 [M+Cl][−], 974.8 [M–H][−]; HRMS calcd for C₅₅H₁₁₀N₉O₅ [M+H]⁺: 976.8624; found: 976.8628.

N-[6-Amino-1-oxo-1-(N-tetradecylamino)hexan-(2S)-2-yl]-N'-[2-[N,N-bis(2-aminoethylamino)ethyl]-2-tetradecylpropanoic acid (**lipid 4a**), C₅₈H₈₉N₉O₅; Yield: 97%; R_f=0.09 (CHCl₃/MeOH/NH₃, 65:35:5, v/v/v); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27°C): δ=0.89 (t, ³J(H,H)=7.0 Hz, 6H; 2×CH₃), 1.24–1.92 (m, 56H; NHCH₂(CH₂)₁₂CH₃, (CH₂)₁₃CH₃, (CH₂)₃CH₂NH₂), 2.48–2.61 (m, 6H; CH₂N(CH₂CH₂NH₂)₂), 2.70 (dt, ³J(H,H)=6.9, ²J(H,H)=14.0 Hz, 2H; (CH₂)₃CH₂NH₂), 2.75–2.79 (m, 4H; CH₂N(CH₂CH₂NH₂)₂), 3.03–3.41 (m, 5H; 2×CH₂NHCO, COCH(tetradecyl)CO), 4.31–4.41 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 6.69–6.71(7.38–7.42/8.18–8.20/8.32–8.33 ppm (4×m, 3H; 3×NHCO); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃/CD₃OD, 27°C): δ=13.6, 22.3, 22.4, 26.6, 27.13, 27.19, 28.92, 28.94, 28.98, 29.03, 29.05, 29.13, 29.15, 29.2, 29.3, 31.1, 31.3, 31.4, 31.6, 36.9, 38.3, 38.4, 39.18, 39.22, 40.5, 53.08, 53.12, 53.28, 55.34, 170.6, 170.8, 171.3, 171.7, 171.8 ppm; MS: m/z: 752.8 [M+H]⁺, 377.1 [M+2H]²⁺, 774.8 [M+Na]⁺; HRMS calcd for C₅₈H₉₀N₉O₅ [M+H]⁺: 752.7100; found: 752.7100.

N-[6-Amino-1-oxo-1-(N-tetradecylamino)hexan-(2S)-2-yl]-N'-[2-[N,N-bis(2-aminoethylamino)ethyl]-2-hexadecylpropanoic acid (**lipid 4b**), C₆₅H₉₃N₉O₅; Yield: 93%; R_f=0.09 (CHCl₃/MeOH/NH₃, 65:35:5, v/v/v); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27°C): δ=0.88 (t, ³J(H,H)=7.0 Hz, 6H; 2×CH₃), 1.24–1.89 (m, 60H; NHCH₂(CH₂)₁₂CH₃, (CH₂)₁₃CH₃, (CH₂)₃CH₂NH₂), 2.53–2.60 (m, 6H; CH₂N(CH₂CH₂NH₂)₂), 2.67–2.77 (m, 6H; 3×CH₂NH₂), 3.07 (t, ³J(H,H)=7.6 Hz, 1H; COCH(hexadecyl)CO), 3.12–3.39 (m, 4H; 2×CH₂NHCO), 4.30–4.40 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 6.69–6.71(7.36–7.38/8.29–8.30 ppm (3×m, 3H; 3×NHCO); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃/CD₃OD, 27°C): δ=13.3, 22.1, 22.39, 26.42, 26.96, 27.03, 28.76, 28.81, 29.0, 29.1, 29.2, 31.6, 31.3, 31.4, 31.5, 31.65, 31.69, 36.8, 36.9, 38.4, 38.99, 39.02, 40.5, 52.88, 52.92, 52.98, 55.8, 170.6, 170.8, 171.1, 171.59, 171.64 ppm; MS: m/z: 780.7 [M+H]⁺, 391.1 [M+2H]²⁺, 778.7 [M–H][−]; HRMS calcd for C₆₅H₉₄N₉O₅ [M+H]⁺: 780.7413; found: 780.7413.

N-[6-Amino-1-[N-(9Z)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2S)-2-yl]-N'-[2-[N,N-bis(2-aminoethylamino)ethyl]-2-tetradecylpropanoic acid (**lipid 4c**), C₆₇H₉₅N₉O₅; Yield: 81%; R_f=0.30 (CHCl₃/MeOH/NH₃, 65:35:5, v/v/v); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27°C): δ=0.75 (t, ³J(H,H)=6.5 Hz, 6H; 2×CH₃), 1.11–1.69 (m, 56H; NHCH₂(CH₂)₆CH₂CH=CHCH₂(CH₂)₆CH₃, (CH₂)₁₃CH₃, (CH₂)₃CH₂NH₂), 1.83–1.88 (m, 4H; CH₂CH=CHCH₂), 2.32–2.45 (m, 6H; CH₂N(CH₂CH₂NH₂)₂), 2.52–2.56 (m, 6H; 3×CH₂NH₂), 2.90–3.31 (m, 5H; 2×CH₂NHCO, COCH(tetradecyl)CO), 4.26–4.31 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 5.20–5.24 (m, 2H; CH=CH), 7.15–7.86(8.02–8.10/8.14–8.24 ppm (3×m, 3H; 3×NHCO); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃/CD₃OD, 27°C): δ=13.9, 22.4, 22.67, 22.68, 26.71, 26.77, 26.9, 27.4, 27.5, 28.99, 29.05, 29.13, 29.21, 29.24, 29.36, 29.41, 29.45, 29.48, 31.59, 31.61, 31.68, 31.9, 32.16, 32.29, 36.7, 37.6, 39.2, 39.3, 39.38, 39.44, 41.45, 41.53, 52.8, 52.9, 53.0, 53.9, 54.2, 56.9, 57.1, 129.40, 129.61, 170.0, 170.4, 170.9, 171.0, 171.2, 171.4 ppm; MS: m/z: 807.4 [M+H]⁺, 840.8 [M+Cl][−], 804.9

[M–H][−]; HRMS calcd for C₆₇H₉₆N₉O₅ [M+H]⁺: 806.7569; found: 806.7567.

Removal of the Boc protective group with hydrochloric acid (lipid 5a-c and lipid 6a-c):

Method a: The Boc-protected lipid (0.2 mmol) was suspended in acetic acid ethyl ester (15 mL). HCl (4 mL, 36%) was added stepwise within 2 h and the reaction mixture was stirred for 6 h. Then, the solvent was separated in vacuo. Ammonia (10 mL, 15%) was added carefully under stirring while cooling with an ice bath, and subsequently brine with K₂CO₃ (20%; 10 mL) was added to the suspension. The mixture was extracted three times with CHCl₃. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent was evaporated. The crude lipid was purified by column chromatography using silica gel 60 (2 g for 150 mg crude product) and CHCl₃/MeOH/NH₃ with the gradient technique.

Method b: The Boc-protected lipid (0.2 mmol) was suspended in acetic acid ethyl ester (15 mL). Over 2 h, HCl (4 mL, 36%) was added stepwise. The reaction mixture was stirred for 6 h, then the solvent was evaporated. The residue was dissolved in a mixture of CHCl₃ (4 mL) and methanol (1 mL), and DMAP (1.2 mmol, 146 mg) was added. This mixture was separated by column chromatography using silica gel 60 (2 g for 150 mg crude product) and CHCl₃/MeOH/NH₃ with the gradient technique to achieve the pure lipid as the free base.

N-[6-Amino-1-oxo-1-(N-tetradecylamino)hexan-(2S)-2-yl]-N'-[2-[N,N-bis(2-[N-[(2S)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino]ethylamino)ethyl]-2-tetradecylpropanoic acid (**lipid 5a**), C₅₅H₁₁₃N₁₁O₅; Yield: 69% (method a); R_f=0.18 (CHCl₃/MeOH/NH₃, 35:65:15, v/v/v); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27°C): δ=0.86 (t, ³J(H,H)=6.7 Hz, 6H; 2×CH₃), 1.23–1.81 (m, 68H; NHCH₂(CH₂)₁₂CH₃, (CH₂)₁₃CH₃, 3×(CH₂)₃CH₂NH₂), 2.48–2.58 (m, 6H; CH₂N(CH₂CH₂NH₂)₂), 2.66–2.74 (m, 6H; 3×CH₂NH₂), 3.11–3.48 (m, 11H; 4×CH₂NHCO, COCH(tetradecyl)CO, 2×CHNH₂CH₂), 4.28–4.31 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 7.14–7.21(7.46–7.86 ppm (2×m, 5H; 5×NHCO); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃/CD₃OD, 27°C): δ=13.2, 22.06, 22.13, 22.3, 26.4, 26.94, 27.00, 28.76, 28.88, 28.92, 28.98, 29.1, 29.7, 30.1, 30.5, 30.6, 31.26, 31.34, 31.40, 34.2, 37.0, 37.1, 37.3, 39.0, 39.77, 39.83, 40.0, 52.8, 52.9, 53.3, 53.4, 53.5, 53.6, 54.1, 170.5, 170.7, 171.0, 171.6, 171.7, 172.1, 175.6, 175.7 ppm; MS: m/z: 1008.6 [M+H]⁺, 1030.7 [M+Na]⁺, 1042.6 [M+Cl][−]; HRMS calcd for C₅₅H₁₁₄N₁₁O₅ [M+H]⁺: 1008.8999; found: 1008.9027.

N-[6-Amino-1-oxo-1-(N-tetradecylamino)hexan-(2S)-2-yl]-N'-[2-[N,N-bis(2-[N-[(2S)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino]ethylamino)ethyl]-2-hexadecylpropanoic acid (**lipid 5b**), C₅₇H₁₁₇N₁₁O₅; Yield: 58% (method a); R_f=0.18 (CHCl₃/MeOH/NH₃, 35:65:15, v/v/v); ¹H NMR (500 MHz, D₂O, 60°C): δ=0.88–0.89 (m, 6H; 2×CH₃), 1.30–2.04 (m, 72H; NHCH₂(CH₂)₁₂CH₃, (CH₂)₁₃CH₃, 3×(CH₂)₃CH₂NH₂), 2.91–3.01 (m, 6H; CH₂N(CH₂CH₂NH₂)₂), 3.07–3.13 (m, 6H; 3×CH₂NH₂), 3.19–3.60 (m, 9H; 4×CH₂NHCO, COCH(hexadecyl)CO), 4.47 (t, ³J(H,H)=4.1 Hz, 2H; 2×CHNH₂CH₂), 4.35–4.40 ppm (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂); ¹³C NMR (125 MHz, D₂O, 60°C): δ=14.0, 21.9, 22.6, 22.7, 22.8, 26.7, 27.3, 27.5, 27.6, 29.5, 29.67, 29.76, 30.2, 30.89, 30.94, 31.15, 31.20, 31.8, 32.2, 36.8, 37.0, 37.2, 39.6, 39.8, 52.8, 53.0, 53.7, 54.0, 54.4, 170.40, 171.44, 171.6, 171.9, 172.5, 172.9, 173.2 ppm; MS: m/z: 1036.6 [M+H]⁺, 1058.7 [M+Na]⁺, 1070.6 [M+Cl][−]; HRMS calcd for C₅₇H₁₁₈N₁₁O₅ [M+H]⁺: 1036.9312; found: 1036.9321.

N-(6-Amino-1-[N-[(9Z)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2S)-2-yl]-N'-[2-[N,N-bis(2-[N-[(2S)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino]ethylamino)ethyl]-2-tetradecylpropanoic acid (**lipid 5c**), C₅₉H₁₁₉N₁₁O₅; Yield: 70% (method a); R_f=0.19 (CHCl₃/MeOH/NH₃, 35:65:15, v/v/v); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27°C): δ=0.88 (t, ³J(H,H)=6.8 Hz, 6H; 2×CH₃), 1.25–1.88 (m, 68H; NHCH₂(CH₂)₆CH₂CH=CHCH₂(CH₂)₆CH₃, (CH₂)₁₃CH₃, 3×(CH₂)₃CH₂NH₂), 1.95–2.01 (m, 4H; CH₂CH=CHCH₂), 2.50–2.58 (m, 6H; CH₂N(CH₂CH₂NH₂)₂), 2.67–2.72 (m, 6H; 3CH₂NH₂), 3.12–3.36 (m, 11H; 4×CH₂NHCO, COCH(tetradecyl)CO, 2×CHNH₂CH₂), 4.28–4.32 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 5.34–5.38 (m, 2H; CH=CH), 7.14–7.15(7.65–7.66/7.84–7.85 (3×m, 4H; 4×NHCO), 7.47–7.49 ppm (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃/CD₃OD, 27°C): δ=13.8, 22.38, 22.45, 22.51, 22.6, 26.8, 27.0, 27.32, 27.37, 28.6, 28.7, 29.0, 29.1, 29.25, 29.32, 29.5, 31.2, 31.3, 31.4, 31.7, 31.8,

32.4, 34.4, 34.7, 37.2, 37.3, 37.4, 37.5, 37.6, 39.3, 39.5, 40.4, 40.5, 40.6, 40.7, 53.1, 53.7, 53.8, 54.0, 54.2, 54.4, 54.5, 129.5, 129.8, 170.6, 170.8, 171.0, 171.3, 171.7, 171.75, 175.71, 175.79, 175.9, 176.0 ppm; MS: m/z : 1062.7 $[M+H]^+$, 531.9 $[M+2H]^{2+}$, 1096.7 $[M+Cl]^-$; HRMS calcd for $C_{59}H_{120}N_{11}O_5$ $[M+H]^+$: 1062.9468; found: 1062.9473.

N-[2-[*N,N*-Bis(2-[*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino)ethyl]amino]ethyl]-*N'*-(6-[*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino]-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl)-2-tetradecylpropandiamide (**lipid 6a**), $C_{61}H_{125}N_{13}O_6$; Yield: 27% (method a), 99% (method b); $R_f=0.14$ ($CHCl_3/MeOH/NH_3$, 35:65:15, v/v/v); 1H NMR (500 MHz, D_2O , 60 °C): $\delta=0.87-0.89$ (m, 6H; $2 \times CH_3$), 1.30–1.91 (m, 74H; $NHCH_2(CH_2)_{12}CH_3$, $(CH_2)_{13}CH_3$, $3 \times (CH_2)_3CH_2NH_2$, $(CH_2)_3CH_2NHCO$), 2.71–2.78 (m, 6H; $CH_2N(CH_2CH_2NH_2)_2$), 3.08 (t, $^3J(H,H)=7.5$ Hz, 6H; $3 \times CH_2NH_2$), 3.17–3.42 (m, 14H; $5 \times CH_2NHCO$, $3 \times CHNH_2CH_2$, $COCH(tetradecyl)CO$), 4.04 (t, $^3J(H,H)=6.5$ Hz, 3H; $3 \times CHNH_2CH_2$); 4.31–4.36 ppm (m, 1H; $COCH(NHCO)CH_2$); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$, 27 °C): $\delta=13.2$, 21.3, 21.6, 22.0, 22.3, 26.05, 26.14, 26.17, 26.4, 26.92, 26.99, 27.9, 28.7, 28.9, 29.1, 30.3, 30.4, 31.3, 31.7, 31.8, 32.0, 37.2, 37.3, 37.4, 38.3, 38.5, 39.0, 52.9, 53.0, 53.1, 53.6, 53.7, 170.5, 170.6, 170.7, 171.8, 171.9, 172.0, 176.4 ppm; MS: m/z : 1136.6 $[M+H]^+$, 1158.8 $[M+Na]^+$, 1170.5 $[M+Cl]^-$; HRMS calcd for $C_{61}H_{125}N_{13}O_6$ $[M+H]^+$: 1136.9949; found: 1136.9958.

N-[2-[*N,N*-Bis(2-[*N*-[(2*S*)-2,6-amino-1-oxohexyl]amino)ethyl]amino]ethyl]-*N'*-(6-[*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino]-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl)-2-hexadecylpropandiamide (**lipid 6b**), $C_{63}H_{129}N_{13}O_6$; Yield: 97% (method b); $R_f=0.10$ ($CHCl_3/MeOH/NH_3$, 35:65:15, v/v/v); 1H NMR (500 MHz, D_2O , 60 °C): $\delta=0.86-0.88$ (m, 6H; $2 \times CH_3$), 1.31–1.94 (m, 78H; $NHCH_2(CH_2)_{12}CH_3$, $(CH_2)_{13}CH_3$, $3 \times (CH_2)_3CH_2NH_2$, $(CH_2)_3CH_2NHCO$), 2.71–2.74 (m, 6H; $CH_2N(CH_2CH_2NH_2)_2$), 2.83–2.85 (m, 6H; $3 \times CH_2NH_2$), 3.17–3.42 (m, 14H; $5 \times CH_2NHCO$, $3 \times CHNH_2CH_2$, $COCH(hexadecyl)CO$), 4.34–4.37 ppm (m, 1H; $COCH(NHCO)CH_2$); ^{13}C NMR (125 MHz, D_2O , 60 °C): $\delta=14.0$, 14.1, 22.7, 22.8, 22.9, 23.3, 27.3, 27.4, 27.5, 27.7, 28.8, 29.7, 29.9, 30.0, 30.2, 30.3, 30.8, 31.5, 32.17, 32.23, 34.7, 37.5, 37.6, 37.8, 37.9, 39.4, 39.7, 40.36, 40.41, 53.4, 53.5, 54.4, 55.1, 171.2, 171.3, 171.4, 173.1, 177.5, 177.6 ppm; MS: m/z : 1165.0 $[M+H]^+$, 1187.8 $[M+Na]^+$, 1163.1 $[M-H]^-$, 1199.0 $[M+Cl]^-$; HRMS calcd for $C_{63}H_{130}N_{13}O_6$ $[M+H]^+$: 1165.0262, found: 1165.0272.

N-[2-[*N,N*-Bis(2-[*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino)ethyl]amino]ethyl]-*N'*-(6-[*N*-[(2*S*)-2,6-diamino-1-oxohexyl]amino]-1-[*N*-(9*Z*)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl)-2-tetradecylpropandiamide (**lipid 6c**), $C_{65}H_{131}N_{13}O_6$; Yield: 21% (method a), 97% (method b); $R_f=0.14$ ($CHCl_3/MeOH/NH_3$, 35:65:15, v/v/v); 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27 °C): $\delta=0.88$ (t, $^3J(H,H)=6.6$ Hz, 6H; $2 \times CH_3$), 1.25–1.88 (m, 74H; $NHCH_2(CH_2)_6CH_2CH=CHCH_2(CH_2)_6CH_3$, $(CH_2)_{13}CH_3$, $3 \times (CH_2)_3CH_2NH_2$, $(CH_2)_3CH_2NHCO$), 1.94–2.03 (m, 4H; $CH_2CH=CHCH_2$), 2.54–2.59 (m, 6H; $CH_2N(CH_2CH_2NH_2)_2$), 2.68 (t, $^3J(H,H)=5.3$ Hz, 6H; $3 \times CH_2NH_2$), 3.12–3.36 (m, 14H; $5 \times CH_2NHCO$, $3 \times CHNH_2CH_2$, $COCH(tetradecyl)CO$), 4.28–4.32 (m, 1H; $COCH(NHCO)CH_2$), 5.33–5.39 (m, 2H; $CH=CH$), 7.18–7.21/7.41–7.44/7.55–7.58/7.66–7.68/7.83–7.86 ppm (5 × m, 6H; $6 \times NHCO$); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$, 27 °C): $\delta=13.5$, 22.2, 22.6, 22.7, 26.6, 26.8, 27.2, 28.5, 28.5, 28.89, 28.94, 29.04, 29.09, 29.14, 29.3, 31.2, 32.15, 32.24, 32.3, 34.59, 34.66, 37.1, 37.3, 38.4, 39.2, 40.9, 52.9, 53.0, 53.3, 53.5, 53.6, 54.5, 54.6, 129.2, 129.4, 170.59, 170.63, 171.3, 171.4, 175.5, 175.6, 175.7 ppm; MS: m/z : 1190.9 $[M+H]^+$, 596.2 $[M+2H]^{2+}$, 397.8 $[M+3H]^{3+}$, 1212.9 $[M+Na]^+$, 1224.9 $[M+Cl]^-$; HRMS calcd for $C_{65}H_{132}N_{13}O_6$ $[M+H]^+$: 1191.0418, found: 1191.0427.

Sample preparation: The pure lipid was suspended in 10 mM carbonate buffer (pH 10, $Na_2CO_3/NaHCO_3$) to a concentration of 1 mg mL⁻¹. The samples were heated twice to 80 °C and thoroughly mixed using a vortex, followed by 20 min of sonication at 60 °C. Finally, the samples were degassed for 15 min.

DSC: The DSC measurements were performed on a MicroCal VP-DSC apparatus (MicroCal Inc., Northampton, MA, USA). The heating rate was 60 or 20 K h⁻¹, each heating and cooling scan was repeated to confirm reproducibility, and the first scan was disregarded. The observed temperature range was from 2 to 95 °C. The reference cell was filled with pure solvent (carbonate buffer, pH 10). The buffer–buffer baseline was

subtracted from the thermograms of the samples, and the DSC scans were evaluated by using MicroCal Origin 8.0 software.

DLS: The particle size was measured in carbonate buffer of pH 10 by photon correlation spectroscopy on a Zetasizer Nano-ZS ZEN3600 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK) with a sample refractive index of 1.33 and a viscosity of 0.8872 MPas at 25 °C. Every sample was measured three times. Each run consisted of 15 consecutive scans with a duration of 20 s. Results shown are the average of these three values. The correlation data were evaluated with ALV-Correlation software version 3.0 using an exponential regularised fit (see Supporting Information). We used a regularised exponential fit for the analysis of the correlation functions obtained because the commonly used cumulants analysis is restricted to monodisperse systems with radii between 30 and 100 nm.^[56]

TEM: The samples were suspended with 10 mM carbonate buffer (pH 10, $Na_2CO_3/NaHCO_3$) to a final concentration of 0.05 mg mL⁻¹ and were sonicated at 60 °C for 10 min. The negatively stained samples were prepared by spreading 5 µL of the dispersion onto a Cu grid coated with a formvar film. After 1 min, excess liquid was blotted off with filter paper and aqueous uranyl acetate (1%, 5 µL) was placed onto the grid and drained off after 1 min. The dried specimens were examined with a Zeiss EM900 transmission electron microscope.

Acknowledgements

We thank Dr. Christian Ihling and Prof. Dr. Andrea Sinz (Institute of Pharmacy, Martin-Luther-University, Halle (Saale), Germany) for the high-resolution mass spectrometry analyses. The support of Dr. Gerd Hause (Biocenter, Martin-Luther-University, Halle-Wittenberg) by providing access to the electron microscope facility is greatly appreciated. Furthermore, we thank Tino Heimburg (Institute of Pharmacy, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg) for the calculation of the energy minimized lipid structures.

- [1] a) M. A. Mintzer, E. E. Simanek, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 259–302; b) S. Bhattacharya, A. Bajaj, *Chem. Commun.* **2009**, 4632–4656.
- [2] C. R. Dass, P. F. M. Choong, *Cancer Cell Int.* **2006**, *6*, 17.
- [3] a) C. Lonz, M. Vandenbranden, J.-M. Ruyschaert, *Prog. Lipid Res.* **2008**, *47*, 340–347; b) A. Joseph, N. Itskovitz-Cooper, S. Samira, O. Flasterstein, H. Eliyahu, D. Simberg, I. Goldwaser, Y. Barenholz, E. Kedar, *Vaccine* **2006**, *24*, 3990–4006; c) C. Barnier Quer, A. Elsharkawy, S. Romeijn, A. Kros, W. Jiskoot, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, *81*, 294–302.
- [4] A. Kanazawa, T. Ikeda, T. Endo, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 945–952.
- [5] a) A. El-Aneedy, *J. Controlled Release* **2004**, *94*, 1–14; b) T. P. O'Connor, R. G. Crystal, *Nat. Rev. Genet.* **2006**, *7*, 261–276.
- [6] a) J. Li, L. Huang, *Nanomedicine* **2010**, *5*, 1483–1486; b) A. A. Metwally, I. S. Blagbrough, *Pharmaceutics* **2011**, *3*, 406–424; c) J. Sparks, G. Slobodkin, M. Matar, R. Congo, D. Ulkoski, A. Rea-Ramsey, C. Pence, J. Rice, D. McClure, K. J. Polach, E. Brunhoeber, L. Wilkinson, K. Wallace, K. Anwer, J. G. Fewell, *J. Controlled Release* **2012**, *158*, 269–276.
- [7] See, http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/Vol_2012, Wiley, **2012**, Charts & Tables, Vectors.
- [8] a) M. A. Kay, J. C. Glorioso, L. Naldini, *Nat. Med.* **2001**, *7*, 33–40; b) Y. Seow, M. J. Wood, *Mol. Ther.* **2009**, *17*, 767–777.
- [9] L. Xu, T. Anchordoquy, *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100*, 38–52.
- [10] a) M. Heinze, G. Brezesinski, B. Dobner, A. Langner, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 696–708; b) C. Wölk, M. Heinze, P. Kreideweiß, M. Dittrich, G. Brezesinski, A. Langner, B. Dobner, *Int. J. Pharm.* **2011**, *409*, 46–56.
- [11] a) M. Dittrich, M. Bottecher, J. S. L. Oliveira, B. Dobner, H. Moehwald, G. Brezesinski, *Soft Matter* **2011**, *7*, 10162–10173; b) M. Dittrich, M. Heinze, C. Wölk, S. S. Funari, B. Dobner, H. Moehwald, G.

- Brezesinski, *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 2328–2337; c) M. N. Antipina, B. Dobner, O. V. Konovalov, V. L. Shapovalov, G. Brezesinski, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 13845–13850.
- [12] H. Lv, S. Zhang, B. Wang, S. Cui, J. Yan, *J. Controlled Release* **2006**, *114*, 100–109.
- [13] a) T. G. Park, J. H. Jeong, S. W. Kim, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, *58*, 467–486; b) K. Luger, A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent, T. J. Richmond, *Nature* **1997**, *389*, 251–260.
- [14] T. W. Green, P. G. M. Wuts in *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2nd ed., Wiley, **1991**, p. 318.
- [15] T. H. øeg-Jensen, M. H. Jakobsen, A. Holm, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 6387–6390.
- [16] N. Zinieris, L. Leondiadis, N. Ferderigos, *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 4–6.
- [17] a) B. Dobner, P. Nuhn, A. Büge, *Z. Chem.* **1988**, *28*, 299–300; b) D. E. Floyd, S. E. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, *69*, 2354–2355; c) J. Haldar, P. Kondaiiah, S. Bhattacharya, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3823–3831; d) C. Milite, S. Castellano, R. Benedetti, A. Tosco, C. Ciliberti, C. Vicidomini, L. Bouilly, G. Franci, L. Altucci, A. Mai, G. Sbardella, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3690–3701; e) P. L. Anelli, F. Montanari, S. Quici, G. Ciani, A. Sironi, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5292–5298; f) K. Prasad, H. Estermann, C.-P. Chen, O. Repic, G. E. Hardtmann, *Tetrahedron: Asymmetry* **1990**, *1*, 421–424.
- [18] D. S. Breslow, E. Baumgarten, C. R. Hauser, *J. Am. Chem. Soc.* **1944**, *66*, 1286–1288.
- [19] a) L. Fauconnot, F. Robert, R. Villard, F. Dionisi, *Chem. Phys. Lipids* **2006**, *139*, 125–136; b) E. Frérot, J. Coste, A. Pantaloni, M.-N. Dufour, P. Jouin, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 259–270.
- [20] G. W. Anderson, J. E. Zimmerman, F. M. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1839–1842.
- [21] G. L. Stahl, R. Walter, C. W. Smith, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2285–2286.
- [22] F. Cavelier, C. Enjalbal, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5131–5134.
- [23] M. Prashad, D. Har, B. Hu, H.-Y. Kim, M. J. Girgis, A. Chaudhary, O. Repič, T. J. Blacklock, W. Marterer, *Org. Process Res. Dev.* **2004**, *8*, 330–340.
- [24] J. R. McDermott, N. L. Benoiton, *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 2562–2570.
- [25] a) J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205–208; b) K. Prasad, K. Bharathi, B. B. Haseena, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2011**, *8*, 108–119.
- [26] W. E. Stewart, T. H. Siddall, *Chem. Rev.* **1970**, *70*, 517–551.
- [27] a) M. Llinas, D. M. Wilson, M. P. Klein, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 6846–6850; b) A. Blume, W. Huebner, G. Messner, *Biochemistry* **1988**, *27*, 8239–8249.
- [28] D. Pawlowska, S. Tassler, G. Brezesinski, unpublished results.
- [29] G. Cevc, *Biochemistry* **1991**, *30*, 7186–7193.
- [30] G. Cevc, *Biochemistry* **1987**, *26*, 6305–6310.
- [31] a) P. Garidel, C. Johann, A. Blume, *Biophys. J.* **1997**, *72*, 2196–2210; b) P. Garidel, C. Johann, A. Blume, *Eur. Biophys. J. Biophys.* **2011**, *40*, 891–905; c) R. N. A. H. Lewis, S. Tristram-Nagle, J. F. Nagle, R. N. McElhaney, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2001**, *1510*, 70–82; d) K. Tada, K. Saito, M. Goto, N. Tamai, H. Matsuki, S. Kaneshina, *Biophys. Chem.* **2008**, *138*, 36–41; e) E. N. Serrallach, G. H. De Haas, G. G. Shipley, *Biochemistry* **1984**, *23*, 713–720.
- [32] S. R. Sarker, S. Arai, M. Murate, H. Takahashi, M. Takata, T. Kobayashi, S. Takeoka, *Int. J. Pharm.* **2012**, *422*, 364–373.
- [33] a) V. Gopal, J. Xavier, M. Z. Kamal, S. Govindarajan, M. Takafuji, S. Soga, T. Ueno, H. Ihara, N. M. Rao, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2244–2254; b) M. J. Blandamer, B. Briggs, P. M. Cullis, J. B. F. N. Engberts, R. I. Norman, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1996**, *92*, 3163–3164; c) A. Blume, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1979**, *557*, 32–44; d) J. M. Boggs, *Biochem. Cell Biol.* **1986**, *64*, 50–57; e) J. M. Boggs, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr.* **1987**, *906*, 353–404.
- [34] P. R. Majhi, A. Blume, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 10753–10763.
- [35] J. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, 2nd ed., Academic Press, San Diego, **1991**, p. 535–561.
- [36] J. Pencer, F. R. Hallett, *Langmuir* **2003**, *19*, 7488–7497.

Received: December 20, 2012

Revised: June 25, 2012

Published online: August 9, 2013

CHEMISTRY
A EUROPEAN JOURNAL

Supporting Information

© Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 69451 Weinheim, 2013

**General Synthesis and Physicochemical Characterisation of a Series of
Peptide-Mimic Lysine-Based Amino-Functionalised Lipids**

**Christian Wölk,^[a] Simon Drescher,^[a] Annette Meister,^[b] Alfred Blume,^[b]
Andreas Langner,^[a] and Bodo Dobner*^[a]**

chem_201204529_sm_miscellaneous_information.pdf

11a-c

Chemical Characterization of Boc-protected Lipid Precursors

9a-c

N-(2-Aminoethyl)-*N'*-[1-oxo-6-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-[*N*-(tetradecyl)amino]hexan-(2*S*)-2-yl]-2-tetradecylpropanoic acid (9a) C₄₄H₈₇N₃O₅; Yield: 87%; R_f = 0.74 (CHCl₃/MeOH/NH₃, 80/20/2, v/v/v); m.p. 105-110°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27°C): δ = 0.88 (t, ³J(H,H) = 6.9 Hz, 6H; 2×CH₂CH₃), 1.25-1.84 (m, 65H; NHCH₂(CH₂)₂CH₃, (CH₂)₁₃CH₃, (CH₂)₂CH₂NHBoc, OC(CH₃)₃), 2.89-2.93 (m, 2H; CH₂NH₂), 3.03-3.41 (m, 7H; CH₂NHBoc, 2×CH₂NHCO, COCH(tetradecyl)CO), 4.27-4.36 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 4.75 (s, 1H; *N*HBoC), 6.39-6.45/7.33-7.35 (2×m, 2H; 2×*N*HCO), 7.08-7.15 ppm (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂); MS: *m/z*: 767 [M+H]⁺, 1331 [2M+H]⁺; HRMS calcd for C₄₄H₈₈N₃O₅ [M+H]⁺: 766.6780; found: 766.6768.

N-(2-Aminoethyl)-2-hexadecyl-*N'*-[1-oxo-6-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-[*N*-(tetradecyl)amino]hexan-(2*S*)-2-yl]propanoic acid (9b) C₆₄H₁₀₁N₃O₅; Yield: 96%; R_f = 0.64 (CHCl₃/MeOH/NH₃, 80/20/2, v/v/v); m.p. 118-120°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27°C): δ = 0.88 (t, ³J(H,H) = 6.9 Hz, 6H; 2×CH₂CH₃), 1.25-1.86 (m, 69H; NHCH₂(CH₂)₂CH₃, (CH₂)₁₃CH₃, (CH₂)₂CH₂NHBoc, OC(CH₃)₃), 2.82-2.85 (m, 2H; CH₂NH₂), 3.02-3.35 (m, 7H; CH₂NHBoc, 2×CH₂NHCO, COCH(hexadecyl)CO), 4.30-4.34 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 4.72 (s, 1H; *N*HBoC), 6.26-6.30/6.93-6.94 (2×m, 2H; 2×*N*HCO), 7.08-7.09 ppm (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂); MS: *m/z*: 795 [M+H]⁺, 1589 [2M+H]⁺, 818 [M+Na]⁺; elemental analysis calcd (%) for C₆₄H₁₀₁N₃O₅: C 69.56, H 11.55, N 8.82; found: C 69.20, H 11.25, N 8.56.

N-(2-Aminoethyl)-*N'*-[1-oxo-6-[*N*-(9*Z*-octadec-9-enyl)amino]-1-oxo-6-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]hexan-(2*S*)-2-yl]-2-tetradecylpropanoic acid (9c) C₄₈H₉₃N₃O₅; Yield: 87%; R_f = 0.78 (CHCl₃/MeOH/NH₃, 80/20/2, v/v/v); m.p. 101-103°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27°C): δ = 0.88 (t, ³J(H,H) = 6.9 Hz, 6H; 2×CH₂CH₃), 1.24-1.86 (m, 65H; NHCH₂(CH₂)₂CH=CHCH₂(CH₂)₆CH₃, (CH₂)₁₃CH₃, (CH₂)₂CH₂NHBoc, OC(CH₃)₃), 1.96-2.03 (m, 4H; CH₂CH=CHCH₂), 2.90-2.94 (m, 2H; CH₂NH₂), 3.05-3.49 (m, 7H; CH₂NHBoc, 2×CH₂NHCO, COCH(tetradecyl)CO), 4.28-4.35 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 4.74 (s, 1H; *N*HBoC), 5.32-5.38 (m, 2H; CH=CH), 6.36-6.46/7.54-7.56 (2×m, 2H; 2×*N*HCO), 7.15-7.36 ppm (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂); MS: *m/z*: 821 [M+H]⁺; elemental analysis calcd (%) for C₄₈H₉₃N₃O₅·H₂O: C 68.77, H 11.42, N 8.35; found: C 68.58, H 11.20, N 8.51.

12a-c

N-[2-(*N'*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl]amino)ethyl]-*N'*-[6-(*N'*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl]amino-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl]-2-tetradecylpropanoic acid (12a) C₇₁H₁₃₃N₉O₁₃; Yield: 85%; R_f = 0.74 (CHCl₃/MeOH, 9/1, v/v); m.p. 135-140°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27°C): δ = 0.87 (t, ³J(H,H) = 6.9 Hz, 6H; 2×CH₂CH₃), 1.23-1.85 (m, 104H; NHCH₂(CH₂)₂CH₃, (CH₂)₁₃CH₃, 2×(CH₂)₂CH₂NHBoc, (CH₂)₂CH₂NHCO, 4×OC(CH₃)₃), 3.10-3.51 (m, 13H; 4×CH₂NHCO, 2×CH₂NHBoc, COCH(tetradecyl)CO), 4.06-4.12 (m, 2H; 2×COCHNHBocCH₂), 4.29-4.36 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 4.63-4.88 (m, 2H; 2×*N*HBoC ε), 5.40-5.58 (m, 2H; 2×*N*HBoC α), 6.24-6.25/6.60-6.79/7.09-7.22/7.31-7.55 ppm (4×m, 5H; 5×*N*HCO); MS: *m/z*: 1345 [M+Na]⁺, 1357 [M+Cl]⁻; elemental analysis calcd (%) for C₇₁H₁₃₃N₉O₁₃: C 64.46, H 10.29, N 9.53; found: C 64.79, H 10.45, N 9.47.

N-[2-(*N'*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl]amino)ethyl]-*N'*-[6-(*N'*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl]amino-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl]-2-hexadecylpropanoic acid (12b) C₇₃H₁₃₉N₉O₁₃; Yield: 86%; R_f = 0.72 (CHCl₃/MeOH, 9/1, v/v); m.p. 140-145°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27°C): δ = 0.88 (t, ³J(H,H) = 6.9 Hz, 6H; 2×CH₂CH₃), 1.23-1.84 (m, 108H; NHCH₂(CH₂)₂CH₃, (CH₂)₁₃CH₃, 2×(CH₂)₂CH₂NHBoc, (CH₂)₂CH₂NHCO, 4×OC(CH₃)₃), 3.08-3.38 (m, 13H; 4×CH₂NHCO, 2×CH₂NHBoc, COCH(hexadecyl)CO), 4.06-4.08 (m, 2H; 2×COCHNHBocCH₂), 4.33-4.36 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 4.75-4.88 (m, 2H; 2×*N*HBoC ε), 5.43-5.66 (m, 2H; 2×*N*HBoC α), 6.64-6.77/7.15-7.22/7.33-7.58 ppm (3×m, 5H; 5×*N*HCO); MS: *m/z*: 1351 [M+H]⁺, 1373 [M+Na]⁺, 1385 [M+Cl]⁻; elemental analysis calcd (%) for C₇₃H₁₃₉N₉O₁₃: C 64.90, H 10.37, N 9.33; found: C 64.92, H 10.03, N 9.27.

N-[2-(*N'*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl]amino)ethyl]-*N'*-[6-(*N'*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl]amino-1-oxo-1-[*N*-(9*Z*-octadec-9-enyl)amino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-2-tetradecylpropanoic acid (12c) C₉₃H₁₄₁N₉O₁₃; Yield: 87%; R_f = 0.78 (CHCl₃/MeOH, 9/1); m.p. 132-135°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27°C): δ = 0.88 (t, ³J(H,H) = 6.7 Hz, 6H; 2×CH₂CH₃), 1.23-1.84 (m, 104H; NHCH₂(CH₂)₂CH=CHCH₂(CH₂)₆CH₃, (CH₂)₁₃CH₃, 2×(CH₂)₂CH₂NHBoc, (CH₂)₂CH₂NHCO, 4×OC(CH₃)₃), 1.95-2.00 (m, 4H; CH₂CH=CHCH₂), 3.10-3.40 (m, 13H; 4×CH₂NHCO, 2×CH₂NHBoc, COCH(tetradecyl)CO), 4.06-4.11 (m, 2H; 2×COCHNHBocCH₂), 4.34-4.37 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 4.72-4.87 (m, 2H; 2×*N*HBoC ε), 5.31-5.37 (m, 2H; CH=CH), 5.44-5.66 (m, 2H; 2×*N*HBoC α), 6.63-6.77/7.11-

N-[6-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-[*N*-(tetradecyl)amino]hexan-(2*S*)-2-yl]-*N'*-[2-(*N'*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl]amino)ethyl]-2-tetradecylpropanoic acid (11a) C₆₀H₁₁₃N₃O₁₀; Yield: 91%; R_f = 0.70 (CHCl₃/MeOH, 9/1, v/v); m.p. 145-147°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27°C): δ = 0.88 (t, ³J(H,H) = 6.9 Hz, 6H; 2×CH₂CH₃), 1.23-1.86 (m, 89H; NHCH₂(CH₂)₂CH₃, (CH₂)₁₃CH₃, 2×(CH₂)₂CH₂NHBoc, 3×OC(CH₃)₃), 3.02-3.50 (m, 11H; 3×CH₂NHCO, 2×CH₂NHBoc, COCH(tetradecyl)CO), 4.05-4.06 (m, 1H; COCHNHBocCH₂), 4.29-4.33 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 4.73-4.78 (m, 2H; 2×*N*HBoC ε), 5.43-5.44 (m, 1H; *N*HBoC α), 6.52-6.59/6.92-6.93/7.12-7.15/7.47-7.51 ppm (4×m, 4H; 4×*N*HCO); MS: *m/z*: 1117 [M+Na]⁺, 1129 [M+Cl]⁻; elemental analysis calcd (%) for C₆₀H₁₁₃N₃O₁₀: C 65.84, H 10.59, N 8.96; found: C 65.86, H 10.29, N 8.83.

N-[6-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-[*N*-(tetradecyl)amino]hexan-(2*S*)-2-yl]-*N'*-[2-(*N'*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl]amino)ethyl]-2-hexadecylpropanoic acid (11b) C₆₂H₁₁₉N₃O₁₀; Yield: 88%; R_f = 0.86 (CHCl₃/MeOH, 9/1, v/v); m.p. 152-157°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27°C): δ = 0.88 (t, ³J(H,H) = 7.0 Hz, 6H; 2×CH₂CH₃), 1.23-1.86 (m, 93H; NHCH₂(CH₂)₂CH₃, (CH₂)₁₃CH₃, 2×(CH₂)₂CH₂NHBoc, 3×OC(CH₃)₃), 3.06-3.45 (m, 11H; 3×CH₂NHCO, 2×CH₂NHBoc, COCH(hexadecyl)CO), 4.05-4.06 (m, 1H; COCHNHBocCH₂), 4.27-4.34 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 4.71-4.82 (m, 2H; 2×*N*HBoC ε), 5.32-5.41 (m, 1H; *N*HBoC α), 6.45-6.51/6.90-6.91/7.08-7.09/7.44-7.50 ppm (4×m, 4H; 4×*N*HCO); MS: *m/z*: 1145 [M+Na]⁺, 1157 [M+Cl]⁻; elemental analysis calcd (%) for C₆₂H₁₁₉N₃O₁₀: C 66.33, H 10.68, N 8.73; found: C 66.30, H 10.92, N 8.61.

N-[6-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-[*N*-(9*Z*-octadec-9-enyl)amino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-*N'*-[2-(*N'*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl]amino)ethyl]-2-tetradecylpropanoic acid (11c) C₆₄H₁₂₁N₃O₁₀; Yield: 97%; R_f = 0.67 (CHCl₃/MeOH, 9/1, v/v); m.p. 134-137°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27°C): δ = 0.86 (t, ³J(H,H) = 6.9 Hz, 6H; 2×CH₂CH₃), 1.21-1.84 (m, 89H; NHCH₂(CH₂)₂CH=CHCH₂(CH₂)₆CH₃, (CH₂)₁₃CH₃, 2×(CH₂)₂CH₂NHBoc, 3×OC(CH₃)₃), 1.94-2.00 (m, 4H; CH₂CH=CHCH₂), 3.01-3.48 (m, 11H; 3×CH₂NHCO, 2×CH₂NHBoc, COCH(tetradecyl)CO), 4.06-4.08 (m, 1H; COCHNHBocCH₂), 4.31-4.35 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 4.79-4.85 (m, 2H; 2×*N*HBoC ε), 5.33-5.36 (m, 2H; CH=CH), 5.39-5.51 (m, 1H; *N*HBoC α), 6.81-6.82/6.97-7.0/7.32-7.33/7.57-7.59 ppm (4×m, 4H; 4×*N*HCO); MS: *m/z*: 1171 [M+Na]⁺; elemental analysis calcd (%) for C₆₄H₁₂₁N₃O₁₀: C 66.92, H 10.62, N 8.54; found: C 66.78, H 10.26, N 8.46.

7.21/7.33-7.55 ppm (3×m, 5H; 5×*N*HCO); MS: *m/z*: 1376 [M+H]⁺, 1399 [M+Na]⁺, 1411 [M+Cl]⁻; elemental analysis calcd (%) for C₇₃H₁₄₁N₉O₁₃: C 65.42, H 10.32, N 9.15; found: C 65.07, H 10.34, N 9.16.

13a-c

N-[2-[*N,N*-bis(2-aminoethyl)amino]ethyl]-*N'*-[1-oxo-6-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-[*N*-(tetradecyl)amino]hexan-(2*S*)-2-yl]-2-tetradecylpropanoic acid (13a) C₄₈H₉₇N₅O₅; Yield: 94%; R_f = 0.33 (CHCl₃/MeOH/NH₃, 80/20/2, v/v/v); m.p. 78-82°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27°C): δ = 0.87 (t, ³J(H,H) = 6.9 Hz, 6H; 2×CH₂CH₃), 1.23-1.88 (m, 65H; NHCH₂(CH₂)₂CH₃, (CH₂)₁₃CH₃, (CH₂)₂CH₂NHBoc, OC(CH₃)₃), 2.48-2.61 (m, 6H; CH₂N(CH₂CH₂NH₂)₂), 2.75-2.78 (m, 4H; 2×CH₂NH₂), 3.04-3.35 (m, 7H; CH₂NHBoc, 2×CH₂NHCO, COCH(tetradecyl)CO), 4.32-4.39 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 4.83/4.97 (2×s, 1H; *N*HBoC), 7.35/7.51 (2×s, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 6.73/7.47/8.41/8.29 ppm (4×s, 2H; 2×*N*HCO); MS: *m/z*: 853 [M+H]⁺, 851 [M-H]⁻, 887 [M+Cl]⁻; elemental analysis calcd (%) for C₄₈H₉₇N₅O₅·H₂O: C 66.24, H 11.47, N 11.27; found: C 66.11, H 11.10, N 11.35.

N-[2-[*N,N*-bis(2-aminoethyl)amino]ethyl]-2-hexadecyl-*N'*-[1-oxo-6-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-[*N*-(tetradecyl)amino]hexan-(2*S*)-2-yl]propanoic acid (13b) C₅₀H₁₀₁N₅O₅; Yield: 95%; R_f = 0.36 (CHCl₃/MeOH/NH₃, 80/20/2, v/v/v); m.p. 93-97°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27°C): δ = 0.88 (t, ³J(H,H) = 6.9 Hz, 6H; 2×CH₂CH₃), 1.23-1.89 (m, 69H; NHCH₂(CH₂)₂CH₃, (CH₂)₁₃CH₃, (CH₂)₂CH₂NHBoc, OC(CH₃)₃), 2.50-2.62 (m, 6H; CH₂N(CH₂CH₂NH₂)₂), 2.76-2.80 (m, 4H; 2×CH₂NH₂), 3.05-3.39 (m, 7H; CH₂NHBoc, 2×CH₂NHCO, COCH(hexadecyl)CO), 4.31-4.39 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 4.81/4.94 (2×s, 1H; *N*HBoC), 7.29/7.44 (2×s, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 6.67/7.37/8.18/8.26 ppm (4×s, 2H; 2×*N*HCO); MS: *m/z*: 881 [M+H]⁺, 879 [M-H]⁻, 915 [M+Cl]⁻; elemental analysis calcd (%) for C₅₀H₁₀₁N₅O₅·H₂O: C 66.85, H 11.56, N 10.91; found: C 66.88, H 11.28, N 10.82.

N-[2-[*N,N*-bis(2-aminoethyl)amino]ethyl]-*N'*-[1-oxo-6-[*N*-(9*Z*-octadec-9-enyl)amino]-1-oxo-6-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]hexan-(2*S*)-2-yl]-2-tetradecylpropanoic acid (13c) C₅₂H₁₀₅N₅O₅; Yield: 95%; R_f = 0.33 (CHCl₃/MeOH/NH₃, 80/20/2, v/v/v); m.p. 68-72°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27°C): δ = 0.85 (t, ³J(H,H) = 6.8 Hz, 6H; 2×CH₂CH₃), 1.21-1.86 (m, 65H; NHCH₂(CH₂)₂CH=CHCH₂(CH₂)₆CH₃, (CH₂)₁₃CH₃, (CH₂)₂CH₂NHBoc, OC(CH₃)₃), 1.93-1.98 (m, 4H; CH₂CH=CHCH₂), 2.44-2.56 (m, 6H; CH₂N(CH₂CH₂NH₂)₂), 2.71-2.76 (m, 4H; 2×CH₂NH₂), 3.03-3.34 (m, 7H; CH₂NHBoc, 2×CH₂NHCO, COCH(tetradecyl)CO), 4.31-4.36 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 4.89/5.07 (2×s, 1H; *N*HBoC), 5.29-5.34 (m, 2H; CH=CH),

!!! Die hier verwendeten Abkürzungen der Verbindungen entsprechen nicht den Abkürzungen der Dissertationsschrift sondern richtet sich nach Wölk et al., Chemistry – A European Journal. 2013, 19, 12824-12838. !!!

7.51/7.72 (2×s, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 6.84/7.45/8.08 ppm (3×s, 2H; 2×NHCO); MS: *m/z*: 907 [M+H]⁺; elemental analysis calcd (%) for C₅₂H₁₀₂N₇O₃·H₂O: C 67.56, H 11.45, N 10.61; found: C 67.20, H 11.13, N 10.77.

15a-c

N-(2-*N,N*-Bis[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)-amino]ethyl]amino]ethyl)-*N'*-[6-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl]-2-tetradecylpropan-diamide (15a) C₈₀H₁₅₃N₁₁O₁₅; Yield: 95 %; R_f = 0.77 (CHCl₃/MeOH, 9/1, v/v); m.p. 116-120°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27°C): δ = 0.87 (t, ³J(H,H) = 6.9 Hz, 6H; 2×CH₂CH₃), 1.24-1.82 (m, 113H; NHCH₂(CH₂)₁₂CH₃, (CH₂)₁₃CH₃, 3×(CH₂)₃CH₂NHBoc, 5×OC(CH₃)₃), 2.43-2.59 (m, 6H; CH₂N(CH₂CH₂NH)₂), 3.07-3.31 (m, 15H; 4×CH₂NHCO, 3×CH₂NHBoc, COCH(tetradecyl)CO), 4.19-4.31 (m, 2H; 2×COCHNHBocCH₂), 4.40-4.41 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 4.82-5.16 (m, 3H; 3×NHBoc ε), 5.58-5.60 (m, 2H; 2×NHBoc α), 6.72-6.74/7.50-7.56/7.71-7.73 ppm (3m, 5H; 5×NHCO); MS: *m/z*: 1509 [M+H]⁺, 1532 [M+Na]⁺, 1544 [M+Cl]⁺; elemental analysis calcd (%) for C₈₀H₁₅₃N₁₁O₁₅: C 63.67, H 10.22, N 10.21; found: C 63.69, H 9.90, N 10.04.

N-(2-*N,N*-Bis[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)-amino]ethyl]amino]ethyl)-*N'*-[6-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl]-2-hexadecylpropan-diamide (15b) C₈₂H₁₅₇N₁₁O₁₅; Yield: 84 %; R_f = 0.83 (CHCl₃/MeOH, 9/1, v/v); m.p. 111-117°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27°C): δ = 0.87 (t, ³J(H,H) 6.8 Hz, 6H; 2×CH₂CH₃), 1.25-1.91 (m, 117H; NHCH₂(CH₂)₁₂CH₃, (CH₂)₁₃CH₃, 3×(CH₂)₃CH₂NHBoc, 5×OC(CH₃)₃), 2.47-2.57 (m, 6H; CH₂N(CH₂CH₂NH)₂), 3.08-3.34 (m, 15H; 4×CH₂NHCO, 3×CH₂NHBoc, COCH(hexadecyl)CO), 4.20-4.31 (m, 2H; 2×COCHNHBocCH₂), 4.40-4.41 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 4.83-5.20 (m, 3H; 3×NHBoc ε), 5.60-5.69 (m, 2H; 2×NHBoc α), 6.72-6.73/7.51-7.75 ppm (2m, 5H; 5×NHCO); MS: *m/z*: 1537 [M+H]⁺, 1559 [M+Na]⁺, 1572 [M+Cl]⁺; elemental analysis calcd (%) for C₈₂H₁₅₇N₁₁O₁₅: C 64.07, H 10.29, N 10.02; found: C 63.74, H 9.98, N 9.87.

N-(2-*N,N*-Bis[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)-amino]ethyl]amino]ethyl)-*N'*-[6-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-[[*N*-(9*Z*)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-2-tetradecylpropan-diamide (15c) C₈₄H₁₅₉N₁₁O₁₅; Yield: 95 %; R_f = 0.69 (CHCl₃/MeOH, 9/1, v/v); m.p. 105-108°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27°C): δ = 0.88 (t, ³J(H,H) = 6.7 Hz, 6H; 2×CH₂CH₃), 1.25-1.85 (m, 113H;

N-(2-*N,N*-Bis[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)-amino]ethyl]amino]ethyl)-*N'*-[6-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino]-1-[[*N*-(9*Z*)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2*S*)-2-yl]-2-tetradecylpropan-diamide (16c) C₉₅H₁₇₉N₁₃O₁₈; Yield: 93 %; R_f = 0.72 (CHCl₃/MeOH, 9/1, v/v); m.p. 93-98°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27°C): δ = 0.84 (t, ³J(H,H) = 6.8 Hz, 6H; 2×CH₂CH₃), 1.20-1.87 (m, 128H; NHCH₂(CH₂)₆CH₂CH=CHCH₂(CH₂)₆CH₃, (CH₂)₁₃CH₃, 3×(CH₂)₃CH₂NHBoc, (CH₂)₃CH₂NHCO, 6×OC(CH₃)₃), 1.90-1.98 (m, 4H; CH₂CH=CHCH₂), 2.40-2.63 (m, 6H; CH₂N(CH₂CH₂NH)₂), 2.94-3.55 (m, 17H; 5×CH₂NHCO, 3×CH₂NHBoc, COCH(tetradecyl)CO), 4.04-4.41 (m, 3H; 3×COCHNHBocCH₂), 4.42-4.51 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 4.75-5.00 (m, 3H; 3×NHBoc ε), 5.28-5.34 (m, 2H; CH=CH), 5.49-5.65 (m, 3H; 3×NHBoc α), 6.11-6.26/6.69-6.72/7.01-7.03/7.48-7.68 (4m, 5H; 5×NHCO), 8.03-8.15 ppm (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂); MS: *m/z*: 1791 [M+H]⁺, 1826 [M+Cl]⁺; elemental analysis calcd (%) for C₉₅H₁₇₉N₁₃O₁₈: C 63.69, H 10.07, N 10.16; found: C 63.41, H 9.82, N 10.07.

NHCH₂(CH₂)₆CH₂CH=CHCH₂(CH₂)₆CH₃, (CH₂)₁₃CH₃, 3×(CH₂)₃CH₂NHBoc, 5×OC(CH₃)₃), 1.90-2.03 (m, 4H; CH₂CH=CHCH₂), 2.48-2.60 (m, 6H; CH₂N(CH₂CH₂NH)₂), 3.06-3.33 (m, 15H; 4×CH₂NHCO, 3×CH₂NHBoc, COCH(tetradecyl)CO), 4.18-4.32 (m, 2H; 2×COCHNHBocCH₂), 4.39-4.42 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 4.79-5.16 (m, 3H; 3×NHBoc ε), 5.33-5.38 (m, 2H; CH=CH), 5.57-5.61 (m, 2H; 2×NHBoc α), 6.70-6.74/7.06-7.09/7.47-7.73 ppm (3m, 5H; 5×NHCO); MS: *m/z*: 1564 [M+H]⁺, 1586 [M+Na]⁺, 1598 [M+Cl]⁺; elemental analysis calcd (%) for C₈₄H₁₅₉N₁₁O₁₅: C 64.54, H 10.25, N 9.86; found: C 64.17, H 10.53, N 10.03.

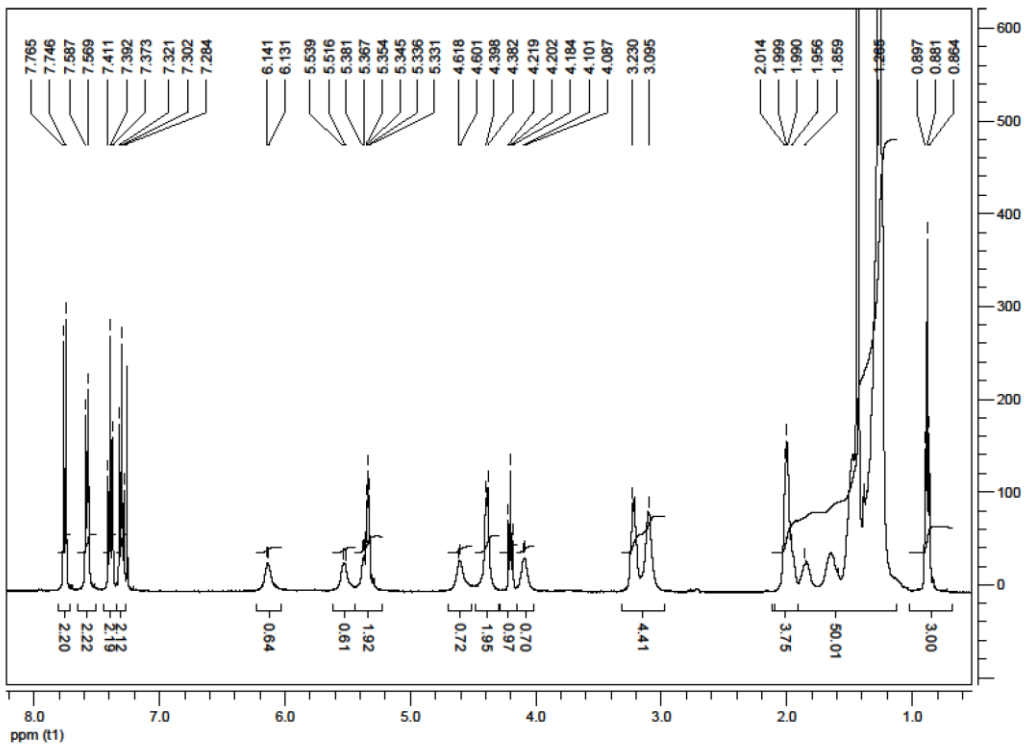
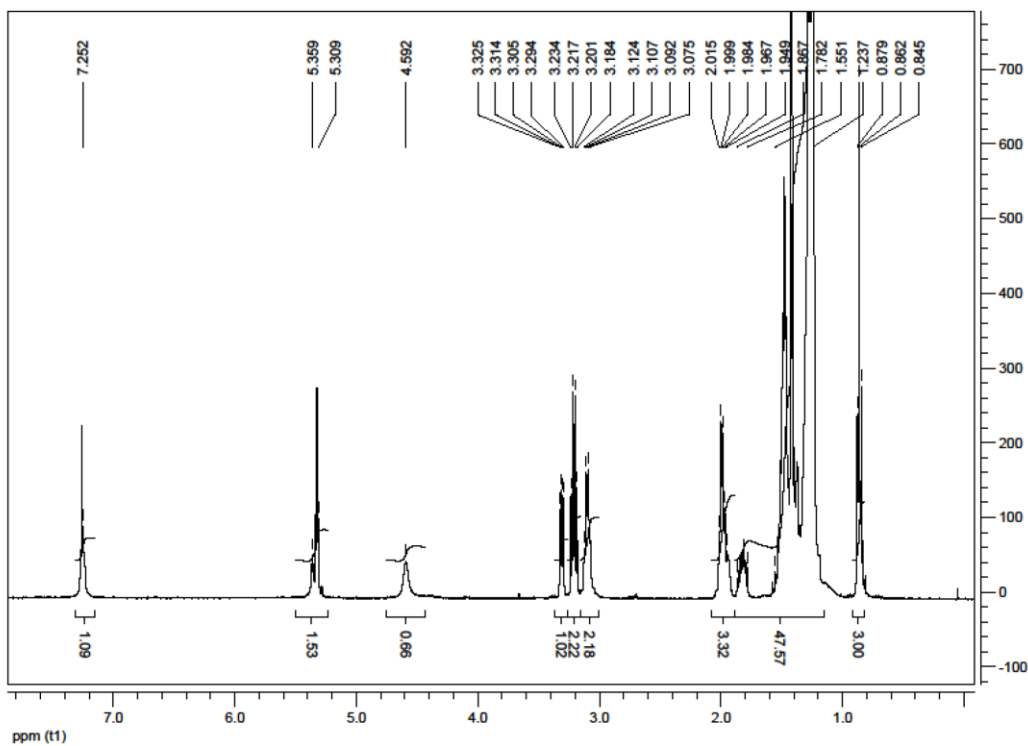
16a-c

N-(2-*N,N*-Bis[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)-amino]ethyl]amino]ethyl)-*N'*-[6-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino]-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl]-2-tetradecylpropan-diamide (16a) C₉₁H₁₇₃N₁₃O₁₈; Yield: 66 %; R_f = 0.73 (CHCl₃/MeOH, 9/1, v/v); m.p. 88-92°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27°C): δ = 0.87 (t, ³J(H,H) = 6.6 Hz, 6H; 2×CH₂CH₃), 1.24-1.92 (m, 128H; NHCH₂(CH₂)₁₂CH₃, (CH₂)₁₃CH₃, 3×(CH₂)₃CH₂NHBoc, (CH₂)₃CH₂NHCO, 6×OC(CH₃)₃), 2.38-2.67 (m, 6H; CH₂N(CH₂CH₂NH)₂), 2.92-3.59 (m, 17H; 5×CH₂NHCO, 3×CH₂NHBoc, COCH(tetradecyl)CO), 4.07-4.48 (m, 3H; 3×COCHNHBocCH₂), 4.54-4.56 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 4.76-5.00 (m, 3H; 3×NHBoc ε), 5.48-5.64 (m, 3H; 3×NHBoc α), 6.14-6.21/6.64-6.65/6.75-6.77/7.54-7.71 (4m, 5H; 5×NHCO), 8.08-8.19 ppm (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂); MS: *m/z*: 1737 [M+H]⁺, 1759 [M+Na]⁺, 1771 [M+Cl]⁺; elemental analysis calcd (%) for C₉₁H₁₇₃N₁₃O₁₈: C 62.91, H 10.04, N 10.48; found: C 62.78, H 9.65, N 10.43.

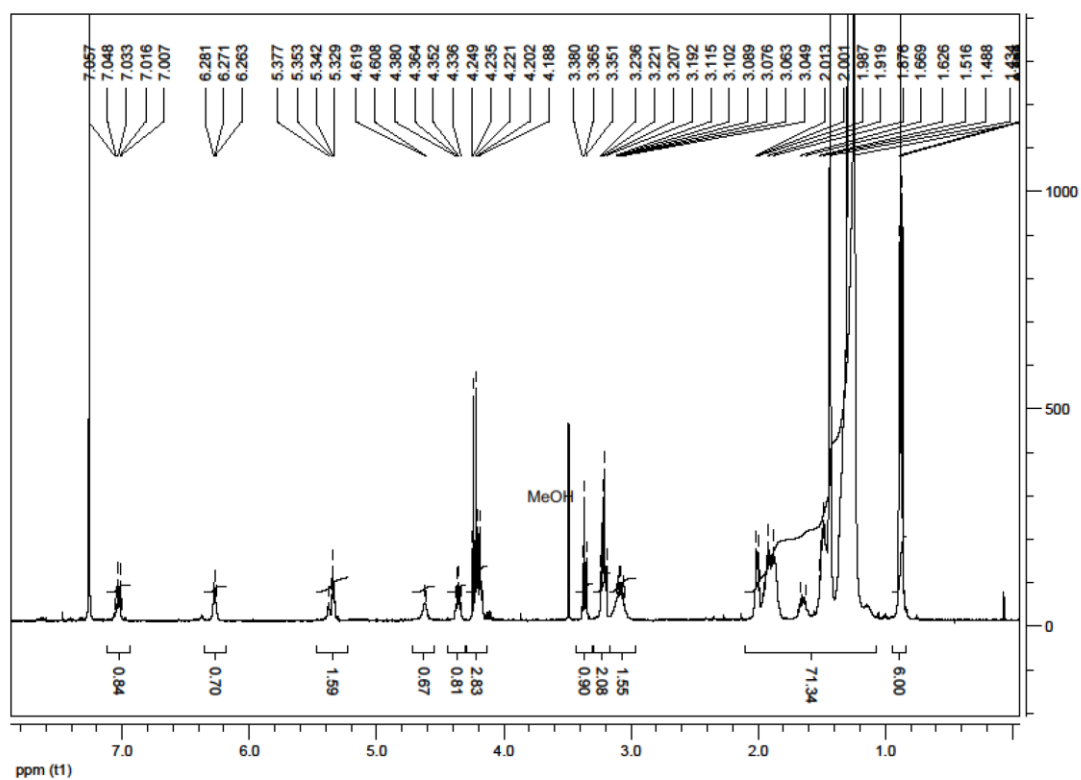
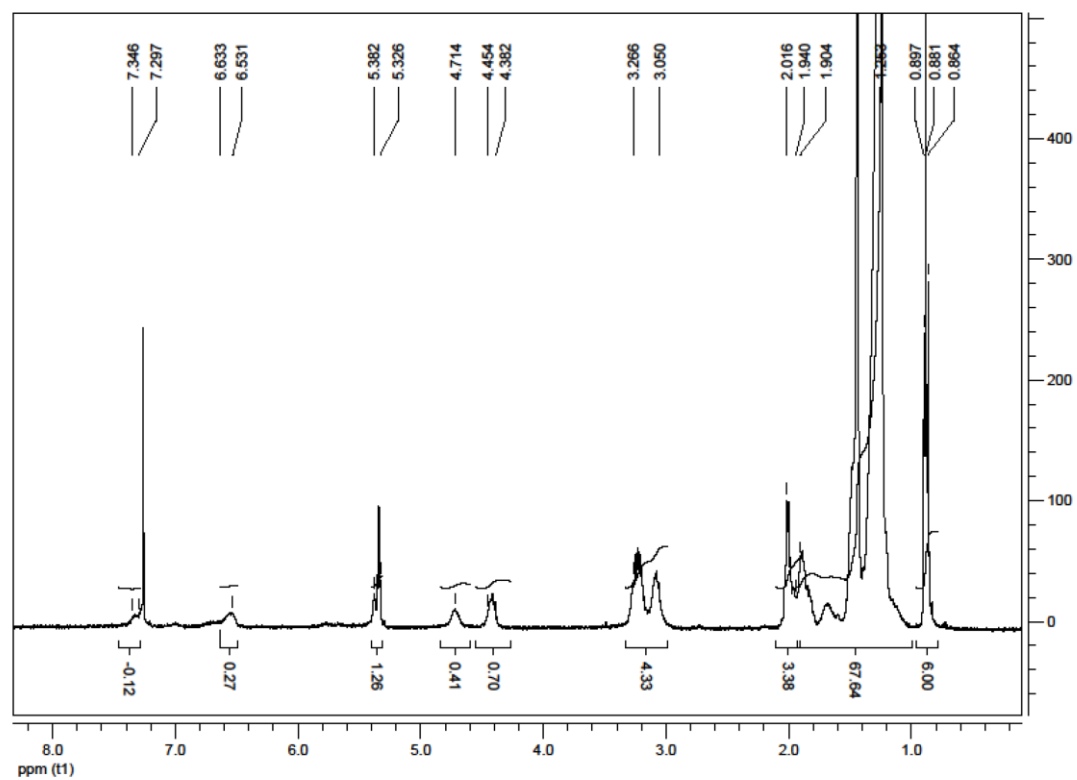
N-(2-*N,N*-Bis[2-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)-amino]ethyl]amino]ethyl)-*N'*-[6-(*N*-{(2*S*)-2,6-di[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-oxohexyl)amino]-1-oxo-1-(*N*-tetradecylamino)hexan-(2*S*)-2-yl]-2-hexadecylpropan-diamide (16b) C₉₃H₁₇₇N₁₃O₁₈; Yield: 70 %; R_f = 0.68 (CHCl₃/MeOH, 9/1, v/v); m.p. 93-98°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27°C): δ = 0.87 (t, ³J(H,H) = 5.9 Hz, 6H; 2×CH₂CH₃), 1.24-1.92 (m, 132H; NHCH₂(CH₂)₁₂CH₃, (CH₂)₁₃CH₃, 3×(CH₂)₃CH₂NHBoc, (CH₂)₃CH₂NHCO, 6×OC(CH₃)₃), 2.39-2.66 (m, 6H; CH₂N(CH₂CH₂NH)₂), 2.94-3.59 (m, 17H; 5×CH₂NHCO, 3×CH₂NHBoc, COCH(hexadecyl)CO), 4.21-4.46 (m, 3H; 3×COCHNHBocCH₂), 4.54-4.55 (m, 1H; COCH(NHCO)CH₂), 4.76-4.99 (m, 3H; 3×NHBoc ε), 5.49-5.61 (m, 3H; 3×NHBoc α), 6.14-6.22/7.54-7.70 (2m, 5H; 5×NHCO), 8.08-8.19 ppm (1m, 1H; COCH(NHCO)CH₂); MS: *m/z*: 1765 [M+H]⁺, 1788 [M+Na]⁺, 1799 [M+Cl]⁺; elemental analysis calcd (%) for C₉₃H₁₇₇N₁₃O₁₈: C 63.27, H 10.11, N 10.31; found: C 63.25, H 10.24, N 10.44.

!!! Die hier verwendeten Abkürzungen der Verbindungen entsprechen nicht den Abkürzungen der Dissertationsschrift sondern richtet sich nach Wölk et al., Chemistry – A European Journal. 2013, 19, 12824-12838. !!!

NMR spectra:

2b: $^1\text{H-NMR}$ 3b: $^1\text{H-NMR}$ 

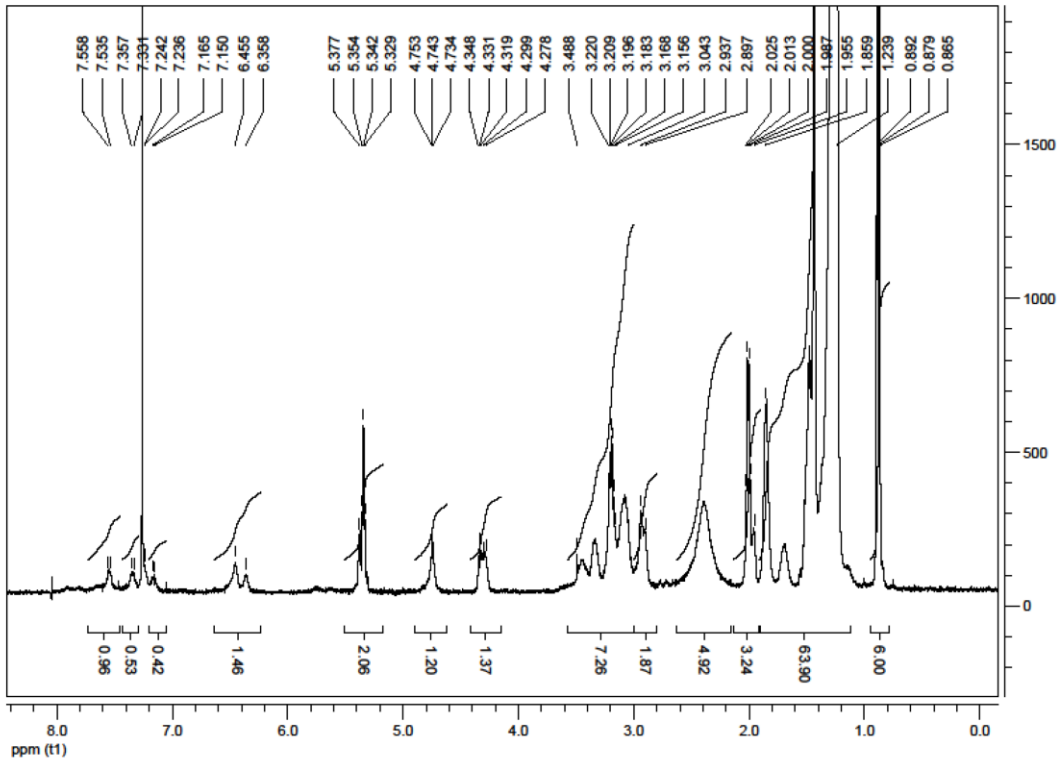
!!! Die hier verwendete Nomenklatur entspricht nicht der Nomenklatur der Dissertationsschrift sondern richtet sich nach Wölk et al., Chemistry – A European Journal. 2013, 19, 12824-12838. !!!

7c: $^1\text{H-NMR}$ 8c: $^1\text{H-NMR}$ 

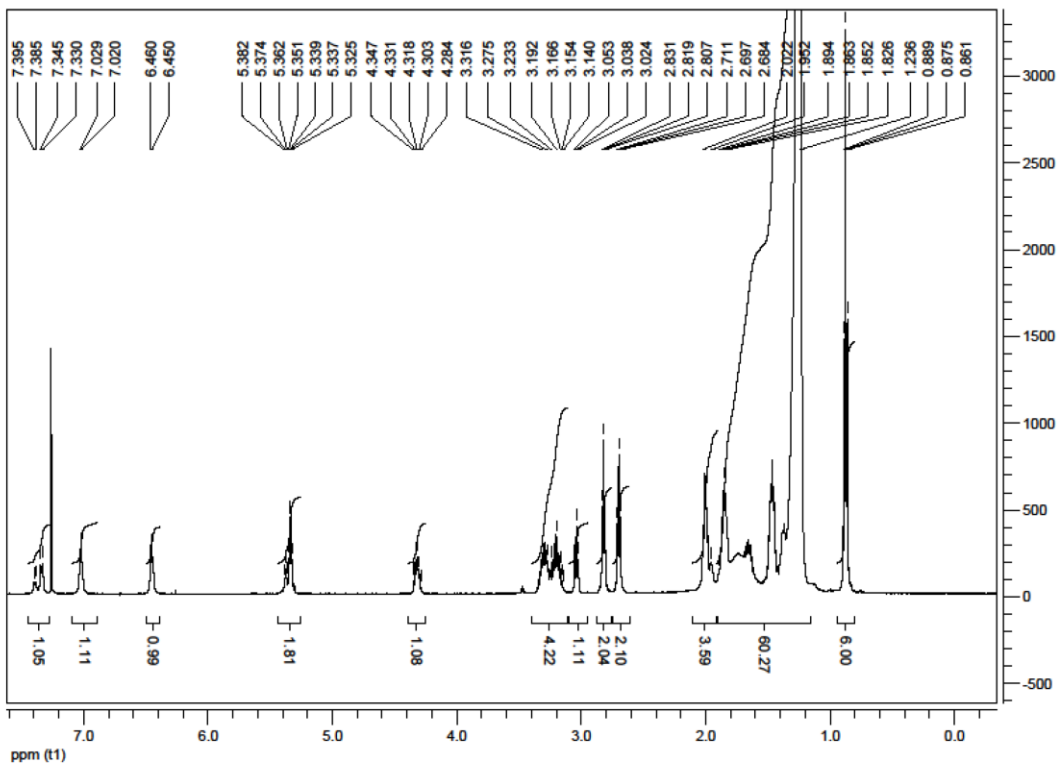
!!! Die hier verwendete Nomenklatur entspricht nicht der Nomenklatur der Dissertationsschrift sondern richtet sich nach Wölk et al., Chemistry – A European Journal. 2013, 19, 12824-12838. !!!

Anhang

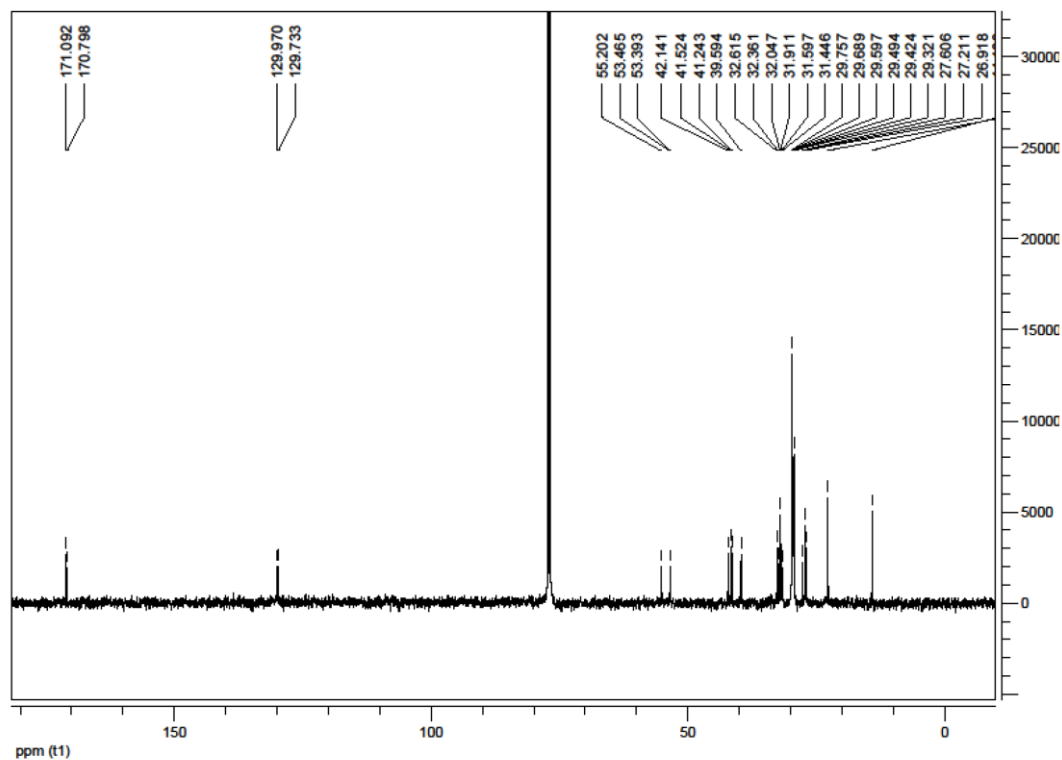
9c: ¹H-NMR



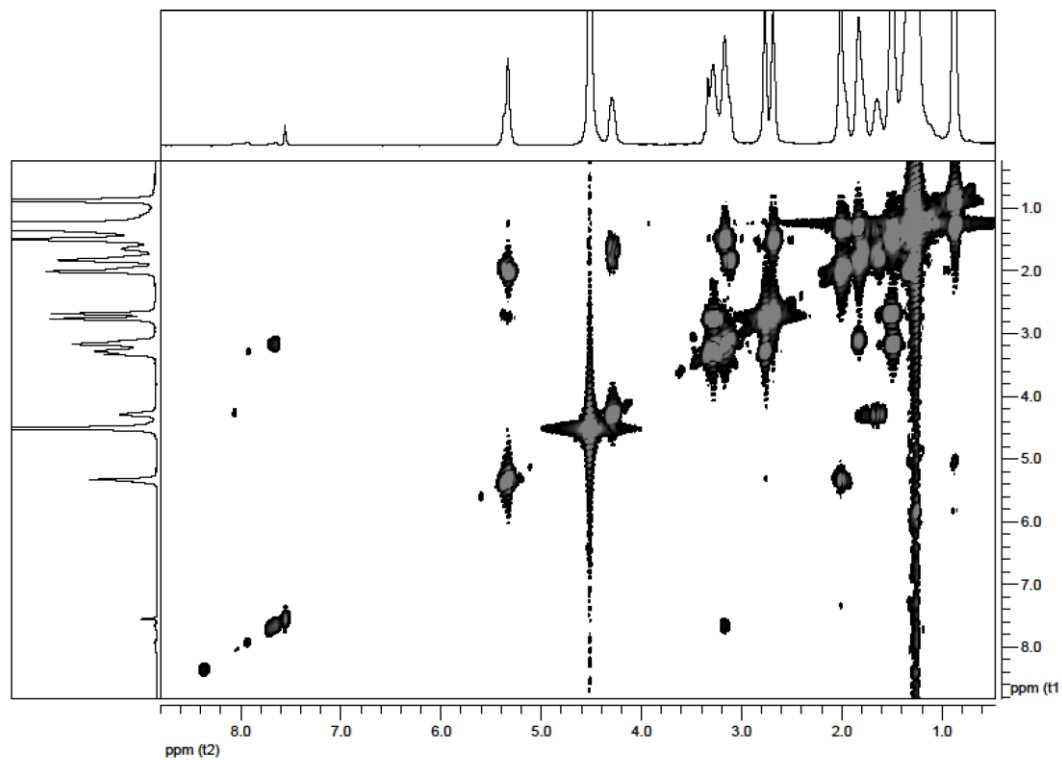
10c / lipid 1c: ¹H-NMR



!!! Die hier verwendete Nomenklatur entspricht nicht der Nomenklatur der Dissertationsschrift sondern richtet sich nach Wölk et al., Chemistry – A European Journal. 2013, 19, 12824-12838. !!!

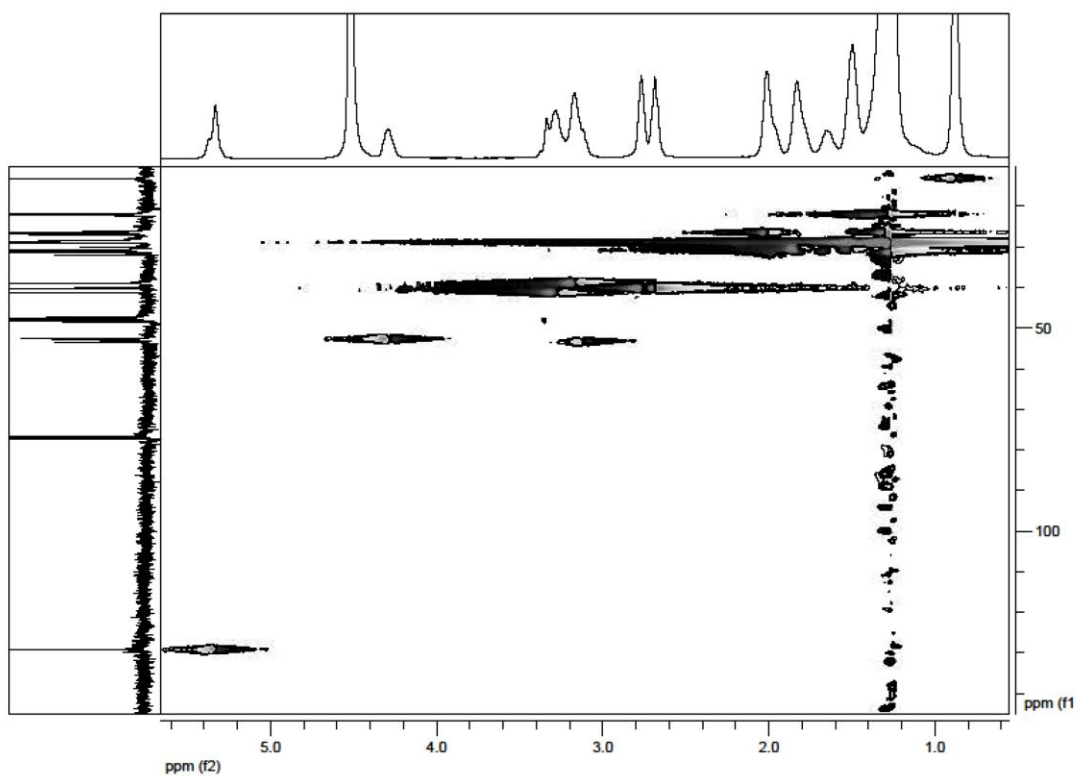
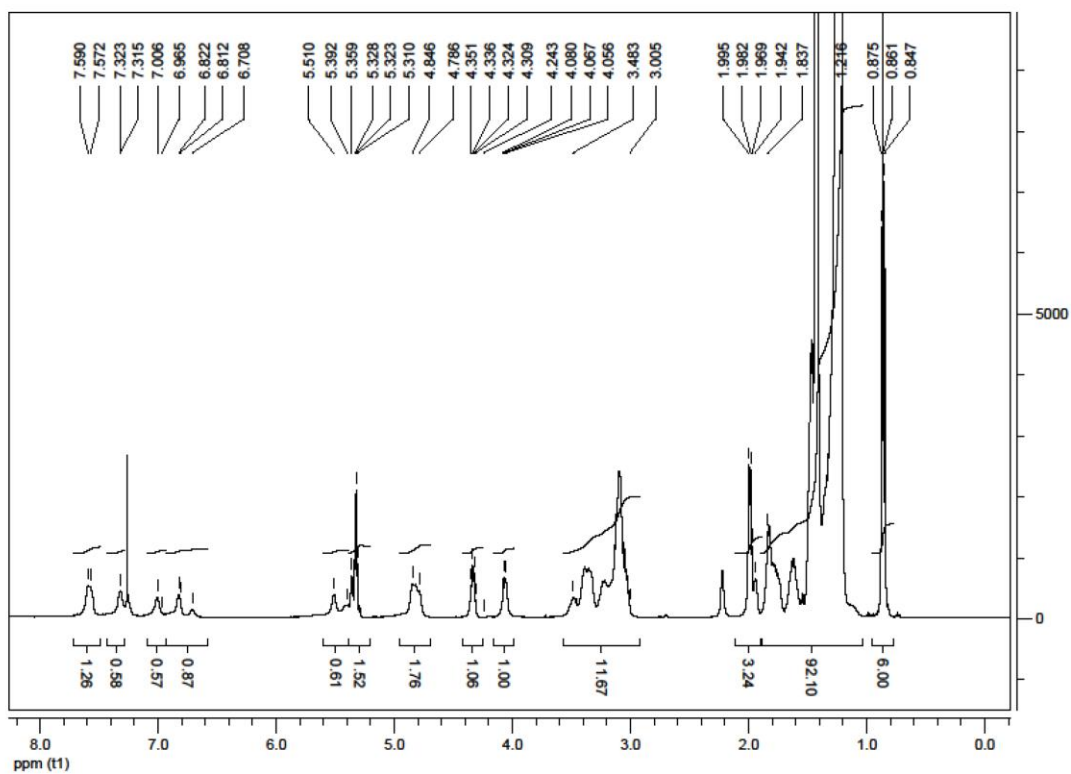
10c / lipid 1c: ^{13}C -NMR

10c / lipid 1c: H,H-COSY

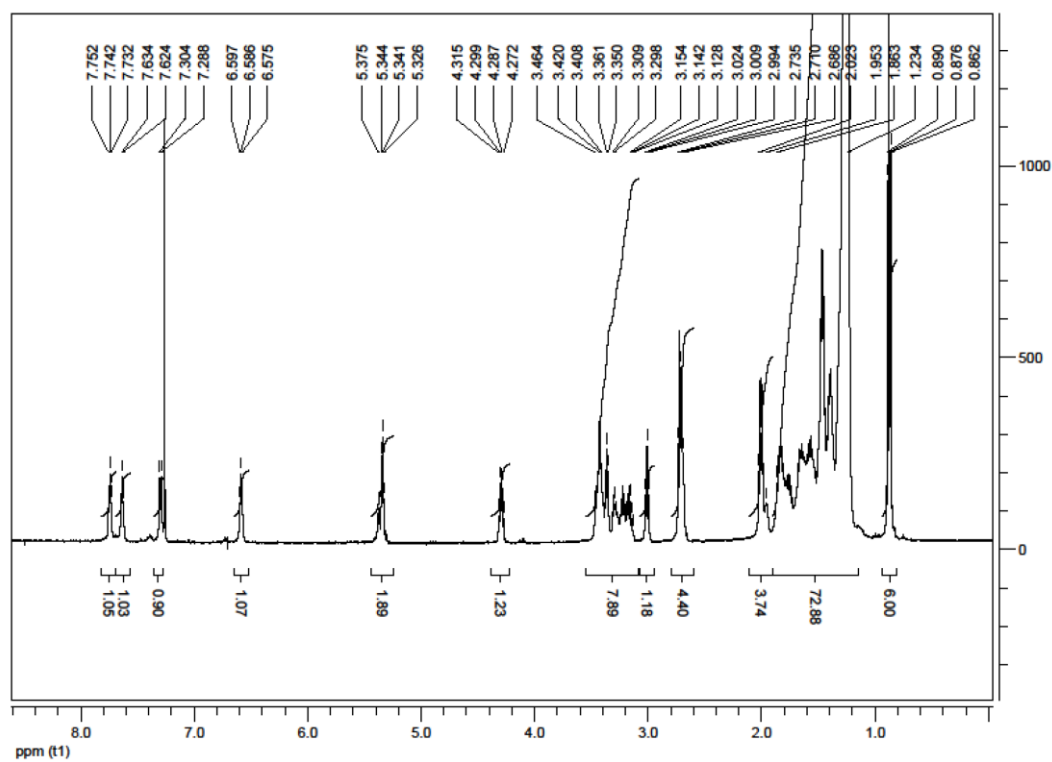
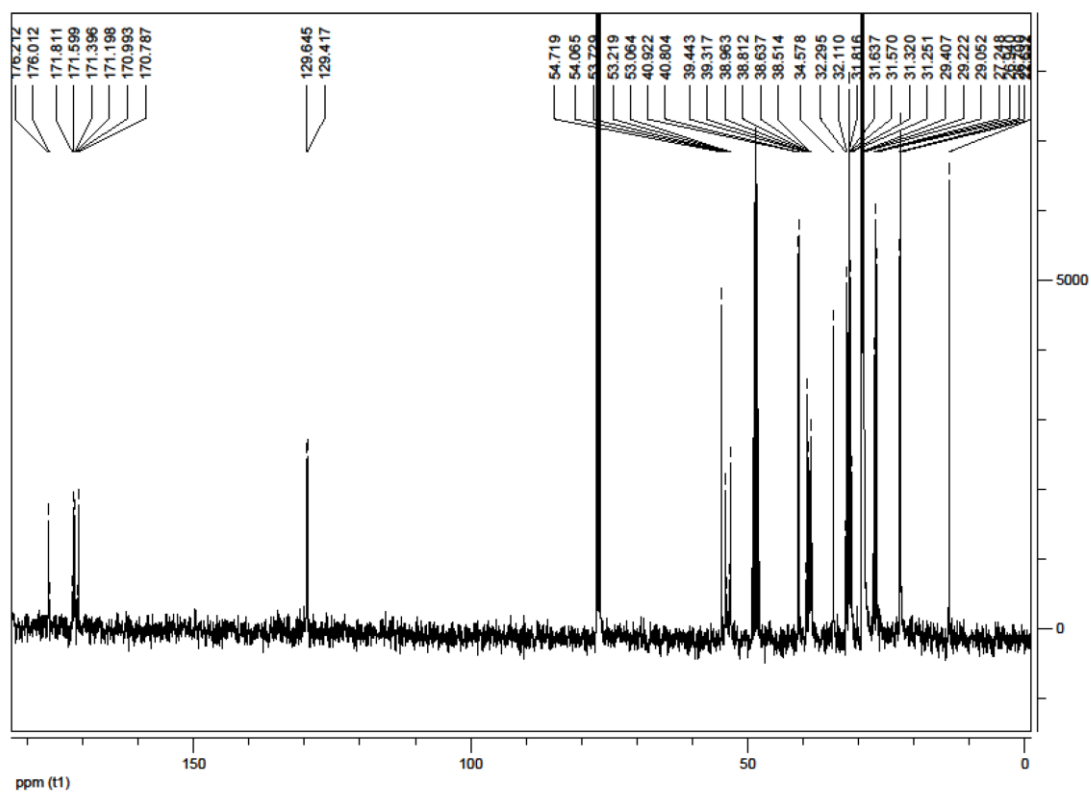


!!! Die hier verwendete Nomenklatur entspricht nicht der Nomenklatur der Dissertationsschrift sondern richtet sich nach Wölk et al., Chemistry – A European Journal. 2013, 19, 12824-12838. !!!

10c / lipid 1c: C,H-COSY

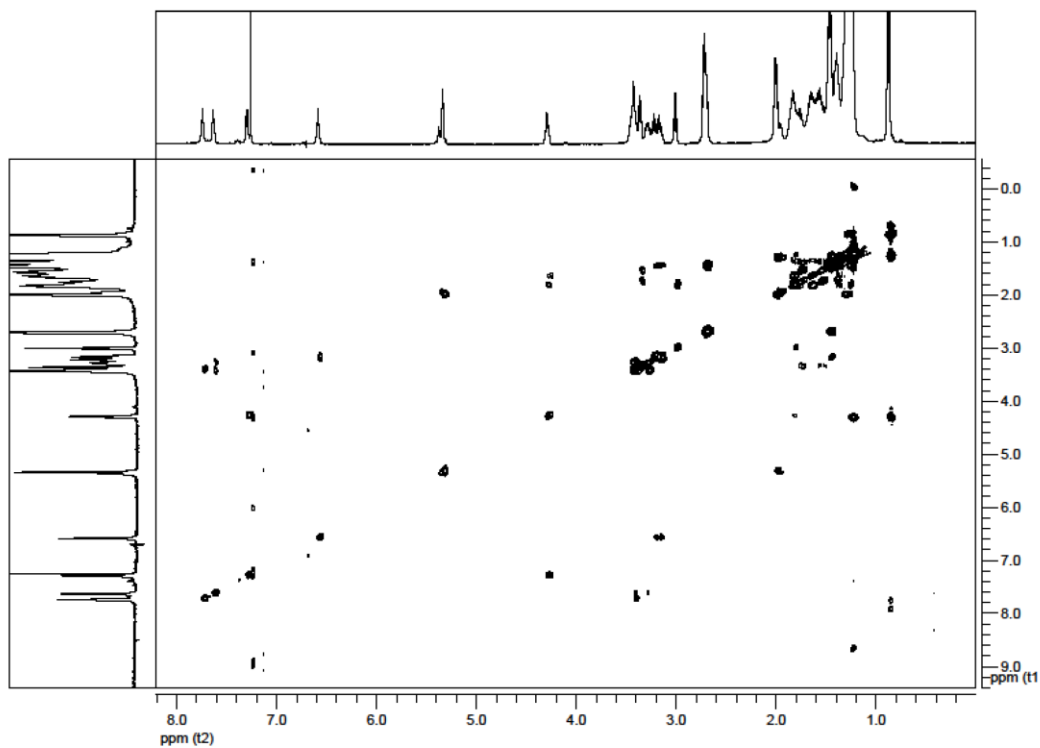
11c: $^1\text{H-NMR}$ 

!!! Die hier verwendete Nomenklatur entspricht nicht der Nomenklatur der Dissertationsschrift sondern richtet sich nach Wölk et al., Chemistry – A European Journal. 2013, 19, 12824-12838. !!!

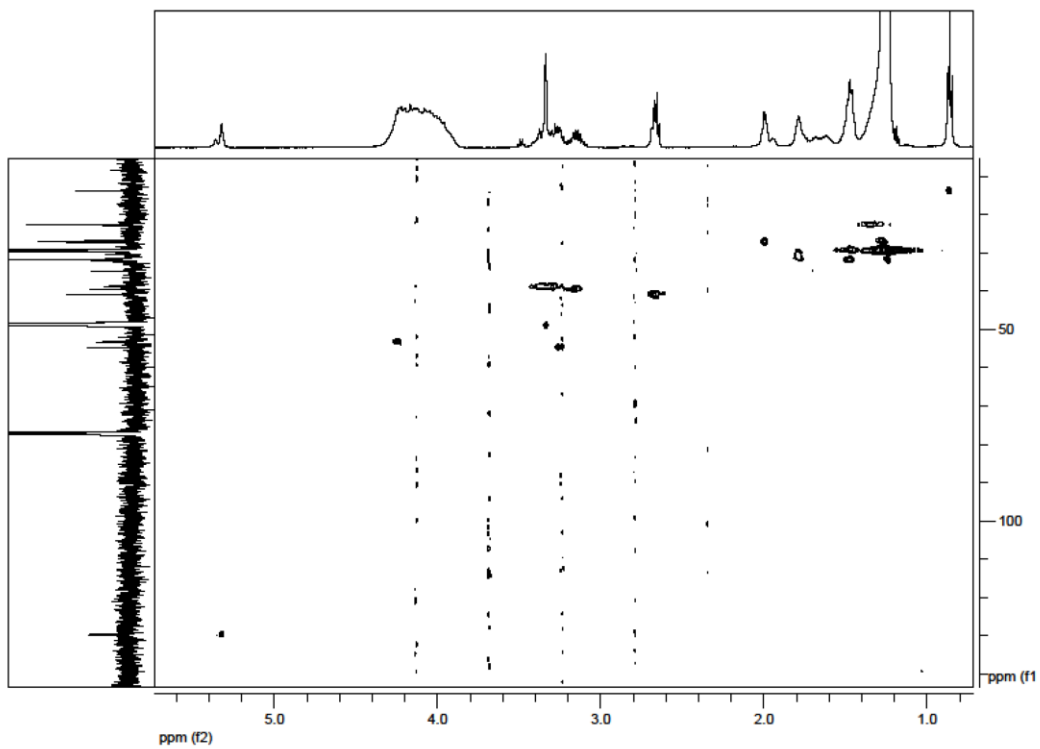
lipid 2c: $^1\text{H-NMR}$ lipid 2c: $^{13}\text{C-NMR}$ 

!!! Die hier verwendete Nomenklatur entspricht nicht der Nomenklatur der Dissertationsschrift sondern richtet sich nach Wölk et al., Chemistry – A European Journal. 2013, 19, 12824-12838. !!!

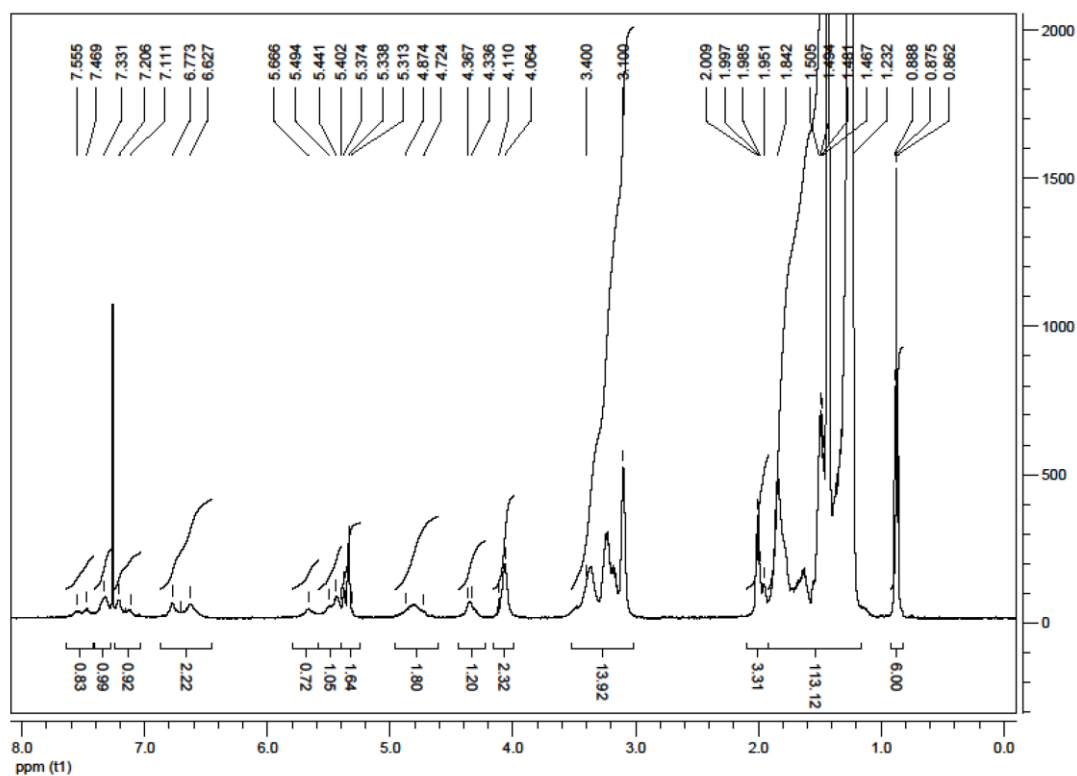
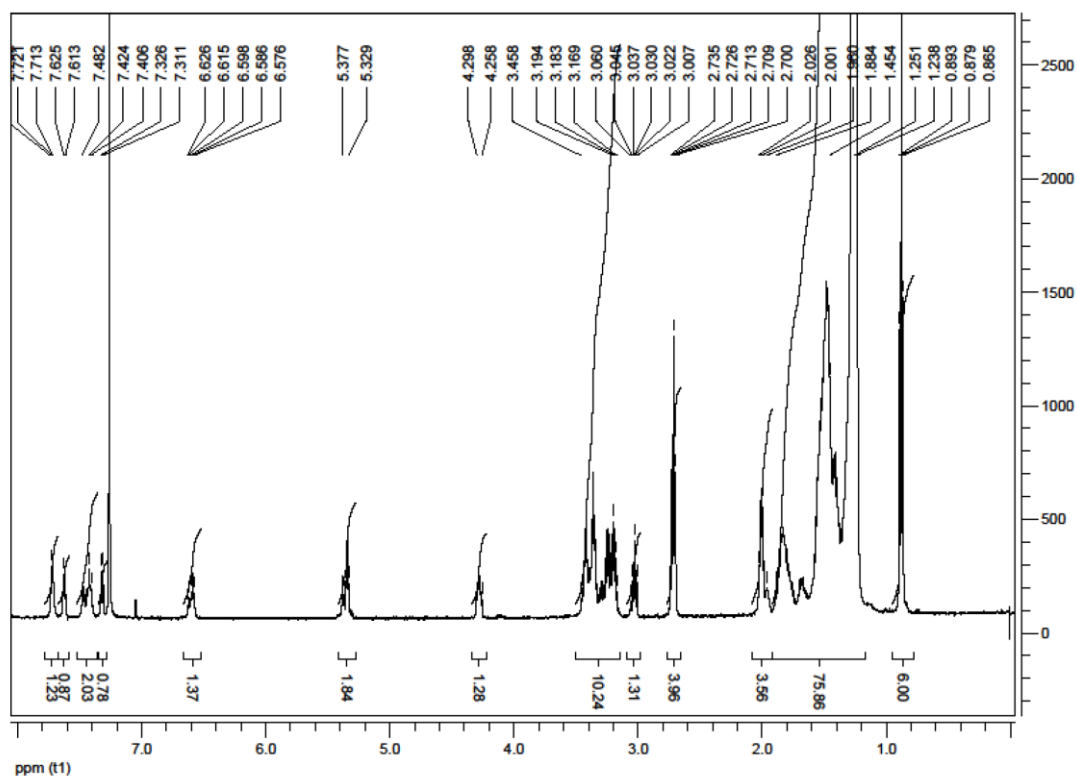
lipid 2c: H,H-COSY



lipid 2c: C,H-COSY

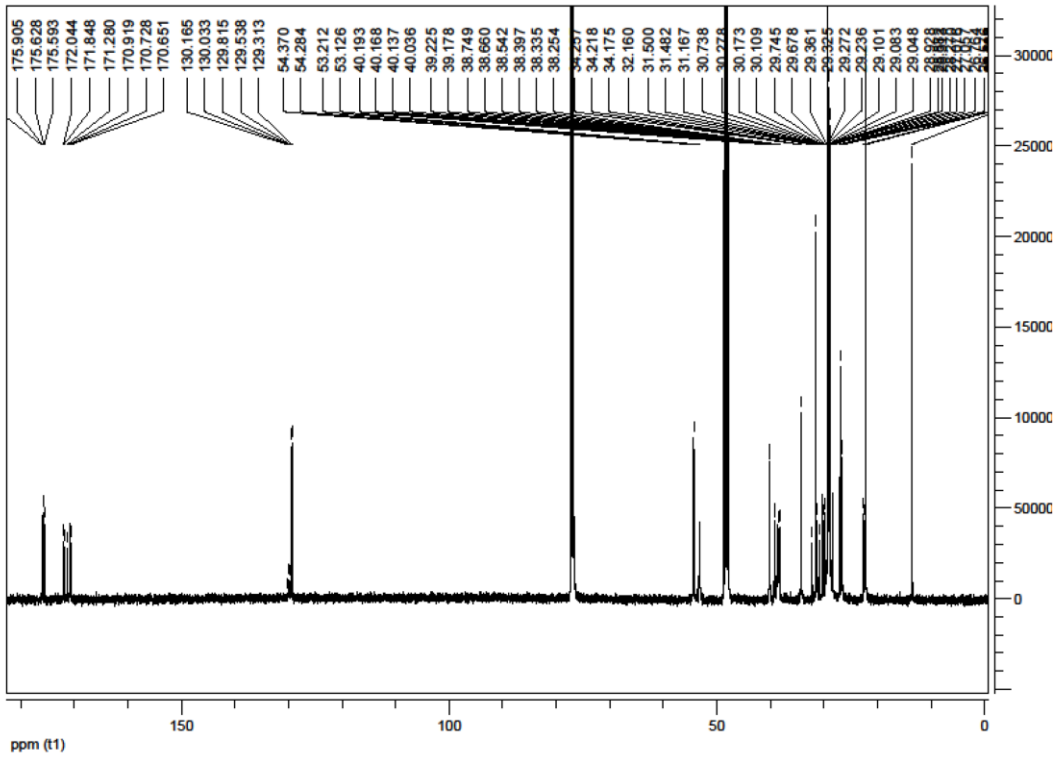


!!! Die hier verwendete Nomenklatur entspricht nicht der Nomenklatur der Dissertationsschrift sondern richtet sich nach Wölk et al., Chemistry – A European Journal. 2013, 19, 12824-12838. !!!

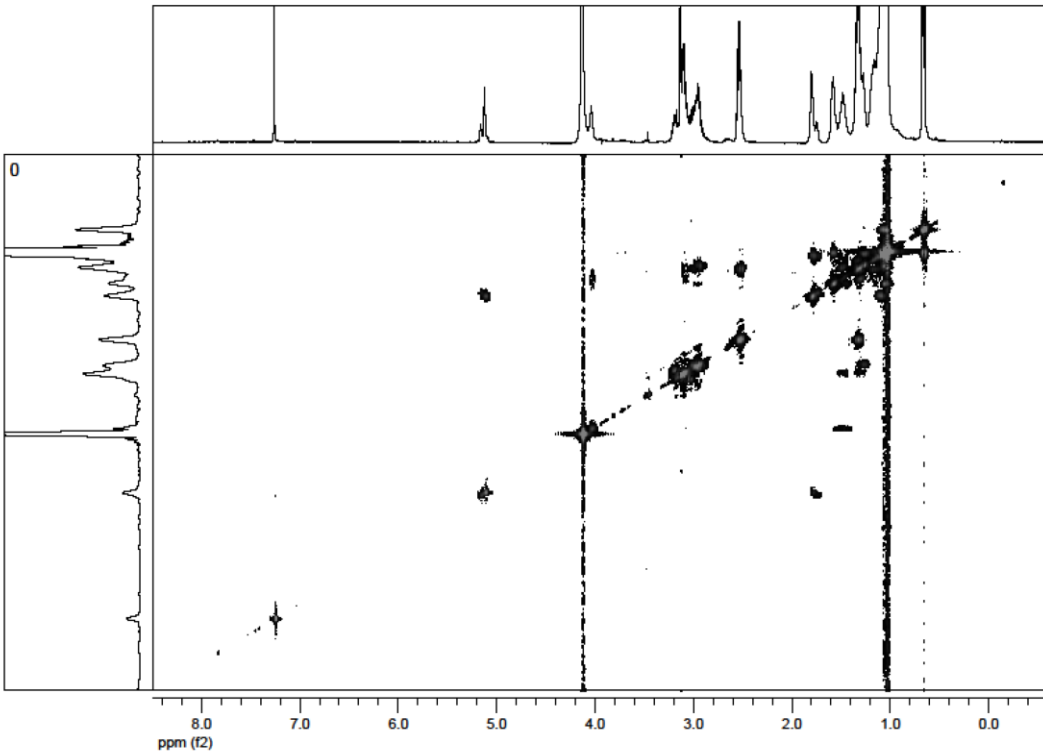
12c: $^1\text{H-NMR}$ lipid 3c: $^1\text{H-NMR}$ 

!!! Die hier verwendete Nomenklatur entspricht nicht der Nomenklatur der Dissertationsschrift sondern richtet sich nach Wölk et al., Chemistry – A European Journal. 2013, 19, 12824-12838. !!!

lipid 3c: ^{13}C -NMR

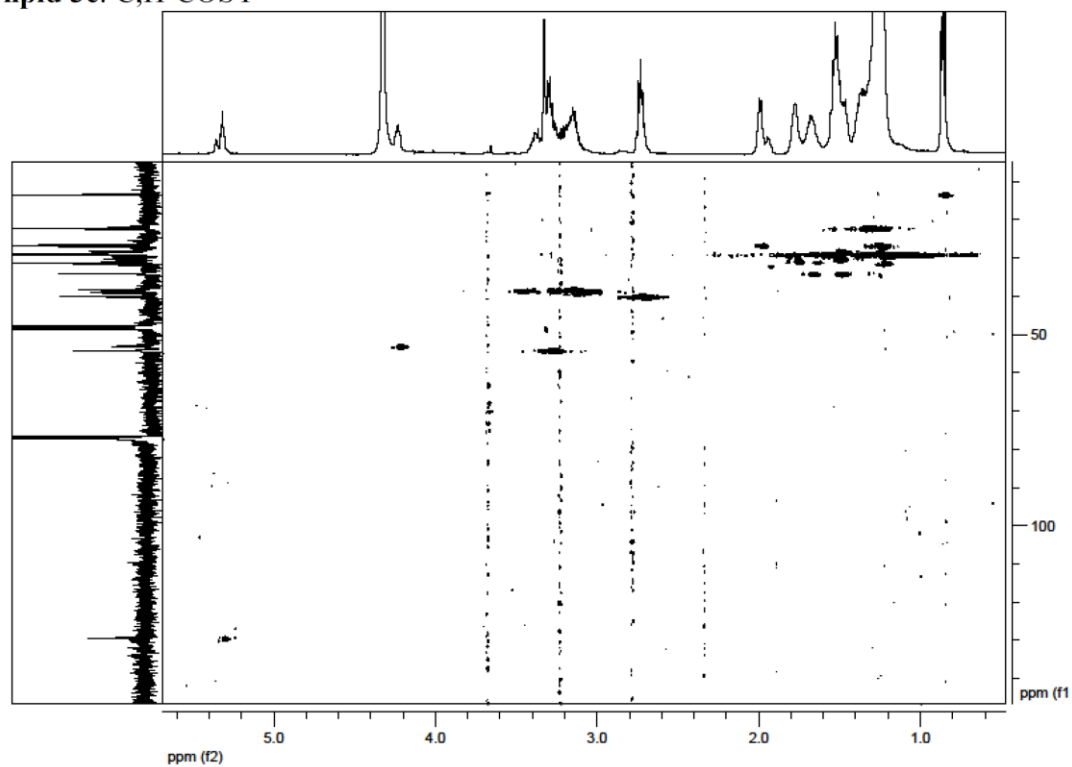
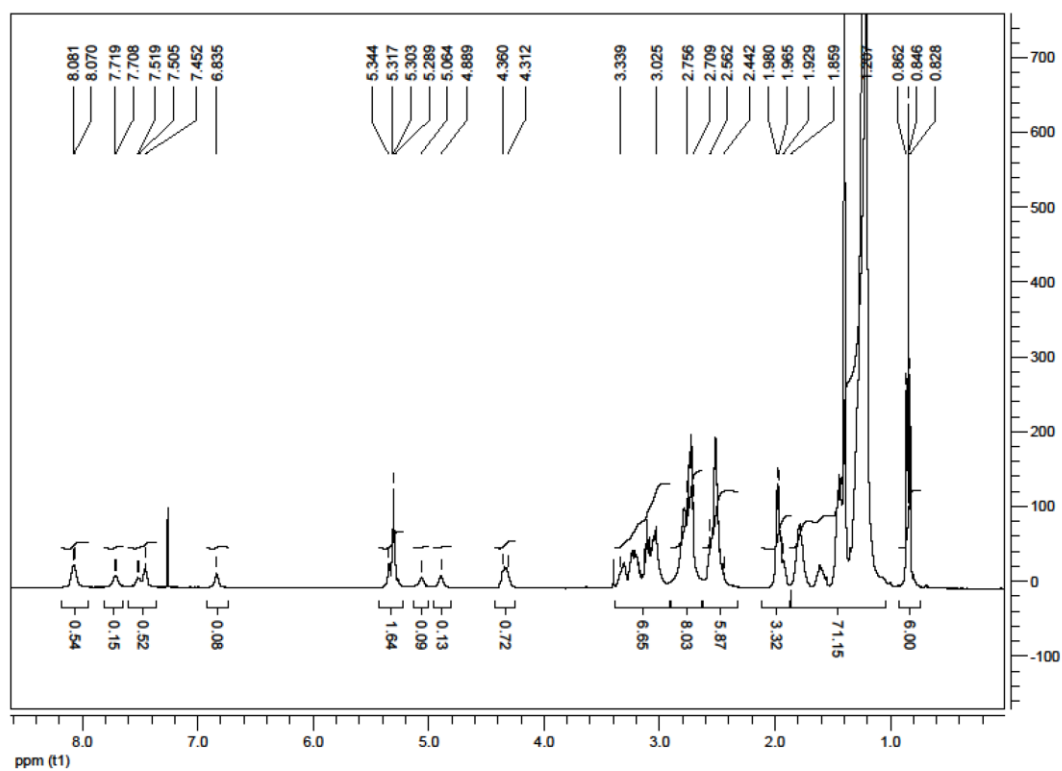


lipid 3c: H,H-COSY



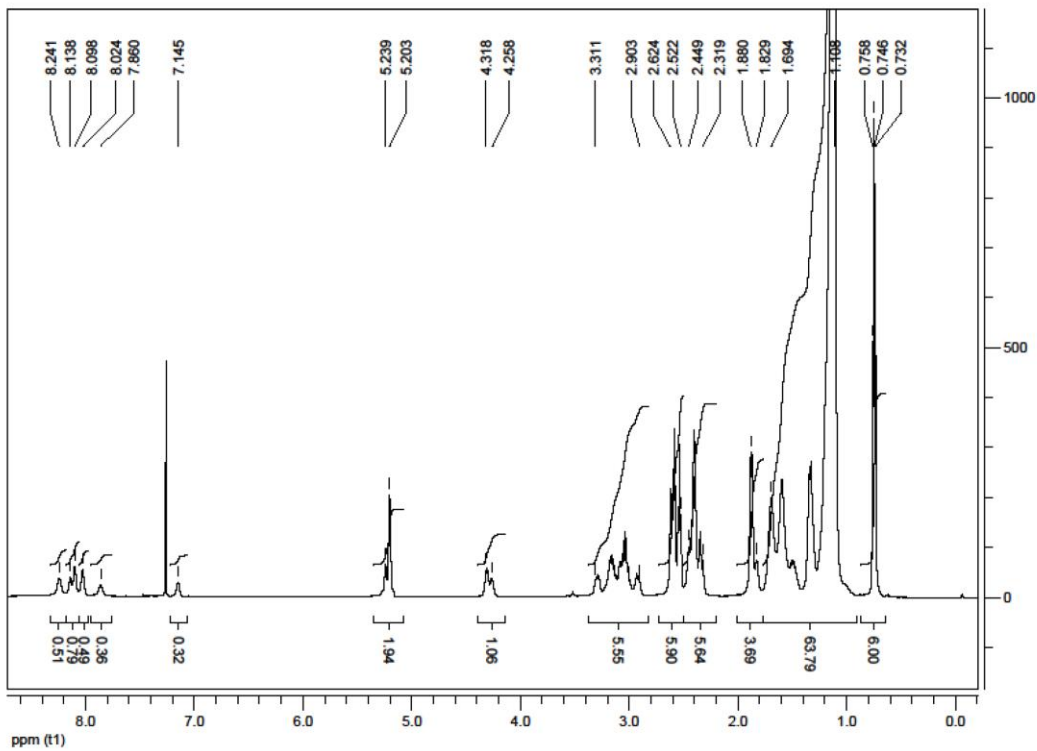
!!! Die hier verwendete Nomenklatur entspricht nicht der Nomenklatur der Dissertationsschrift sondern richtet sich nach Wölk et al., Chemistry – A European Journal. 2013, 19, 12824-12838. !!!

lipid 3c: C,H-COSY

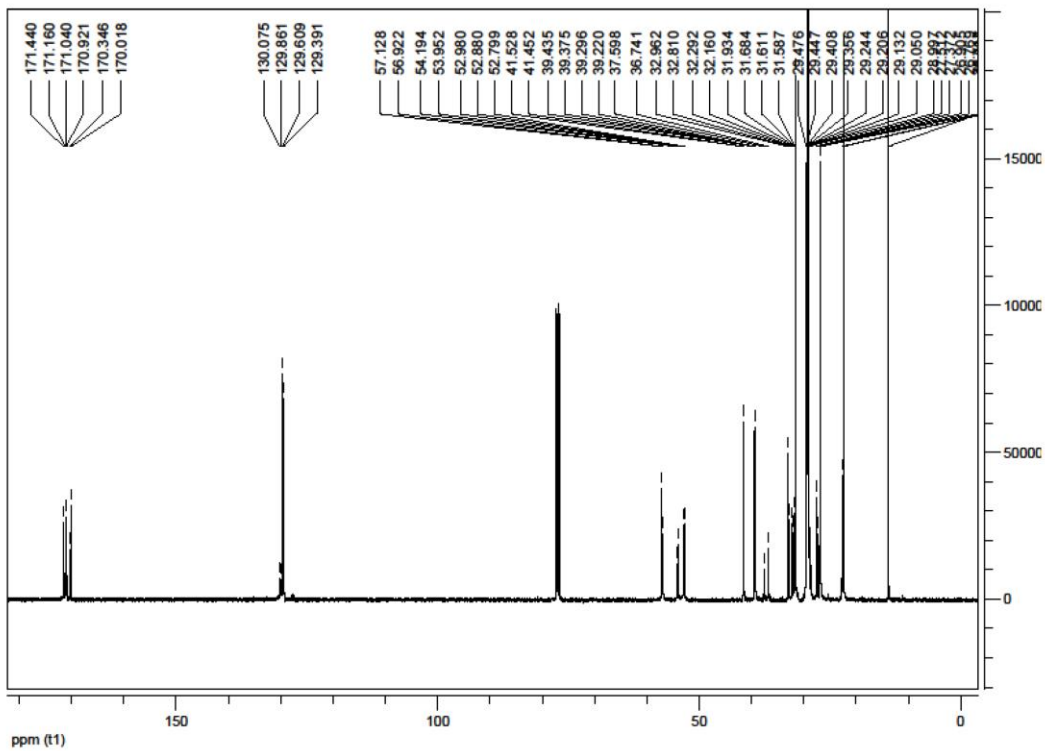
13c: ^1H -NMR

!!! Die hier verwendete Nomenklatur entspricht nicht der Nomenklatur der Dissertationsschrift sondern richtet sich nach Wölk et al., Chemistry – A European Journal. 2013, 19, 12824-12838. !!!

14c / lipid 4c: $^1\text{H-NMR}$

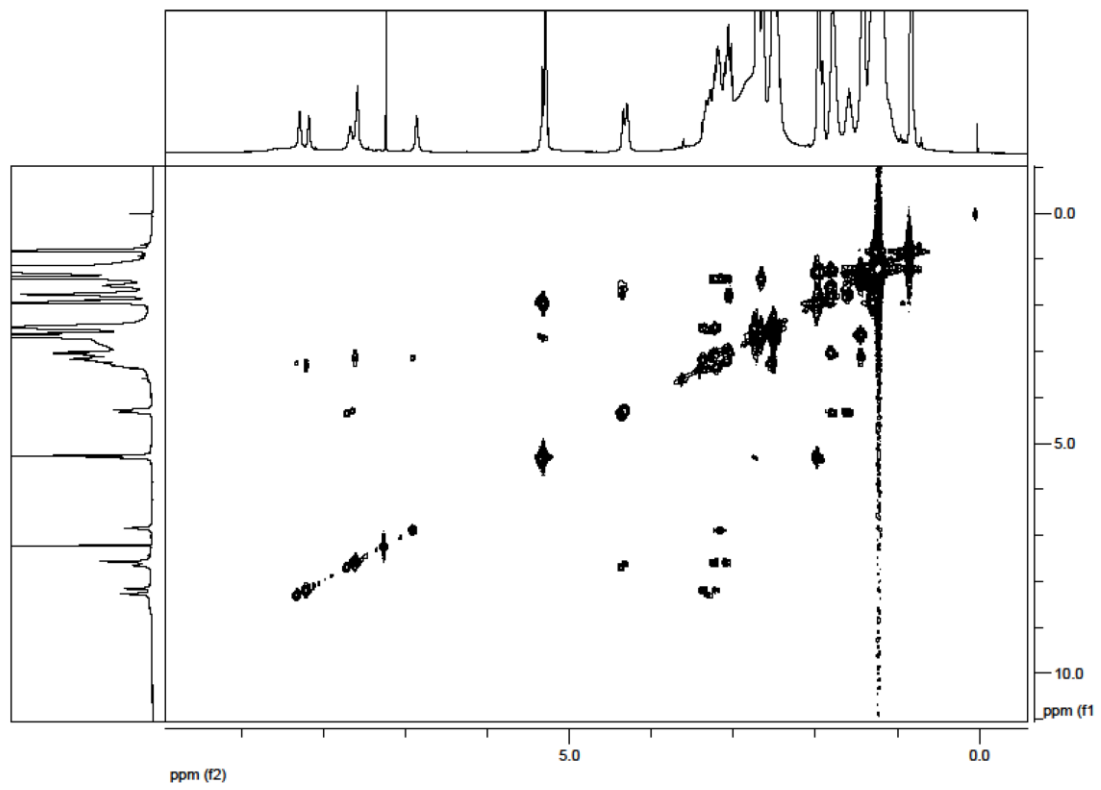


14c / lipid 4c: $^{13}\text{C-NMR}$

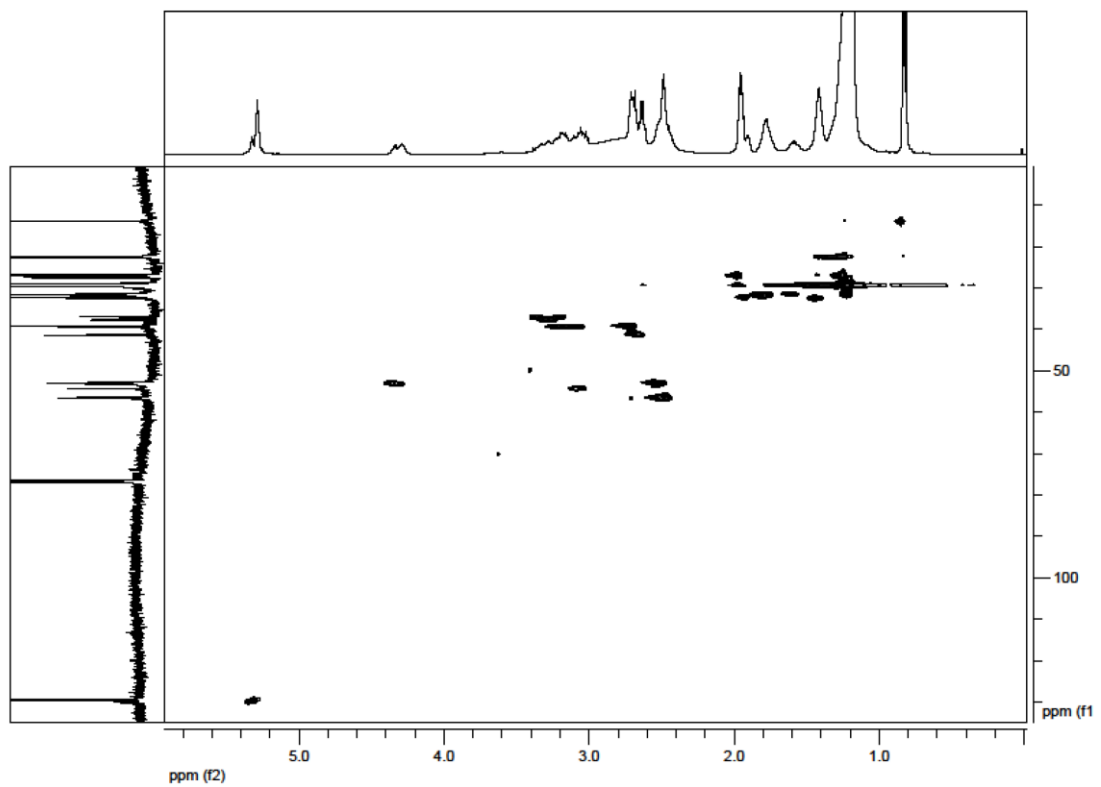


!!! Die hier verwendete Nomenklatur entspricht nicht der Nomenklatur der Dissertationsschrift sondern richtet sich nach Wölk et al., Chemistry – A European Journal. 2013, 19, 12824-12838. !!!

14c / lipid 4c: H,H-COSY

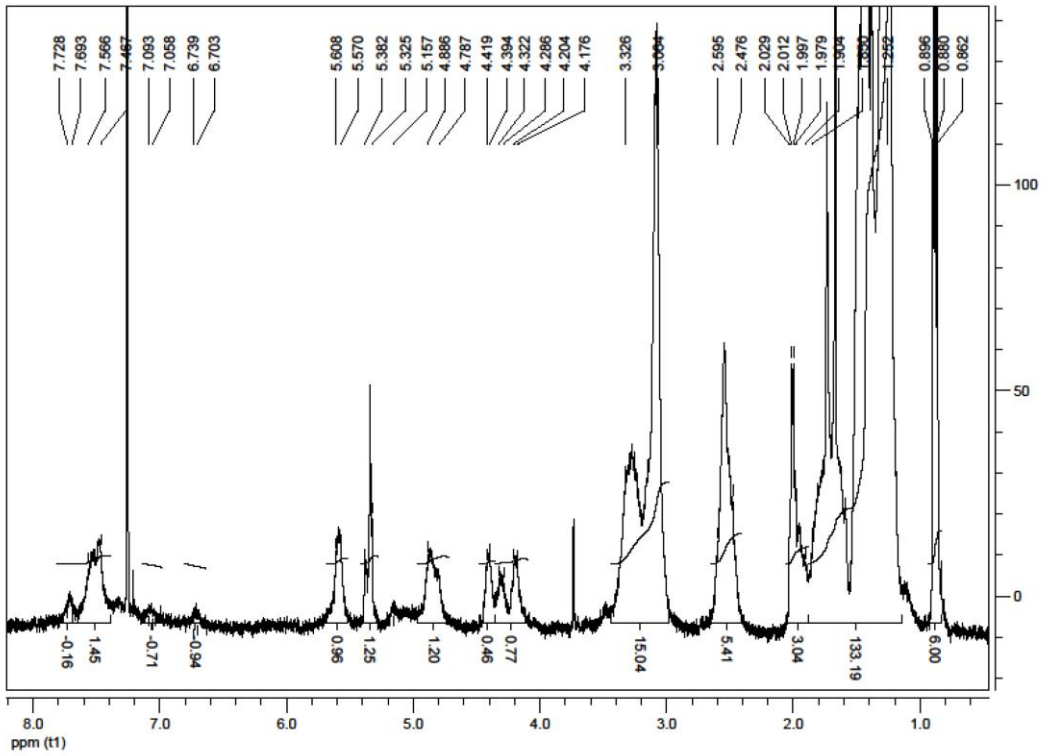


14c / lipid 4c: C,H-COSY

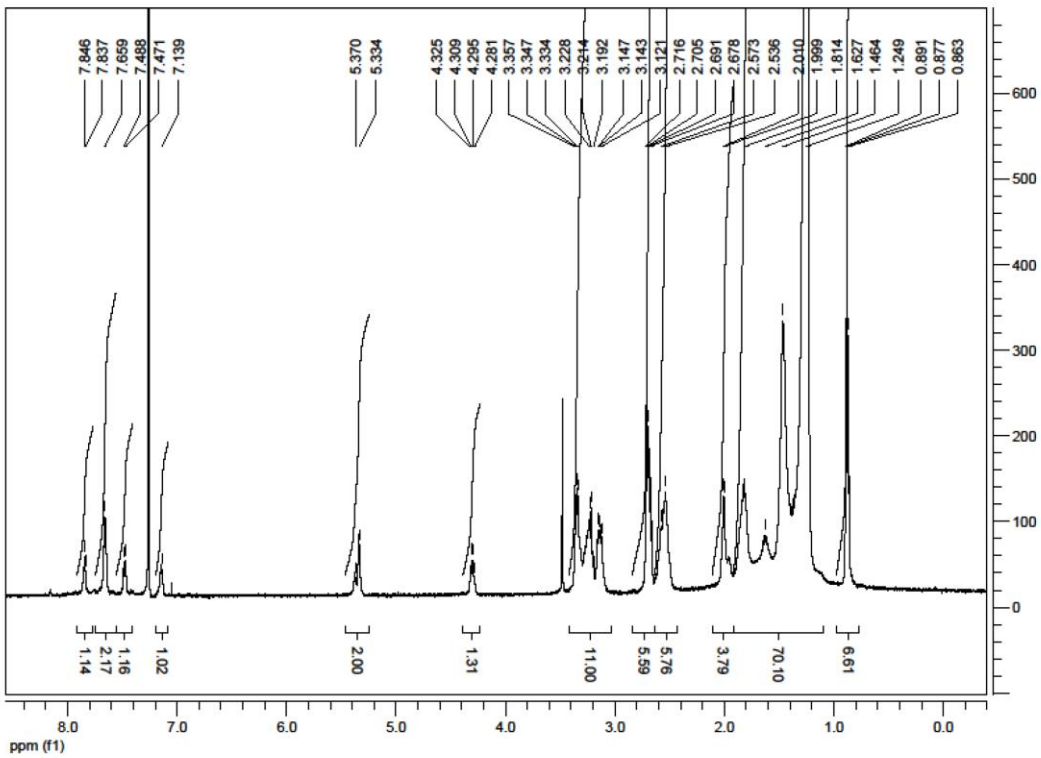


!!! Die hier verwendete Nomenklatur entspricht nicht der Nomenklatur der Dissertationsschrift sondern richtet sich nach Wölk et al., Chemistry – A European Journal. 2013, 19, 12824-12838. !!!

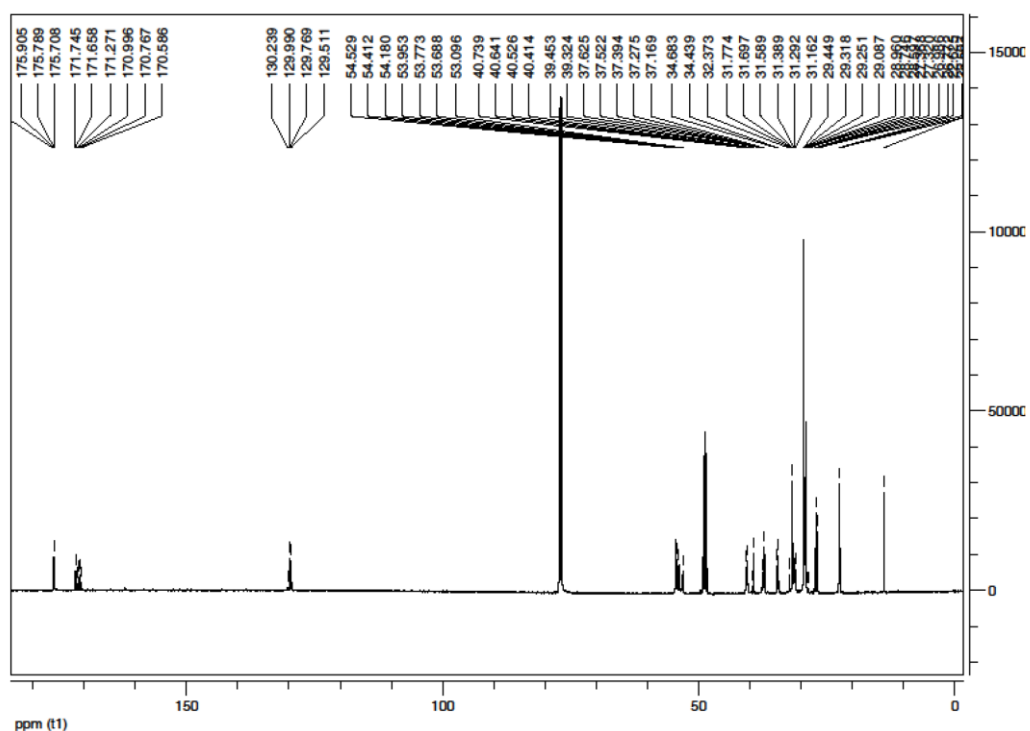
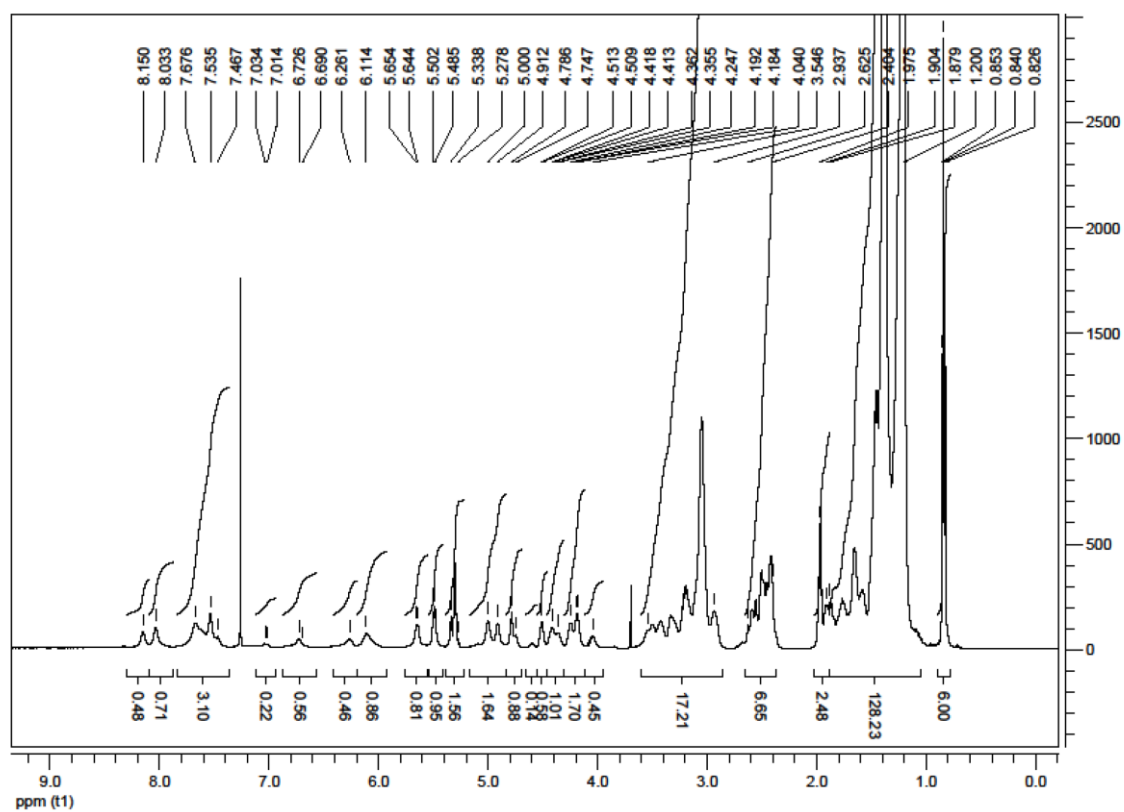
15c: ¹H-NMR



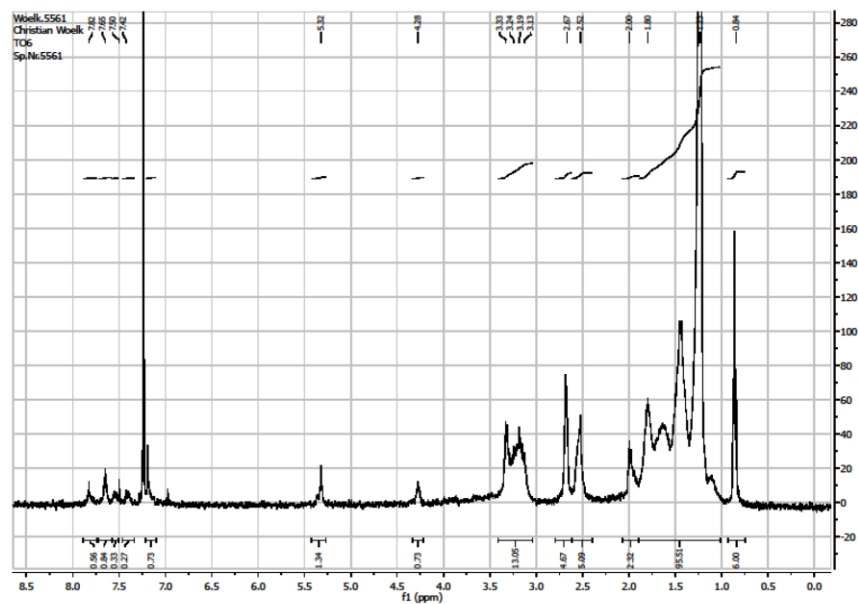
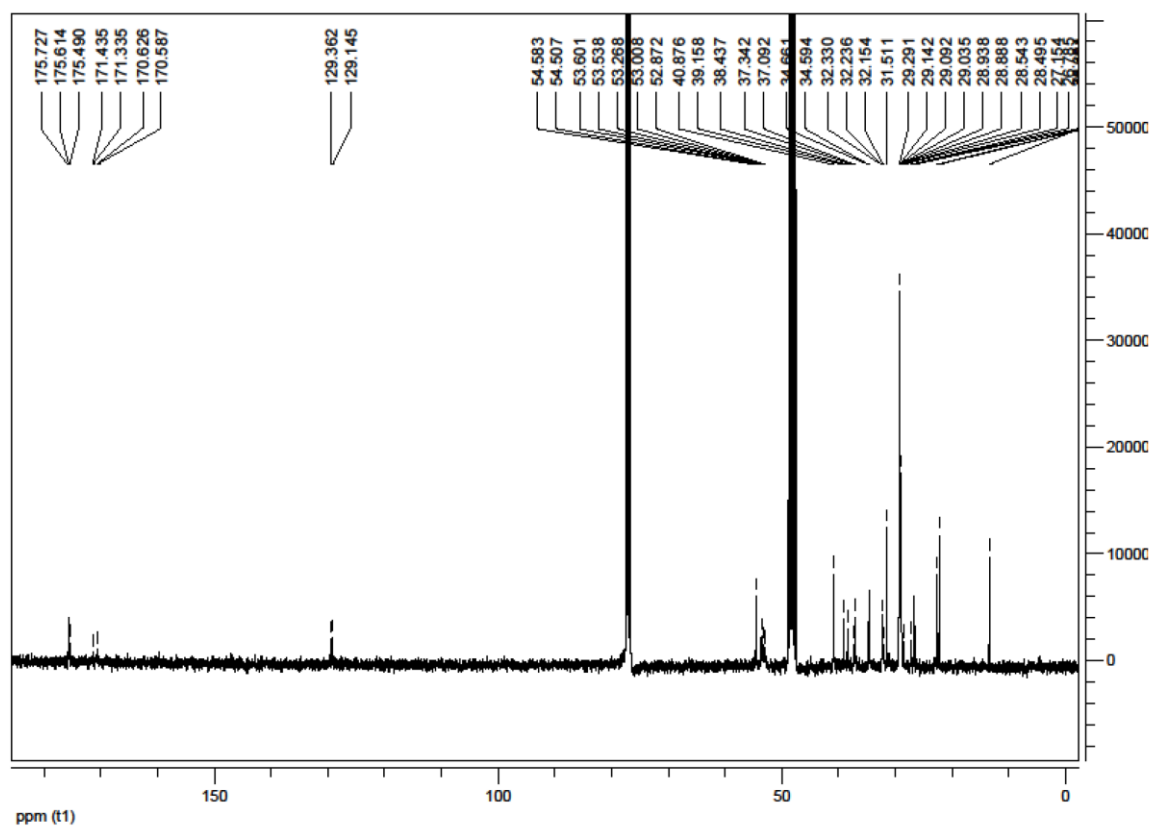
lipid 5c: ¹H-NMR



!!! Die hier verwendete Nomenklatur entspricht nicht der Nomenklatur der Dissertationsschrift sondern richtet sich nach Wölk et al., Chemistry – A European Journal. 2013, 19, 12824-12838. !!!

lipid 5c: ^{13}C -NMR16c: ^1H -NMR

!!! Die hier verwendete Nomenklatur entspricht nicht der Nomenklatur der Dissertationsschrift sondern richtet sich nach Wölk et al., Chemistry – A European Journal. 2013, 19, 12824-12838. !!!

lipid 6c: $^1\text{H-NMR}$ lipid 6c: $^{13}\text{C-NMR}$ 

!!! Die hier verwendete Nomenklatur entspricht nicht der Nomenklatur der Dissertationsschrift sondern richtet sich nach Wölk et al., Chemistry – A European Journal. 2013, 19, 12824-12838. !!!

Publikationen:

C. Janich, C. Wölk, S. Taßler, S. Drescher, A. Meister, G. Brezesinski, B. Dobner, A. Langner: *Composites of Malonic Acid Diamides and Phospholipids – Structural Parameters for Optimal Transfection Efficiency in A549 Cells.*

European Journal of Lipid Science and Technology **2014**, accepted,

DOI:10.1002/ejlt.201300405

C. Wölk, D. Pawlowska, S. Drescher, A. Auerswald, A. Meister, G. Hause, A. Blume, A. Langner, G. Brezesinski, and B. Dobner: *New micellar transfection agents.*

Langmuir **2014**, 30 (17), 4905-4915

C. Wölk, S. Drescher, A. Meister, A. Blume, A. Langner, B. Dobner: *General Synthesis and Physico-Chemical Characterisation of a Series of Peptide-Mimic Lysine-Based Amino-Functionalised Lipids.*

Chemistry - A European Journal **2013**, 19, 12824-12838.

M. Dittrich, M. Heinze, C. Wölk, S. S. Funari, B. Dobner, H. Möhwald, and G. Brezesinski: *Structure-Function Relationships of New Lipids Designed for DNA Transfection.*

ChemPhysChem **2011**, 12, 2328-2337.

C. Wölk, M. Heinze, P. Kreideweiß, M. Dittrich, G. Brezesinski, A. Langner, and B. Dobner: *Synthesis and DNA transfection properties of new head group modified malonic acid diamides.*

International Journal of Pharmazeutics **2011**, 409, 46-56.

Posterbeiträge:

S. Taßler, B. Dobner, C. Wölk, and G. Brezesinski: *Physical-chemical investigation of new cationic lipids for gene transfection.*

International Workshop "Molecular Membrane Biophysics" (DGfB) - Hünfeld **2014**

D. Pawlowska, C. Wölk, B. Dobner, and G. Brezesinski: *The impact of chain purity of cationic lipids on the transfection efficiency.*

International Workshop "Molecular Membrane Biophysics" (DGfB) - Hünfeld **2014**

C. Janich, C. Wölk, S. Taßler, S. Drescher, A. Meister, G. Brezesinski, B. Dobner, and A. Langner: *Investigation of Phospholipids in Mixture with Cationic Lipids – Biological and Physicochemical Characterization.*

International Workshop "Molecular Membrane Biophysics" (DGfB) - Hünfeld **2014**

C. Janich, C. Wölk, B. Dobner, and A. Langner: *Evaluation of Transfection Efficiency of Cationic Lipids/Co-lipid-Complexes using an EGFP-Assay.*

3. Symposium on Phospholipids in Pharmaceutical Research - Heidelberg **2013**

Veröffentlichungen

C. Wölk, S. Drescher, A. Meister, A. Blume, A. Langner, and B. Dobner: *Physicochemical Characterization of the Miscibility of Phospholipids with a Novel Amino-Functionalized Lipid Bearing Three Alkyl Chains.*

3. Symposium on Phospholipids in Pharmaceutical Research - Heidelberg **2013**

C. Wölk, A. Langner, and B. Dobner: *Synthesis of Cationic Lipids with Peptide-Like Malonic Acid Diamide Backbone.*

DPhG-Tagung – Innsbruck **2011**

P. Kreideweiß, C. Wölk, B. Dobner, and A. Langner: *Cationic Lipids for Liposomal Gene Transfer.*

DPhG-Tagung - Innsbruck **2011**

C. Wölk, N. Erdmann, S. Drescher, A. Meister, A. Blume, A. Langner, and B. Dobner: *Physicochemical Characterization of Cationic Liposomes for the Use as Gene Transfection Systems.*

2. Symposium on Phospholipids in Pharmaceutical Research - Heidelberg **2011**

C. Wölk, A. Langner, and B. Dobner: *Synthesis of Cationic Lipids with a Novel Peptide-like Malonic Diamide Backbone.*

Frontiers in Medicinal Chemistry - Saarbrücken **2011**

C. Wölk, M. Heinze, P. Kreideweiß, B. Dobner, and A. Langner: *Synthesis of Novel Cationic Lipids with Malonic Diamide Backbone and Lysine Containing Headgroup.*

DPhG-Tagung - Braunschweig **2010**

Betreute Diplomarbeiten:

Thema: „*Synthese neuartiger, kationischer Transfektionslipide auf Grundlage basisch substituierter Malonsäurediamide.*“

Dipl. Pharm. Christopher Janich, **11/2011-05/2012**

Die Ergebnisse der Arbeit wurden mit der Analytik der Lipide HO-IV, HO-VI, HO-VIII, HO-X, HO-XII und HO-IV sowie deren Vorstufen in der vorliegenden Dissertationsschrift mit verwendet.

Thema: „*Beiträge zur Charakterisierung der Komplexbildung zwischen TT-VI und salmon sperm DNA sowie Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration ausgewählter Malonamide.*“

Apothekerin Anna Auerswald, **11/2012-05/2013**

Ein Teil der Ergebnisse wurde in der Publikation in Langmuir mit verwendet. Des Weiteren wurden die mit der Fluorescein-Methode ermittelten CMC-Werte in der vorliegenden Dissertationsschrift mit verwendet.

Thema: „*Anwendung verschiedener physiko-chemischer Methoden für die Untersuchung der Komplexbildung zwischen OO-IV und salmon sperm DNA.*“

Lisa Lampp, **11/2013-05/2014**

Die Ergebnisse dieser Arbeit fanden keine Anwendung in der vorliegenden Dissertation.

Danksagung:

In erster Linie Danke ich Herrn Prof. A. Langner, der mir die Bearbeitung des interessanten Themas und mir die Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter in seiner Arbeitsgruppe ermöglichte. Des Weiteren habe ich die wissenschaftliche Freiheit schätzen gelernt, welche er mir im Rahmen der finanziellen Mittel immer gegeben hat.

Ganz besonderen Dank bin ich Herrn Prof. B. Dobner schuldig. So stand er mir nicht nur bei der Lösung von Problemen in der Lipidsynthese zur Seite, sondern bereicherte meine Zeit in der Arbeitsgruppe durch zahlreiche fachliche und auch private Gespräche. Sein Erfahrungsschatz übertrifft jegliche zusammenfassende Literatur über Lipidsynthese und ist eine nicht zu ersetzende Bereicherung für die Arbeitsgruppe.

Auch Herrn Prof. G. Brezesinski bin ich zu besonderem Dank verpflichtet. So ermöglichte er mir vor vielen Jahren durch Finanzierung der Diplomarbeit über Herrn Prof. Möhwald die ersten Arbeiten auf dem Gebiet der Lipofektion. Sein großer Erfahrungsschatz auf dem Gebiet der physiko-chemischen Untersuchung von Lipiden war sehr Wertvoll für die Anfertigung dieser Arbeit. Ich bedanke mich hiermit für die vielen Ratschläge, die ausführlichen Gespräche während der Arbeitsgruppentreffen und der sofortigen Bereitschaft die englischen Manuskripte zu korrigieren. Auch den Kooperationspartnern in seiner Arbeitsgruppe möchte ich für die Bearbeitung verschiedener Fragen physiko-chemischer Art danken: Dr. Matthias Dittrich, M. Sc. Dorothea Pawlowska, und M. Sc. Stephanie Taßler.

Herrn Dr. Simon Drescher danke ich für die vielen kreativen Gespräche, die FT-IR-Messungen und die Präparation der TEM Proben. Zusätzlich waren mir das Korrekturlesen von Manuskripten und dieser Arbeit eine große Hilfe.

An dieser Stelle möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe biochemische Pharmazie und auch den angegliederten Personen der Ceramid-Synthetiker danken. Es war mir immer ein Vergnügen und ich habe während meiner Arbeitszeit viele Bekanntschaften gemacht auf die ich nicht verzichten möchte. Und die Tagung in Innsbruck werde ich nie vergessen. Drei Personen möchte ich aber separat erwähnen:

Angela Munk, die man auch die gute Seele der Arbeitsgruppe bezeichnen kann. Ihre Arbeit in der Zellkultur und das organisatorische und kaufmännische Talent sollen noch einmal separat erwähnt werden.

Dipl. Pharm. Patrick Kreideweiß mit dem ich seit dem Diplom zusammen gearbeitet habe. Danke für die ausgiebige Testung. Ich hoffe, dass unsere Zusammenarbeit auch noch ausführlich der internationalen Forschungsgemeinde präsentiert werden kann.

Dipl. Pharm. Christopher Janich nimmt als mein erster Diplomand einen besonderen Stellenwert ein. Dabei ist nicht nur seine synthetische Leistung hervorzuheben. Es freut mich sehr ihn als Kollegen in der Zelltestung an der Seite zu haben. Seine offene und kritische Betrachtung von Problemen und sein wissenschaftlicher Ehrgeiz sind eine fruchtbringende Bereicherung für die Arbeitsgruppe.

Ich bedanke mich auch bei meinen Diplomandinnen Anna Auerswald und Lisa Lampp.

PD Dr. Annette Meister und Dr. Gerd Hause danke ich für die Ermöglichung der TEM-Aufnahmen.

Vielen Dank an Herrn Prof. A. Blume für die Ratschläge bei den Publikationen und dem vertrauensvollen Zugang zu seinem DSC-Gerät.

Ich Bedanke mich weiterhin bei den Kollegen, die für die Probenvermessung im Rahmen der Analytik tätig waren: Herrn Dipl. Pharm. Jens Pettelkau (HRMS), Frau Woik (ESI-MS), Frau Schwarz (GC-MS), Frau Mandt und Frau Brandt (EA) und die Mitarbeiter des NMR-Labors. In diesem Zuge gilt es auch den leitenden Personen der verschiedenen Arbeitskreise für den Zugang zu den Geräten zu Danken: Prof. R. Neubert, Prof. A. Sinz und Dr. Ströhl.

Danke auch Herrn Apotheker Frank Schopeck, der nach meiner Diplomarbeit auch für die sprachliche Aufbesserung dieser Arbeit sorgte.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie, die mich immer meinen Weg gehen ließ, und bei Frau Dr. Nicole Erdmann für das Verständnis und die Geduld.

Lebenslauf:

Persönliche Angaben:

Familienname: Wölk
Vorname: Christian
Akademischer Grad: Diplom-Pharmazeut (Dipl. Pharm.)
Geburtsdatum: 20.05.1984
Geburtsort: Wolmirstedt
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Anschrift: Fischerring 21
06120 Halle (Saale)

Beruflicher Werdegang:

seit 04/2011 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie, Abteilung Biochemische Pharmazie

11/2009-03/2011 Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz des Landes Sachsen-Anhalt in der Fassung vom 06.01.2001 (GVBL.LSAS.319)

05/2009-10/2009 Mitarbeiter der Adler-Apotheke in Wolmirstedt (praktisches pharmazeutisches Jahr)

10/2008-04/2009 studentische Hilfskraft am Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung Potsdam/Golm mit Arbeitsplatz an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie, Abteilung Biochemische Pharmazie (praktisches pharmazeutisches Jahr, Anfertigung einer Diplomarbeit)

Hochschulbildung:

04/2010	Erlangung des Akademischen Grades Diplom-Pharmazeut mit der Arbeit „Synthese und Charakterisierung von Lysin-haltigen Malonamiden als kationische Lipide für die Gentransfektion“
seit 12/2009	Promotionsstudent an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
12/2009	Approbation als Apotheker
11/2009	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
10/2008	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
09/2006	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
10/2004-09/2008	Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Schulbildung:

08/1996-07/2003	Kurfürst-Joachim-Friedrich-Gymnasium Wolmirstedt, Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife
08/1994-07/1996	Sekundarschule Angern
09/1990-07/1994	Grundschule Angern

Zivildienst:

08/2003-05/2004	Seniorenwohnpark Sonnenhof in Dolle (Sachsen-Anhalt)
-----------------	--

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von 01.04.2011-12.12.2013 an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie, Abteilung für Biochemische Pharmazie angefertigt.

Ergebnisse aus eigenständigen vorherigen Arbeiten im Zeitraum vom Nov. 2009-März 2011 in der selbigen Arbeitsgruppe unter Förderung mittels Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz des Landes Sachsen-Anhalt wurden in der Arbeit mit verwendet.

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich gemäß der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die daraus wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Die Dissertation wurde ausschließlich der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt und an keiner anderen universitären Einrichtung weder im In- noch im Ausland zur Erlangung des Doktorgrades eingereicht.

Halle (Saale), 03. Juni 2014

Christian Wölk