

**„KATIONISCHE LIPIDE BASIEREND AUF MALONSÄURECHEMIE –
BIOPHYSIKALISCHE BETRACHTUNGEN UND ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN IN
DER PHARMAZIE MIT SCHWERPUNKT NUKLEINSÄURE-DELIVERY“**

KUMULATIVE HABILITATIONSSCHRIFT

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium habilitatus (Dr. rer. nat. habil.)

Vorgelegt der

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

Von

Herrn Dr. rer. nat. Christian Wölk
geboren am 20.05.1984 in Wolmirstedt

GUTACHTER/IN:

1. Prof. Dr. Thomas Groth, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. Dagmar Fischer, Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg
3. Prof. Dr. Langguth, Johannes Gutenberg Universität Mainz ...

Eingereicht: 19. September 2021

Verteidigt: 14. Juni 2022

Probevorlesung: 10. Januar 2023

In der Wissenschaft gibt es nie ein Erreichen des Ziels.

In der Wissenschaft gibt es immer nur Etappenziele.

Henning M. Beier

Ich widme diese Arbeit meiner Frau Nicole und meinen Kindern Paul und Ella.

Ich hoffe, ich habe eine gute Balance zwischen Arbeit und Familie gefunden.

Inhaltsverzeichnis

1	Abbildungsverzeichnis.....	I
2	Tabellenverzeichnis	III
3	Abkürzungsverzeichnis.....	IV
4	Vorbemerkung	VII
5	Einführung in das Thema.....	1
6	Kationische Lipide auf Malonamid-Basis – Einbettung der Arbeiten im Rahmen der Habilitation in die Historie dieser Lipidklasse.....	22
7	Ergebnisse im Rahmen der Habilitationstätigkeit.....	24
7.1	Untersuchung der Nukleinsäurekomplexierung verschiedener Lipidformulierungen unter Berücksichtigung der Strukturaufklärung.....	24
7.1.1	Allgemeine Erläuterungen	24
7.1.2	Strukturuntersuchungen an Malonsäurediamiden der ersten Generation	27
7.1.3	Strukturuntersuchungen an Malonsäurediamiden der zweiten Generation	29
7.2	Optimierung ausgewählter Lipidmischungen als Transfektionssysteme für die systemische Applikation	32
7.2.1	Allgemeine Erläuterungen	32
7.2.2	OO4/DOPE 1/3 Lipoplexe.....	32
7.2.3	T14diLys/DOPE 1/2 (n/n) Lipoplexe	34
7.2.4	DiTT4 Lipoplexe.....	35
7.2.5	OH4/DOPE 1/1 (n/n) Lipoplexe	37
7.3	Spezielle Anwendungen von Malonsäurediamiden	41
7.3.1	Allgemeine Erläuterung	41
7.3.2	Malonsäurediamide der 2. Generation im Bereich der regenerativen Medizin mit Schwerpunkt auf die Knochenregeneration	41
7.3.3	Darstellung amphiphiler ultradünner Filme für Oberflächenmodifikationen mittels 2D-Polymerisation.	45

8	Zusammenfassung und Ausblick.....	47
9	Literaturverzeichnis.....	50
10	Lebenslauf.....	61
11	Veröffentlichte Originalarbeiten.....	62
12	Danksagung.....	66
13	Erklärung.....	68
14	Anhang 1 - Artikel 1.....	69
15	Anhang 2 - Artikel 2.....	70
16	Anhang 3 - Artikel 3.....	71
17	Anhang 4 - Artikel 4.....	72
18	Anhang 5 - Artikel 5.....	73
19	Anhang 6 - Artikel 6.....	74
20	Anhang 7 - Artikel 7.....	75
21	Anhang 8 - Artikel 8.....	76
22	Anhang 9 - Artikel 9.....	77
23	Anhang 10 - Artikel 10.....	78
24	Anhang 11 - Artikel 11.....	79
25	Anhang 12 - Artikel 12.....	80
26	Anhang 13 - Artikel 13.....	81
27	Anhang 14 - Artikel 14.....	82
28	Anhang 15 - Artikel 15.....	83
29	Anhang 16 - Artikel 16.....	84
30	Anhang 17 - Artikel 17.....	85
31	Anhang 18 - Artikel 18.....	86

1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 – Schematische Gegenüberstellung von Mizellen und Liposomen.....	2
Abb. 2 – Gängige lyotrope Mesophasen..	4
Abb. 3 – Zusammenhang zwischen Molekülform und Packungseigenschaften von Amphiphilen und die daraus resultierenden bevorzugten Molekülassoziate im wässrigen Lösungsmittel.	5
Abb. 4 – Schematische Darstellung der Beladungsmöglichkeiten von Liposomen mit hydrophilen und lipophilen Arzneistoffen am Beispiel von unilamellaren Liposomen... ..	6
Abb. 5 – Schematische Darstellung der <i>in vivo</i> und <i>ex vivo</i> Gentherapie-strategien. Die Abbildung ist modifiziert nach (FDA, 07.25.2018).	11
Abb. 6 – Gegenüberstellung der Kosten von Gentherapeutika auf dem US Markt nach Bloomberg (James Paton, 2019MESZ Updated on 2019MESZ).....	14
Abb. 7 – Schematische Darstellung der Polyfektion nach (Zhang und Wagner, 2017).....	15
Abb. 8 – Repräsentative Vertreter von kationischen Polymeren für den Nukleinsäuretransfer.	16
Abb. 9 – Anteil verschiedener Nukleinsäuretransfersysteme in den angemeldeten klinischen Studien zur Gentherapie nach http://www.abedia.com/wiley (Stand Dezember 2019) ..	17
Abb. 10 – Darstellung des allgemeinen strukturellen Aufbaus von kationischen Lipiden für den Nukleinsäuretransfer.....	18
Abb. 11 – Repräsentative Vertreter kationischer Lipide, welche Teil groß angelegter Struktur/Wirkungs-Untersuchungen sind.	19
Abb. 12 – Darstellung verbreiteter Lipoplexstrukturen nach (Majzoub <i>et al.</i> , 2016).....	21
Abb. 13 – Allgemeine Darstellung kationischer Lipide deren Synthese auf Malonsäure-Basis beruht.....	23
Abb. 14 – Schematische Darstellung eines SAXS Experiments inklusive exemplarisches Beugungsmuster und die dazugehörige lamellare Mesophase (L_a).	24
Abb. 15 – Schematische Darstellung verschiedener Charakterisierungsmethoden an der LANGMUIR-Monoschicht nach (Stefaniu und Brezesinski, 2014b) und (Blume und Kerth, 2013).....	25
Abb. 16 – Vertreter der Malonsäurediamide der 1. Generation, welche in diesem Abschnitt behandelt werden.	27

Abb. 17 – Substanzbibliothek von Malonsäurediamiden der zweiten Generation mit systematischen Modifikationen der Alkylkettenmuster und der hydrophilen Kopfgruppenstruktur.	29
Abb. 18 – Neu entwickelte kationische Lipide, welche in effektive Lipidformulierungen resultierten und die in den folgenden Kapiteln näher betrachtet werden.	32
Abb. 19 – Weiterführende Untersuchungen von OH4/DOPE 1/1 Lipoplexten.	39
Abb. 20 – Erste Ergebnisse zur Wechselwirkung von ADHSC's mit Lipoplex-beladenen PEM's.	44
Abb. 21 – Ergebnisse der Pilotstudien zur Polymerisation an der Luft/Wasser-Grenzfläche .	46

2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Übersicht der Liposomalen Arzneimittelformulierungen in der klinischen Praxis nach (Bulbake <i>et al.</i> , 2017).....	7
Tabelle 2 - Auflistung von in Europa zugelassenen Gentherapeutika nach Paul Ehrlich Institut (Stand 05.12.2020) (PEI, 2020).....	8
Tabelle 3 - Auflistung von in Europa zugelassenen siRNA-Therapeutika (Stand 08.11.2020).	9
Tabelle 4 – Tabelle ausgesuchter viraler Gentransfersysteme nach (Kay <i>et al.</i> , 2001; Burton <i>et al.</i> , 2002; O'Connor und Crystal, 2006; Counsell <i>et al.</i> , 2017).	13

3 Abkürzungsverzeichnis

ADA-SCID	<i>ADA-Severe Combined Immunodeficiency</i> (schwerer kombinierter Immundefekt durch Adenosindeaminase-Mangel)
ADHSC	<i>Adipo-Derived Human Stem Cells</i> (humane Stammzellen aus Fettgewebe)
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i> (heute: internationale Standardisierungsorganisation)
ATMP	<i>Advanced Therapy Medicinal Product</i> (Arzneimittel für neuartige Therapien)
BMP	<i>Bone Morphogenetic Proteins</i>
CAR-T-Zellen	<i>Chimeric Antigen Receptor</i> – T-Zellen (chimärer Antigenrezeptor)
CAM	Chorioallantoismembran
DC-Chol	3 β -[N-(N',N'-Dimethylaminoethan)carbonyl]cholesterolhydrochlorid
d.h.	das heißt
DMPC	Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DMPE	Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
DOPE	Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DODAB	Dimethyldioctadecylammoniumbromid
DOSPA	2,3-Dioleyloxy-N-[2-(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate
DOTMA	N-[1-(2,3-Dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> (dynamische Differenzkalorimetrie)
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Europäische Arzneimittel-Agentur)
EudraCT Nummer	<i>European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trials</i> (Register für klinische Studien mit Humanarzneimitteln in der Europäischen Union)
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i> (US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel)

GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
GIXD	<i>Grazing Incidence X-ray Diffraction</i> (Röntgenbeugung unter streifendem Einfall)
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i> (Gute Herstellungspraxis)
hpf	<i>Hours Post Fertilization</i> (Stunden nach der Befruchtung)
hpf	<i>Hours Post Injection</i> (Stunden nach der Injektion)
IR	Infrarotspektroskopie
IRRAS	<i>Infrared-Reflection-Adsorption-Spectroscopy</i> (Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie)
JNCL	Juvenile Neuronale Ceroid Lipofuszinose
lipid 3	<i>N</i> -[2-(<i>N</i> -(2-Aminoethyl)- <i>N</i> -{2-[<i>N</i> -(2,6-diamino-1-oxohexyl)amino]ethyl}amino)ethyl]- <i>N</i> ',2-di[(9 <i>Z</i>)-octadec-9-enyl]propandiamid
lipid 6	<i>N</i> -[2-(<i>N,N</i> -Bis{2-[<i>N</i> -(2,6-diamino-1-oxohexyl)amino]ethyl}amino)ethyl]- <i>N</i> ',2-di[(9 <i>Z</i>)-octadec-9-enyl]propandiamid
lipid 8	<i>N</i> '-2-[(2,6-diamino-1-oxohexyl)amino]ethyl-2-hexadecyl- <i>N</i> -[(9 <i>Z</i>)-octadec-9-enyl]propandiamid (technisch)
lipid 8p	<i>N</i> '-2-[(2,6-diamino-1-oxohexyl)amino]ethyl-2-hexadecyl- <i>N</i> -[(9 <i>Z</i>)-octadec-9-enyl]propandiamid (pure)
mRNA	<i>Massenger RNA</i> („Boten“ Ribonukleinsäure)
N/P	Verhältnis von primären Aminogruppen zu Phosphateinheiten von Polynukleotiden
OH4	<i>N</i> -{6-Amino-1-[<i>N</i> -(9 <i>Z</i>)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2 <i>S</i>)-2-yl}- <i>N</i> '-{2-[<i>N,N</i> -bis(2-aminoethyl)amino]ethyl}-2-hexadecylpropandiamid
OH14	<i>N</i> -{6-Amino-1-[<i>N</i> -(9 <i>Z</i>)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2 <i>S</i>)-2-yl}- <i>N</i> '-[2-(<i>N</i> -{(2 <i>S</i>)-2,6-diamino-1-oxohexyl}amino)ethyl]-2-hexadecylpropandiamid
OO4	<i>N</i> -{6-Amino-1-[<i>N</i> -(9 <i>Z</i>)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2 <i>S</i>)-2-yl}- <i>N</i> '-{2-[<i>N,N</i> -bis(2-aminoethyl)amino]ethyl}-2-[(9 <i>Z</i>)-octadec-9-enyl]propandiamid
OO10	<i>N</i> -(2-Aminoethyl)- <i>N</i> '-{6-amino-1-[<i>N</i> -(9 <i>Z</i>)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2 <i>S</i>)-2-yl}-2-[(9 <i>Z</i>)-octadec-9-enyl]propandiamid

OO14	<i>N</i> -{6-Amino-1-[<i>N</i> -(9 <i>Z</i>)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2 <i>S</i>)-2-yl}- <i>N</i> '-[2-(<i>N</i> -{(2 <i>S</i>)-2,6-diamino-1-oxohexyl} amino)ethyl]-2-[(9 <i>Z</i>)-octadec-9-enyl]propandiamid
pDNA	Desoxyribonukleinsäure Plasmid
PEI	Polyethylenimin
PEM	Polyelektrolytmultilayer
RISC	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i> (RNA-induzierter Enzymkomplex mit RNase Aktivität)
RNase H	Ribonuklease H
SAINT-2	<i>N</i> -Methyl-4(dioleyl)methylpyridiniumchlorid
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i> (“Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom“-Coronavirus-2)
SAXS	<i>Small Angle X-ray Scattering</i> (Kleinwinkelröntgenbeugung)
siRNA	<i>Small Interfering RNA</i> („kleine eingreifende“ Ribonukleinsäure)
T14diLys	2-Tetradecylhexadecanoic acid-(2-bis {[2-(2,6-diamino-1-oxohexyl)amino]ethyl} aminoethyl)amid
TH4	<i>N</i> -[6-Amino-1-oxo-1-(<i>N</i> -tetradecylamino)hexan-(2 <i>S</i>)-2-yl]- <i>N</i> '-{2-[<i>N,N</i> -bis(2-aminoethyl)amino]ethyl}-2-hexadecylpropandiamid
TH10	<i>N</i> -(2-Aminoethyl)- <i>N</i> '-[6-amino-1-oxo-1-(<i>N</i> -tetradecylamino)hexan-(2 <i>S</i>)-2-yl]-2-hexadecylpropandiamid
TH14	<i>N</i> -[6-Amino-1-oxo-1-(<i>N</i> -tetradecylamino)hexan-(2 <i>S</i>)-2-yl]- <i>N</i> '-[2-(<i>N</i> -{(2 <i>S</i>)-2,6-diamino-1-oxohexyl} amino)ethyl]-2-hexadecylpropandiamid
TRXF	<i>Time Resolved X-ray Fluorescence</i> (zeitaufgelöste Röntgenfluorescence)
WAXS	<i>Wide Angle X-ray scattering</i> (Weitwinkelröntgenbeugung)
XR	<i>X-ray Reflectivity</i> (Röntgenreflektivität)
ZNS	Zentrales Nervensystem

4 Vorbemerkung

Die Forschungstätigkeiten im Rahmen der Habilitation werden in kumulativer Weise präsentiert. Die ausgewählten Publikationen, welche in die vorliegende Arbeit einfließen, werden als Anlagen angehängt um dem Leser einen vollständigen Überblick zu liefern. Die beigefügten Arbeiten enthalten die experimentellen Daten sowie eine ausführliche Diskussion der resultierenden Ergebnisse. In dieser Arbeit werden, unter Verweis auf die jeweils relevante(n) Publikation(en), die wesentlichen Fragestellungen und Resultate kurz dargestellt und diskutiert. Dabei wird das vorliegende Verzeichnis als eigenes Referenzverzeichnis genutzt. Im Haupttext wird auf den jeweiligen Artikel mit **fetten Buchstaben** hingewiesen: Bsp. **Artikel 1**. Die folgenden Artikel befinden sich im Anhang dieser Arbeit. Auf das Einfügen der jeweiligen *Supporting Information* der jeweiligen Artikel wurde verzichtet, um den Umfang dieser Schrift im Rahmen zu halten.

Referenzverzeichnis der dieser Habilitationsschrift zu Grunde liegenden Veröffentlichungen:

Mein Name wurde extra gekennzeichnet. Der Stern (*) markiert Arbeiten in denen ich als Korrespondenzautor gelistet bin.

Artikel 1

C. Wölk*, C. Janich, U. Bakowsky, A. Langner, G. Brezesinski: *Malonic acid based cationic lipids – The way to highly efficient DNA-carriers*. **Advances in Colloid and Interface Science** 2017 (248), p. 20-34, DOI 10.1016/j.cis.2017.08.003

Artikel 2

M. Dittrich, C. Brauer, S.S. Funari, B. Dobner, G. Brezesinski, **C. Wölk***: *Interactions of Cationic Lipids with DNA – a Structural Approach*. **Langmuir** 2018 (34), p. 14858-14868, DOI 10.1021/acs.langmuir.8b01635

Artikel 3

D. Pawlowska, C. Janich, A. Langner, B. Dobner, **C. Wölk***, G. Brezesinski: *The Impact of Alkyl-Chain Purity on Lipid-Based Nucleic Acid Delivery Systems – Is the Utilization of Lipid Components with Technical Grade Justified?* **ChemPhysChem** 2019 (20), p. 2110-2121, DOI 10.1002/cphc.201900480

Artikel 4

S. Tassler, **C. Wölk**, C. Janich, B. Dobner, G. Brezesinski: *Lysine-based amino-functionalized lipids for gene transfection: the protonation state in monolayers at the air-liquid interface*. **Physical Chemistry Chemical Physics** 2017 (19), p. 20271-20280, DOI 10.1039/C7CP03107F

Artikel 5

S. Tassler, D. Pawlowska, C. Janich, B. Dobner, **C. Wölk**, G. Brezesinski: *Lysine-based amino-functionalized lipids for gene transfection: the influence of chain composition on 2D properties*. **Physical Chemistry Chemical Physics** 2018 (20), p. 6936-6944, DOI 10.1039/C8CP00047F

Artikel 6

S. Tassler, D. Pawlowska, C. Janich, J. Giselbrecht, S. Drescher, A. Langner, **C. Wölk***, G. Brezesinski: *Lysine-based amino-functionalized lipids for gene transfection: the influence of chain composition on 3D phase behaviour and transfection performance*. **Physical Chemistry Chemical Physics** 2018 (20), p. 17393-17405, DOI 10.1039/C8CP01922C

Artikel 7

S. Tassler, B. Dobner, L. Lampp, R. Ziólkowski, E. Malinowska, **C. Wölk***, G. Brezesinski: *DNA Delivery Systems Based on Peptide-Mimicking Cationic Lipids—The Effect of the Co-Lipid on the Structure and DNA Binding Capacity*. **Langmuir** 2019 (35), 13, p. 4613-4625, DOI 10.1021/acs.langmuir.8b04139

Artikel 8

J. Giselbrecht, C. Janich, S.R. Pinnapireddy, G. Hause, U. Bakowsky, **C. Wölk***, A. Langner: *Overcoming the polycation dilemma - Explorative studies to characterise the efficiency and biocompatibility of newly designed lipofection reagents*. **International Journal of Pharmaceutics** 2018 (541), p. 81-92, DOI 10.1016/j.ijpharm.2018.02.029

Artikel 9

N. Erdmann, **C. Wölk***, I. Schulze, C. Janich, M. Folz, S. Drescher, M. Dittrich, A. Meister, J. Vogel, T. Groth, B. Dobner, A. Langner: *Tris(2-aminoethyl)-amine-based α -branched fatty acid amides – Synthesis of lipids and comparative study of transfection efficiency of their lipid formulations*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 2015 (96), p. 349-362, DOI 10.1016/j.ejpb.2015.08.011

Artikel 10

J. Giselbrecht, S. Wiedemann, S.R. Pinnapireddy, N. Goergen, H. Loppnow, D. Sedding, F. Erdmann, U. Bakowsky, G. Hause, M. Lúcio, A. Langner, **C. Wölk***: *Nucleic acid carrier composed of a branched fatty acid lysine conjugate—Interaction studies with blood components*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 2019 (184), p. 110547-110561, DOI 10.1016/j.colsurfb.2019.110547

Artikel 11

C. Wölk*, C. Janich, D. Pawlowska, S. Drescher, A. Meister, G. Hause, B. Dobner, A. Langner, G. Brezesinski: *Lamellar versus Micellar Structures - Aggregation Behaviour of a Three-Chain Cationic Lipid Designed for Nonviral Polynucleotide Transfer*. **ChemPhysChem** 2015 (16), p. 2115-2126, DOI 10.1002/cphc.201500188

Artikel 12

S.R. Pinnapireddy, J. Giselbrecht, B. Strehlow, C. Janich, C. Husteden, A. Meister, H. Loppnow, D. Sedding, F. Erdmann, G. Hause, G. Brezesinski, T. Groth, A. Langner, U. Bakowsky, **C. Wölk***. *A triple chain polycationic peptide-mimicking amphiphile – efficient DNA-transfer without co-lipids*. **Biomaterial Science** 2020 (8), p. 232-249, DOI 10.1039/C9BM01093A

Artikel 13

C. Janich, **C. Wölk**, F. Erdmann, T. Groth, G. Brezesinski, B. Dobner, A. Langner: *Composites of malonic acid diamides and phospholipids — Impact of lipoplex stability on transfection efficiency*. **Journal of Controlled Release** 2015 (220), p. 295–307, DOI 10.1016/j.jconrel.2015.10.045

Artikel 14

C. Janich, S. Taßler, A. Meister, G. Hause, J. Schäfer, U. Bakowsky, G. Brezesinski, **C. Wölk***: *Structures of malonic acid diamide/phospholipid composites and their lipoplexes*. **Soft Matter** 2016 (12), p. 5854-5866, DOI 10.1039/C6SM00807K

Artikel 15

C. Janich, A. Hädicke, U. Bakowsky, G. Brezesinski, **C. Wölk***: *Interaction of DNA with Cationic Lipid Mixtures—Investigation at Langmuir Lipid Monolayers*. **Langmuir** 2017 (33), p. 10172-10183, DOI 10.1021/acs.langmuir.7b02014

Artikel 16

C. Husteden, F. Doberenz, N. Goergen, S. R. Pinnapireddy, C. Janich, A. Langner, F. Syrowatka, A. Repanas, F. Erdmann, J. Jedelská, U. Bakowsky, T. Groth, **C. Wölk***: *Contact-Triggered Lipofection from Multilayer Films Designed as Surfaces for In Situ Transfection Strategies in Tissue Engineering*. **ACS Applied Materials and Interfaces** 2020 (12), p. 8963-8977, DOI 10.1021/acsami.9b18968

Artikel 17

Y.A. Brito Barrera, G. Hause, M. Menzel, C.E.H. Schmelzer, E. Lehner, K. Mäder, **C. Wölk**, T. Groth: *Engineering osteogenic microenvironments by combination of multilayers from collagen type I and chondroitin sulfate with novel cationic liposomes*. **Materials Today Bio** 2020 (7) p. 100071, DOI 10.1016/j.mtbio.2020.100071

Artikel 18

C. Stefaniu, **C. Wölk**, G. Brezesinski, E. Schneck: *Relationship between structure and molecular interactions in monolayers of specially designed aminolipids*. **Nanoscale Advances** 2019 (1), p. 3529-3536, DOI 10.1039/C9NA00355J

5 Einführung in das Thema

Amphiphile Moleküle sind hinsichtlich ihrer Struktur in einen hydrophilen und lipophilen Bereich polarisiert. Sie sind essentielle Hilfsstoffe in der pharmazeutischen Technologie um Arzneiformen zu formulieren. Die Anwendungen sind vielfältig, wobei der Einsatz als Emulgator, Konservierungsmittel, Netzmittel und strukturgebender Bestandteil in halbfesten Zubereitungen als wesentliche Beispiele zu nennen sind (Lippold *et al.*, 2017). Eine wesentliche Eigenschaft von amphiphilen Molekülen ist die Anlagerung an Grenzflächen und das Bestreben Molekül-Assoziate auszubilden.

Die Anlagerung der amphiphilen Moleküle an Grenzflächen führt zu verschiedenen Anwendungen. Durch Anlagerung an der Grenzfläche zwischen zwei nicht-mischbaren Flüssigkeiten wird die Grenzflächenspannung zwischen diesen herabgesetzt. Dieses Phänomen wird für die Stabilisierung von Emulsionen (Öl-in-Wasser oder Wasser-in-Öl) ausgenutzt. Die dafür verwendeten amphiphilen Hilfsstoffe werden auch als Emulgatoren bezeichnet. Die Anlagerung an die Luft/Wasser-Grenzfläche und die damit verbundene Herabsetzung der Oberflächenspannung von Flüssigkeiten wird z.B. für die Modifizierung der Benetzung von Feststoffen ausgenutzt. Auch die Anlagerung an die fest/flüssig-Grenzfläche wird für die Stabilisierung von Suspensionen ausgenutzt (Lippold *et al.*, 2017).

Eine Besonderheit ist die erwähnte Ausbildung von Molekül ASSOZIATEN durch Selbstorganisation, welche kolloid-disperse und grob-disperse Systeme bilden können. Auch die Ausbildung lyotroper Flüssigkristalle resultiert aus dieser Eigenschaft. Welche Form der Assoziatbildung stattfindet ist von diversen Parametern abhängig: der Art des Lösungsmittels, der chemischen Natur und der Konzentration der Amphiphile, dem pH-Wert, sowie der Art und Konzentration der Elektrolyte im Dispersionsmedium; um nur einige Faktoren zu nennen.

Zielführend soll an diesem Punkt auf zwei wesentliche Kolloid-Assoziate von amphiphilen Verbindungen eingegangen werden, welche in der pharmazeutischen Technologie eine wichtige Rolle einnehmen. Als erstes sind die Mizellen zu nennen. Mizellen sind kolloidale Molekül-Assoziate, welche sich spontan aus Amphiphilen in Lösung bilden. Die treibende Kraft für diese spontane Assoziation ist der hydrophobe Effekt, wodurch lipophile Molekülteile im Inneren der Mizellstruktur abgeschirmt werden. **Abb. 1** veranschaulicht die Struktur einer Kugelmizelle, wobei auch erwähnt werden muss, dass andere Mizellgeometrien ebenfalls existieren (Hashizume und Harada, 2015). Der Begriff Mizelle für

Assoziationskolloide wurde Anfang des 20. Jahrhunderts von MCBAIN geprägt (Dörfler, 2002). Mizell-Assoziate sind thermodynamisch stabil. Die Selbstassoziation erfolgt oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) (Williams *et al.*, 1955) und der kritischen Mizellbildungstemperatur (CMT) (Flockhart, 1961; Bang *et al.*, 2004). Unterhalb der CMC liegen mizellbildende Amphiphile gelöst vor und unterhalb der CMT kristallisieren diese aus und bilden trübe Suspensionen. Zu den Assoziationskolloiden können auch Liposomen gerechnet werden, solange sie den Größenbereich von ca. 500 nm nicht überschreiten, wobei diese Grenze nicht genau definiert ist. Diese Form der Selbst-Assoziate kann aber auch den kolloidalen Größenbereich überschreiten. Liposomen sind Lipidaggregate, welche 1964 erstmals von BANGHAM beschrieben wurden (Bangham und Horne, 1964). Der Begriff Liposom wurde 1968 von SESSA und WEISSMANN geprägt (Sessa und Weissmann, 1968). Diese vesikulären Molekül-Assoziate bestehen aus einer oder mehreren Lipiddoppelschichten, welche ein wässriges Kompartiment vom wässrigen Dispersionsmittel abgrenzen (siehe **Abb. 1**). Je nach Größe der Vesikel und Anzahl der Lipiddoppelschichten unterscheidet man zwischen (Hope *et al.*, 1986):

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

Die Grenze zwischen LUV und SUV ist jedoch als fließend anzusehen, so findet man in der Literatur auch andere Grenzwerte als 100 nm (Prokopovich, 2016).

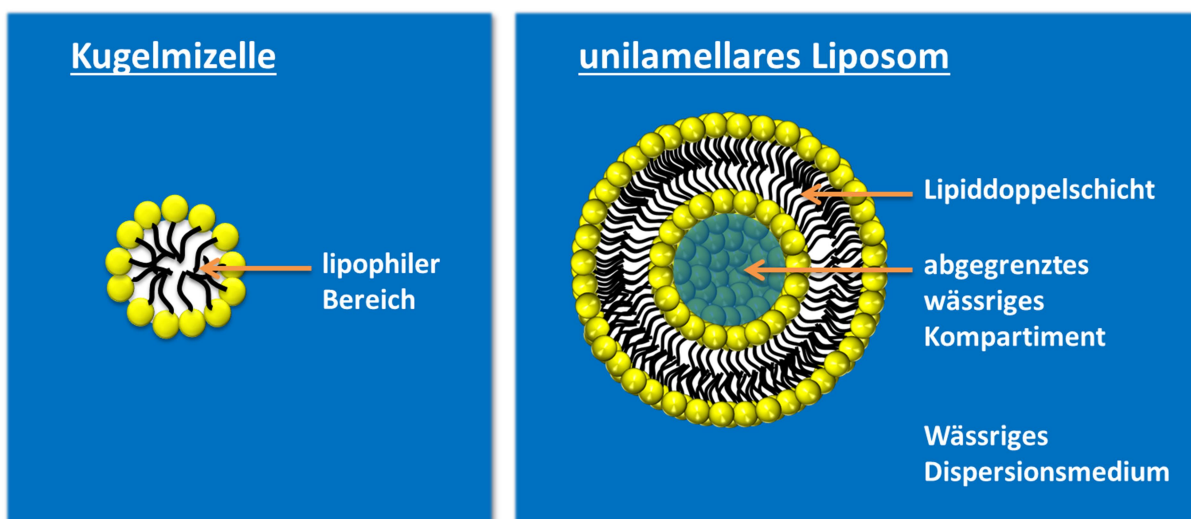


Abb. 1 – Schematische Gegenüberstellung von Mizellen und Liposomen.

In höheren Konzentrationen bilden Amphiphile durch Selbstorganisation Überstrukturen im Lösungsmittel aus, sogenannte flüssigkristalline Phasen. Da diese Strukturbildungen von amphiphilen Molekülen in einem Lösungsmittel stattfinden, werden diese auch als lyotrope Flüssigkristalle bezeichnet. Flüssigkristalle haben sowohl Eigenschaften von Feststoffen als auch von Flüssigkeiten. Sie bewegen sich demnach zwischen diesen beiden Aggregatzuständen und werden deshalb auch als Mesophasen bezeichnet. Im Folgenden soll ein kurzer Einblick in die Strukturvielfalt lyotroper Mesophasen gegeben werden, da dieses Verständnis für das Lesen der vorliegenden Arbeit von Bedeutung ist. Dabei soll die anerkannte erweiterte Nomenklatur basierend auf LUZZATI angewendet werden (**Abb. 2**) (Marsh, 2013; Luzzati *et al.*, 1968a; Luzzati *et al.*, 1968b):

Nach der Geometrie der Assoziatstrukturen und ihrer Fernordnung unterscheidet man in:

- L – lamellar,
- P – „*rippled*“, als „gewellt“ zu übersetzen,
- H – hexagonal,
- Q – kubisch (Auch hier können verschiedene kubische Phasen durch Abkürzungen chiffriert werden: G – Gyroid, D – Diamant, P – Primitiv. Dennoch wird hier häufig die kristallographische Bezeichnung aus Kombination der Abkürzungen für das BRAVAIS-Gitter und der HERMANN-MAUGUIN-Symbolik verwendet: $Ia3d = G$, $Pn3m = D$, $Im3m = P$, siehe **Abb. 2**) (Tschierske, 2013)

Über die tiefgestellten Indizes in griechischen oder lateinischen Buchstaben erhält man die Informationen über die geometrische Anordnung der Alkylketten:

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

Die folgenden tiefgestellten Indizes kennzeichnen das Phasenverhalten:

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

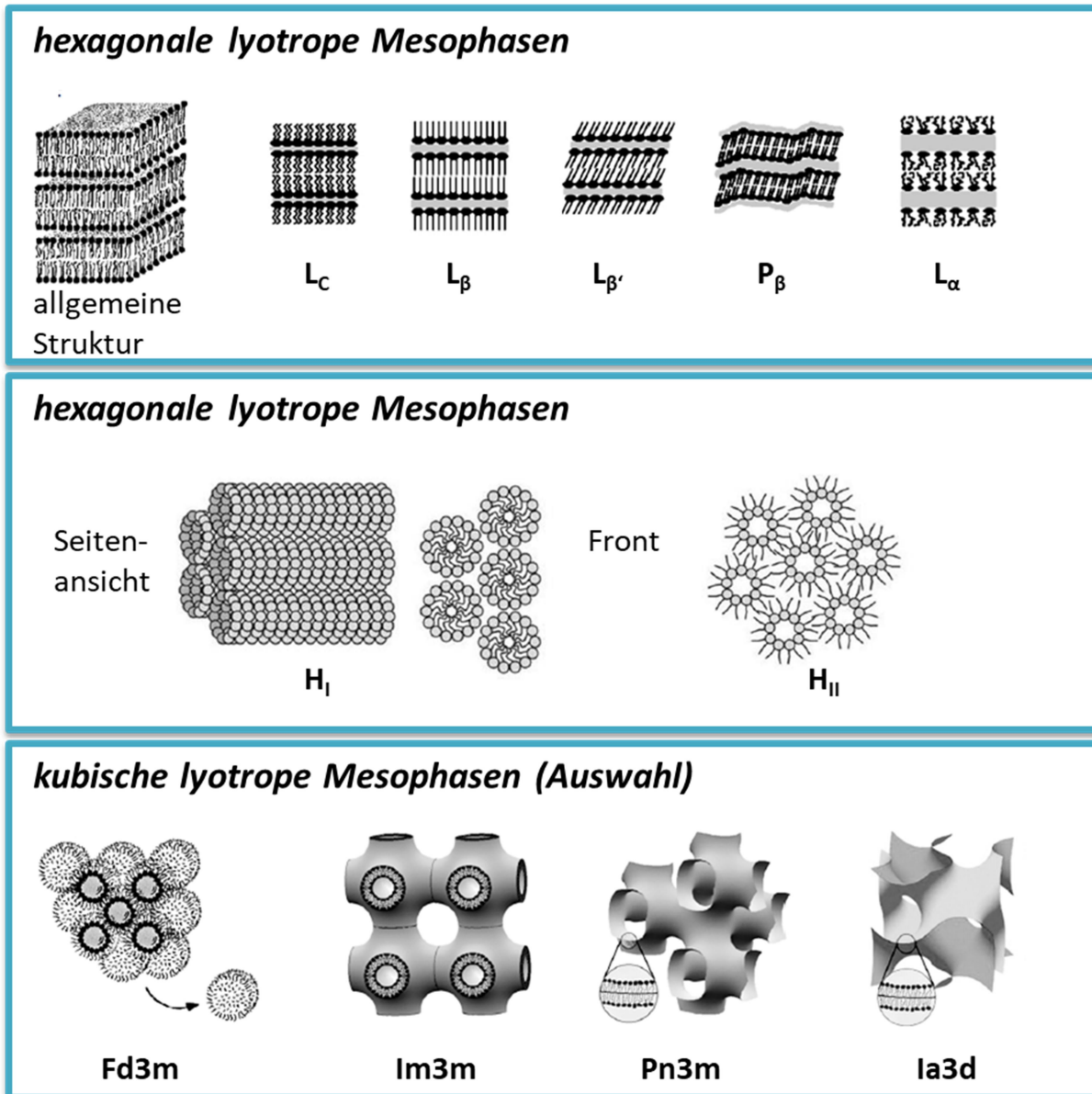


Abb. 2 – Gängige lyotrope Mesophasen. Die ausgewählten Beispiele der kubischen Strukturen sind zur Differenzierung nicht mit Q gekennzeichnet sondern anhand des BRAVAIS-Gitters (primitiv – P; innenzentriert – I; und allseitig flächenzentriert – F) unter Anwendung der HERMANN-MAUGUIN-Symbolik zur Beschreibung von Symmetrieelementen und Symmetriegruppen (Koynova und Tenchov).

Einen wesentlichen Einfluss auf die Art der Molekül-Assoziate, welche von Amphiphilen gebildet werden, hat ihre Molekülgeometrie. Der Zusammenhang zwischen Molekülform und Assoziationsverhalten wurde 1976 erstmals ausführlich von ISRAELACHVILI beschrieben und ist in **Abb. 3** dargestellt (Israelachvili *et al.*, 1976). Als Maß für die Molekülgeometrie des Amphiphils dient hierbei der kritische Packungsparameter (P), welcher nach **Gleichung 1** berechnet wird (Israelachvili, 2011):

Gleichung 1:

$$P = \frac{V_C}{A_{KG} \times l_C}$$

 P = kritischer Packungsparameter V_C = Volumen der Kohlenwasserstoffkette A_{KG} = laterale Fläche der Kopfgruppe l_C = Länge der Kohlenwasserstoffkette

Der Zusammenhang zwischen P und der bevorzugten Assoziatstruktur ist in **Abb. 3** veranschaulicht. So bilden Amphiphile mit $P < 1/3$ (kegelförmige Molekülgeometrie)

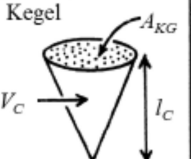




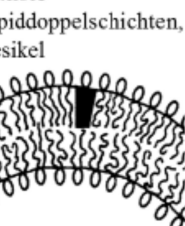
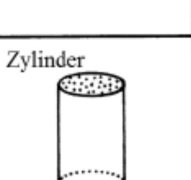
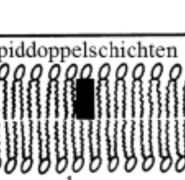

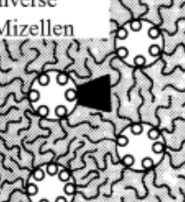
P	kritische Packungsform	Aggregatstruktur
$< 1/3$	Kegel 	Kugelmizelle 
$1/3-1/2$	Kegelstumpf 	zylindrische Mizelle 
$1/2-1$	Kegelstumpf 	flexible Lipiddoppelschichten, Vesikel 
~ 1	Zylinder 	Lipiddoppelschichten planar 
> 1	inverser Kegelstumpf 	inverse Mizellen 

Abb. 3 – Zusammenhang zwischen Molekülform und Packungseigenschaften von Amphiphilen und die daraus resultierenden bevorzugten Molekül ASSOZIATE im wässrigen Lösungsmittel. Die Abbildung ist modifiziert nach ISRAELACHVILI (Israelachvili *et al.*, 1980).

sphärische Mizellen. Nimmt P jedoch Werte zwischen $1/2 < P < 1$ (Kegelstumpf als beschreibende Geometrie) ein, sind vesikuläre Strukturen wie Liposomen die bevorzugten Assoziatstrukturen. Diese Lipide sind befähigt gekrümmte Lipiddoppelschichten auszubilden, eine Voraussetzung für die Ausbildung von Vesikeln. Lipide mit $P \approx 1$ (Zylinder) schließen sich auch zu Lipiddoppelschichten zusammen, wobei sich durch die fehlende Membrankrümmung eher planare lamellare Strukturen ausbilden. Auch die Ausbildung lyotroper Mesophasen lässt sich über das Molekülformkonzept ermitteln, da die geometrisch limitierten Packungsmöglichkeiten verschiedene Membrankrümmungen möglich machen, welche für die Ausbildung bestimmter Mesophasen nötig sind. H_1 Phasen bilden sich vorzugsweise mit Lipiden deren $P \approx 0,5$ aufweist. Kubische Phasen werden bevorzugt ausgebildet, wenn P Werte zwischen $0,5 < P < 1$ annimmt. Lipide mit $P \approx 1$ tendieren zu lamellaren Phasen.

Liposomen besitzen die Eigenschaft sowohl lipophile Stoffe in die Lipiddoppelschicht einzubauen als auch hydrophile Substanzen in

die von den Lipiddoppelschichten abgegrenzten Wasserkompartimente einzuschließen (**Abb. 4**). Das macht sie zu attraktiven Arzneiträgersystemen. In der pharmazeutischen Technologie sind Liposomen derzeit die nanoskalierten Arzneimittelträgersysteme, welche sich seit längerem in der klinischen Anwendung befinden. **Tabelle 1** listet zugelassene liposomale Formulierungen auf. Die derzeitigen Anwendungsgebiete beinhalten maligne Tumore, Mykosen, Schmerzzustände, photodynamische Therapie sowie Infektionsprophylaxe durch aktive Immunisierung.

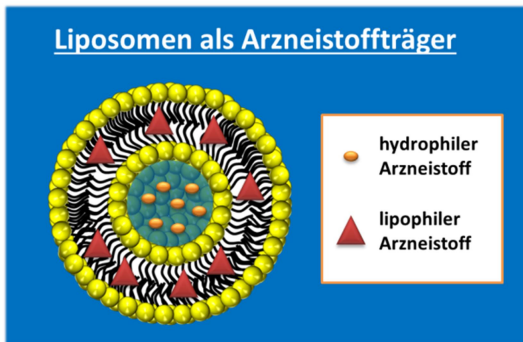


Abb. 4 – Schematische Darstellung der Beladungsmöglichkeiten von Liposomen mit hydrophilen und lipophilen Arzneistoffen am Beispiel von unilamellaren Liposomen.

Ein weiteres Anwendungsgebiet von Liposomen und anderen nanoskalierten Lipidformulierungen ist das Gebiet der Gentherapie. Gentherapeutika sind eine gesetzlich verankerte Gruppe von Arzneimitteln, welche zu den neuartigen Therapien gezählt werden und deren Hauptwirkung auf einer Nukleinsäure basiert. So definiert die EU-Richtlinie 2001/83/EG Gentherapeutika als Arzneimittelzubereitungen mit folgenden Eigenschaften:

- Ein Gentherapeutikum enthält eine rekombinante Nukleinsäure als aktive Substanz, welche direkt im Menschen angewendet wird oder diesem mittels geeignetem Vehikelsystem appliziert wird, mit der Absicht eine genetische Sequenz zu regulieren, zu reparieren, zu ersetzen, hinzuzufügen oder zu entfernen.
- Der therapeutische, prophylaktische oder diagnostische Effekt ergibt sich direkt aus der Sequenz der rekombinanten Nukleinsäure, welche im Gentherapeutikum enthalten ist oder deren Expressionsprodukt.
- Impfstoffe, welche auf Nukleinsäuren basieren, werden nicht als Gentherapeutikum eingeordnet.

(Freie Übersetzung des Teil IV, Abschnitts 2.1 der ANNEX I, EU-Richtlinie 2001/83/EG)

Tabelle 1 – Übersicht der Liposomalen Arzneimittelformulierungen in der klinischen Praxis nach (Bulbake *et al.*, 2017).

Präparat	Wirkstoff	Anwendungsgebiet
Doxil[®]	Doxurubicin	Krebserkrankungen
DaunoXome[®]	Daunorubicin	
Mepact[®]	Mifamurtid	
DepoCyt[®]	Cytarabin	
Marquibo[®]	Vincristin	
Myocet[®]	Doxorubicin	
Onivyde[™]	Irinotecan	
AmBisome[®]	Amphotericin B	Pilzkrankungen
Abelcet[®]	Amphotericin B	
Amphotec[®]	Amphotericin B	
DepoDur[™]	Morphin	Analgesie
Exparel[®]	Bupivacain	
Epaxal[®]	Hepatitis-A Virus, inaktiviert	Immunisierung
Inflexal[®]	Influenza-Virus-Oberflächenantigene	
Visudyne[®]	Verteporfin	photodynamische Therapie der exsudativen altersbezogenen Makuladegeneration

Damit wird verdeutlicht, dass die genetische Modifikation von Zellen und die damit verbundene Expression von Proteinen, welche auf der eingeschleusten Nukleinsäure kodiert sind, in einen klinisch relevanten Effekt resultieren. Gentherapeutika haben in der letzten Dekade die klinische Anwendung erreicht. Seit 2012 befinden sich Gentherapeutika auf dem europäischen Arzneimittelmarkt. Eine Zusammenfassung der derzeit von der EMA zugelassenen Gentherapeutika liefert **Tabelle 2**. Es ist dabei zu erwähnen, dass der Hersteller von *Glybera* die Zulassung aktuell ruhen lässt.

Darüber hinaus gibt es weitere Möglichkeiten mit Nukleinsäuren klinisch relevante Effekte zu erzielen, indem das Proteinexpressionsmuster von Zellen beeinflusst wird, ohne dass man eine Gentherapie nach gesetzlicher Definition vornimmt. Dabei handelt es sich zum Beispiel um die gezielte Unterdrückung der Proteinexpression mittels Antisense-Oligonukleotiden oder *small interfering RNA* (siRNA). Diese Strategien werden ebenfalls in zugelassenen Therapeutika genutzt (**Tabelle 3**). Der Effekt beruht auf einer sequenzgesteuerten Doppelstranghybridisierung mit einer komplementären mRNA-Sequenz, welche in einer

Blockade des Translationsprozesses resultiert. Bei Antisense-Oligonukleotiden wird vorrangig die mRNA mittels RNase H abgebaut, aber auch eine sterische Blockade der ribosomalen Translation wird angenommen (Braasch *et al.*, 2002). Bei der Suppression der Translation mittels siRNA ist die RNase Argonaute 2 im RISC-Komplex für den Abbau der mRNA verantwortlich (Setten *et al.*, 2019).

Tabelle 2 – Auflistung von in Europa zugelassenen Gentherapeutika nach Paul Ehrlich Institut (Stand 05.12.2020) (PEI, 2020).

Bezeichnung	Zulassungs/ Genehmigungsinhaber	Zulassungsdatum	Zugelassene Krankheit	Vektor
Glybera[®]	uniQure biopharma B.V.	25.10.2012	Lipoproteinlipase- defizienz	viral
Imlygic[®]	Amgen Europe B.V.	16.12.2015	Melanom	viral
Kymriah[™]	Novartis Europharm Ltd.	23.08.2018	Akute Lymphatische Leukämie, diffus großzelliges B-Zell-Lymphom	viral
Luxturna[®]	Spark Therapeutics Ireland Ltd.	22.11.2018	Retinale Dystrophie mit RPE65-Mutation	viral
Strimvelis[®]	GlaxoSmithKline Trading Services Limeted	26.05.2016	ADA-SCID	viral
Yescarta[®]	Kite PharmaEU B.V.	23.08.2018	diffus großzelliges B-Zell-Lymphom, Mediastinales großzelliges B- Zell-Lymphom	viral
Zolgensma[®]	AveXis EU Limited	18.05.2020	Spinale Muskelatrophie	viral
Zynteglo[®]	Bluebird bio (Netherlands) B.V.	29.05.2019	Beta Thalassämie	viral

Beide Mechanismen der Genkontrolle zeigen, dass die Einordnung eines auf Nukleinsäuren basierenden Arzneimittels als Gentherapeutikum oft schwierig und differenziert zu betrachten ist. Es ist offensichtlich, dass sowohl siRNA, als auch Antisense-Oligonukleotide, genetische Sequenzen regulieren. Diese Regulation beruht auch auf der Sequenz der Nukleinsäuren. Somit erfüllen beide Nukleinsäuretherapeutika teilweise die Kriterien der oben genannten

Definition von Gentherapeutika. Dennoch handelt es sich bei beiden um kurze, synthetische Nukleinsäuren, und nicht um eine rekombinante Nukleinsäure. Rekombinante DNA ist ein DNA-Molekül, welches *in vitro* unter Einsatz von DNA aus mindestens zwei verschiedenen Quellen/Organismen hergestellt wird. Die DNA-Sequenzen, die für die Rekombination verwendet werden, können aus demselben Organismus stammen, aber auch aus Individuen derselben Spezies oder aus ganz unterschiedlichen Organismenarten (Sadava *et al.*, 2019). Bei der Herstellung rekombinanter DNA können aber auch artifizielle Sequenzteile zum Einsatz kommen, was z.B. bei der CAR T-Zell Therapie verdeutlicht wird, welche auf einen artifiziellen chimären Antigenrezeptor beruht (Mohanty *et al.*, 2019) (Kymriah und Yescarta, **Tabelle 2**). Weiterhin resultieren siRNA und Antisense-Oligonukleotide nicht in Expressionsprodukten, die auf ihrer Sequenz basieren.

Tabelle 3 – Auflistung von in Europa zugelassenen siRNA-Therapeutika (Stand 08.11.2020).

Präparat	Hersteller	Zulassungsnummer	Anwendung
Onpattro®	Alnylam Pharmaceuticals	EMA/H/C/004699	hereditären Transthyretin- Amyloidose
Givlaari®	Alnylam Pharmaceuticals	EMA/H/C/004775	Akute hepatische Porphyrie
siRNA against TMPRSS6 mRNA	Therapeutics GmbH	EU/3/18/2132	Beta Thalassämie

Weitere interessante Therapieoptionen bieten medizinische Behandlungen mit mRNA als Arzneistoff. Bei der Verwendung von mRNA wird das therapeutische Potential des entsprechenden Translationsprodukts ausgenutzt. Somit sind mittels mRNA therapeutische Proteine zugänglich, wobei die zelluläre Proteinbiosynthesemaschinerie ausgenutzt wird um diese in dem behandelten Individuum *in situ* zu produzieren (Schlake *et al.*, 2019b; Schlake *et al.*, 2019a; Kranz *et al.*, 2016; Sahin *et al.*, 2014). Da die therapeutischen mRNA's durch gezielte Modifikationen als rekombinant anzusehen sind und der Herstellungsprozess meist auf *In-vitro*-Transkription beruht, ist die mRNA-Therapie auch als Gentherapie einzuordnen (Hinz *et al.*, 2017).

Derzeit gibt es in Deutschland einige erfolgreiche Biotechnologiefirmen, welche das therapeutische Potenzial von mRNA erforschen und in die klinische Anwendung etablieren wollen. Als Beispiele sind die ETHRIS GmbH, die CureVac AG und BIONTEC SE zu

nennen. Das Potential von mRNA als Arzneistoff wird deutlich, wenn man sich vor Augen hält, dass die beiden letzteren Unternehmen eine wichtige Rolle für die SARS-CoV-2 Impfstoffentwicklung einnehmen:

- BIONTEC Manufacturing GmbH: Das Unternehmen entwickelte und vertreibt, zusammen mit Pfizer, den ersten SARS-CoV-2 Impfstoff in der Europäischen Union, welcher auf mRNA beruht (Comirnaty[®], EU-Zulassungsnummer EU/1/20/1528).
- CureVac AG: Das Unternehmen hat einen Impfstoffkandidaten, basierend auf mRNA, gegen SARS-CoV-2 (Name: CVnCoV) in einer klinischen Studie der Phase 2b/3 (Stand 28.12.2020, EudraCT Nummer: 2020-003998-22, Studienname: HERALD).

Dennoch ist noch einmal zu erwähnen, dass durch die Anwendung der Nukleinsäuren zum Infektionsschutz diese Präparate in die Gruppe der Vakzinen einzuordnen sind, und nicht in die Gruppe der Gentherapeutika.

An dieser Stelle soll auch der Begriff „Arzneimittel für neuartige Therapien“ oder ATMP's (*Advanced Therapy Medicinal Products*) definiert werden. In §4 (9) des Gesetzes über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz - AMG) findet sich folgende Definition:

„Arzneimittel für neuartige Therapien sind Gentherapeutika, somatische Zelltherapeutika oder biotechnologisch bearbeitete Gewebeprodukte nach Artikel 2 Absatz 1 Buchstabe a der Verordnung (EG) Nr. 1394/2007 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 13. November 2007 über Arzneimittel für neuartige Therapien und zur Änderung der Richtlinie 2001/83/EG und der Verordnung (EG) Nr. 726/2004 (ABl. L 324 vom 10.12.2007, S. 121).“

Die Definition eines solchen Oberbegriffs ist sinnvoll, da die Grenzen zwischen den einzelnen neuartigen Therapien oft fließend sind. So sind die CAR-T Zellen sowohl in die Gruppe der somatischen Zelltherapeutika als auch der Gentherapeutika einzuordnen. Grund hierfür ist die Behandlung mit autologen T-Zelltransplantaten, welche im Labor genetisch modifiziert wurden, um den chimären Antigenrezeptor zu exprimieren.

Die Gentherapie stellt jedoch die pharmazeutische Technologie vor große Herausforderungen. Polynukleotide sind aus biopharmazeutischer Betrachtung Problemarzneistoffe, unabhängig davon, ob wir uns im Bereich der Gentherapie oder der Impfstoffe bewegen. So handelt es sich bei DNA und RNA um Phosphorsäurepolyester. Dies sind Makromoleküle mit einer hohen Dichte an negativen Ladungen. Diese Eigenschaft ist ungünstig für die passive

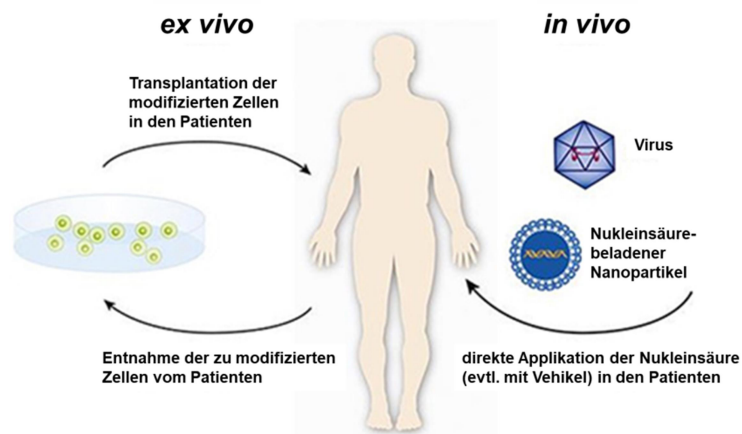


Abb. 5 – Schematische Darstellung der *in vivo* und *ex vivo* Gentherapiestrategien. Die Abbildung ist modifiziert nach (FDA, 07.25.2018).

Überwindung von Zellmembranen und somit für die Resorption in den Körper und die Diffusion in die Zellen. Weiterhin werden Polynukleotide von Nukleasen enzymatisch abgebaut. Zusammenfassend stellt die Überwindung von extrazellulären und intrazellulären Barrieren im Zielgewebe Nukleinsäure-basierte Therapien vor großen Herausforderungen.

Generell gibt es zwei Einteilungsmöglichkeiten für Gentherapeutika, die *In-vivo*- und die *Ex-vivo*-Gentherapie (Abb. 5). Bei der *In-vivo*-Therapie wird die Nukleinsäure in den oder am Organismus appliziert. Demgegenüber werden bei der *Ex-vivo*-Therapie vom Organismus isolierte Zellen *in-vitro* mit der Nukleinsäure modifiziert, um sie anschließend wieder in den Organismus zu applizieren. Beim zweiten Prozess handelt es sich also um eine autologe Zelltransplantation.

Um einen effizienten Nukleinsäuretransfer zu ermöglichen, werden spezielle Vehikelsysteme benötigt, welche gewebebedingte und zelluläre Barrieren überwinden. Werden Methoden verwendet, bei denen keine Viren zum Einsatz kommen, spricht man von Transfektion, um den Prozess des Einschleusens von Nukleinsäuren zu benennen.

Eine Möglichkeit sind physikalische Systeme (detaillierte Übersichtsarbeiten geben folgende Artikel (Mehier-Humbert und Guy, 2005; VILLEMEJANE und Mir, 2009)), bei denen durch Energieeintrag temporäre Defekte in zellulären Strukturen geschaffen werden, wodurch die Nukleinsäure in die Zellen gelangt. Die am häufigsten verwendeten physikalischen Systeme sind im Folgenden kurz angerissen:

- **Sonoporation** ist ein Prozess, bei dem therapeutischer Ultraschall mit einer Frequenz zwischen 1 und 3 MHz (oder geringer) und einer Intensität von 0.5 bis 3 W/cm² zum Einsatz kommt (Taniyama *et al.*, 2002).
- **Magnetofektion** beschreibt die forcierte Aufnahme von Nukleinsäuren mit Hilfe von paramagnetischen Nanopartikeln in einem Magnetfeld (Barnes *et al.*, 2007).

- **Elektroporation** nutzt den membranpermeabilisierenden Effekt kurzer intensiver elektrischer Impulse auf lebende Zellen aus. Diese Methode wurde bereits 1982 erstmals beschrieben (Neumann *et al.*, 1982) und entwickelte sich zu einer effizienten Methode für die genetische Modifikation von Zellen im *Ex-vivo*-Prozess. Laborausstatter bieten spezielle Systeme an, welche eine einfache Anwendung gewährleisten (z.B. die Nucleofector™ Technologie der Firma Lonza; Eporator® der Firma Eppendorf). Weiterhin wurden Methoden entwickelt um auch die Anwendung *in vivo* zu ermöglichen (Šatkauskas *et al.*, 2005; Heller und Heller, 2006; Aung *et al.*, 2009).
- **Biolistik** ist eine Methode bei der Schwermetallpartikel (üblicherweise Gold oder Wolfram) im Größenbereich von 1-5 µm an der Oberfläche mit Nukleinsäuren beladen werden. Anschließend werden diese beladenen Partikel mittels Gasstrahl in Zellen und Gewebe „geschossen“. Diese Methode findet in der biotechnologischen Veränderung von Pflanzen breite Anwendung. Dennoch bietet sie interessante Aspekte für die aktive Immunisierung durch die Applikation von Antigen-kodierenden Nukleinsäuren auf Haut und Schleimhäute (Loehr *et al.*, 2000; Fry *et al.*, 2019; Bergmann-Leitner und Leitner, 2015).
- Die „**Jet Injection**“ beruht auch auf einem ballistischen Prinzip, bei dem Flüssigkeiten unter hohem Druck als Mikrotropfen injiziert werden. Dabei werden Drücke bis zu 4 bar und Geschwindigkeiten bis zu 200 m/s verwendet (Walther *et al.*, 2009; Walther *et al.*, 2005).

Physikalische Methoden sind attraktiv, wenn das zu transfizierende Gewebe gut zugänglich für eine lokale Applikation ist oder wenn eine *Ex-vivo*-Therapie angestrebt wird. Wenn eine systemische Therapie realisiert werden soll, werden weitere Strategien benötigt. Vehikelsysteme mit Größen im Nanometerbereich bieten hier Vorteile. Eine große Gruppe stellen in diesem Gebiet die viralen Systeme. Viren infizieren Zellen, wobei sich evolutionär verschiedene Mechanismen entwickelt haben, um effizient Nukleinsäuren in die Wirtszelle einzuschleusen. Dieser Prozess des Nukleinsäuretransfers wird im Falle der Viren als Transduktion bezeichnet. Durch gentechnische Prozesse können Viren so modifiziert werden, dass eine selbstständige Replikation in der Wirtszelle nicht mehr möglich ist. Werden diese replikationsdefizienten Viren mit einer therapeutischen Nukleinsäuresequenz beladen, stellen diese ein attraktives und effizientes Vehikel für die Gentherapie dar (Sung und Kim, 2019; Nayerossadat *et al.*, 2012; Davidson und Breakefield, 2003; Kay *et al.*, 2001; O'Connor und Crystal, 2006). Die natürlich entwickelten Transduktionstypen führen zu unterschiedlichen Mechanismen, um zelluläre Barrieren zu überwinden. Weiterhin verteilen sich verschiedene

Viren in unterschiedliche zelluläre Kompartimente. Dies ermöglicht eine geeignete Auswahl des Virus, um die therapeutische Nukleinsäure an den gewünschten Wirkort zu bringen. Dieser ist für DNA der Zellkern, für siRNA oder mRNA aber das Zytoplasma. Weiterhin kodieren bestimmte Viren Nukleinsäuresequenzen für Enzyme, welche einen Einbau in das Wirtsgenom, und damit eine permanente Genexpression ermöglichen. Eine Übersicht über häufig verwendete virale Systeme liefert **Tabelle 4**.

Tabelle 4 – Tabelle ausgesuchter viraler Gentransfersysteme nach (Kay *et al.*, 2001; Burton *et al.*, 2002; O'Connor und Crystal, 2006; Counsell *et al.*, 2017).

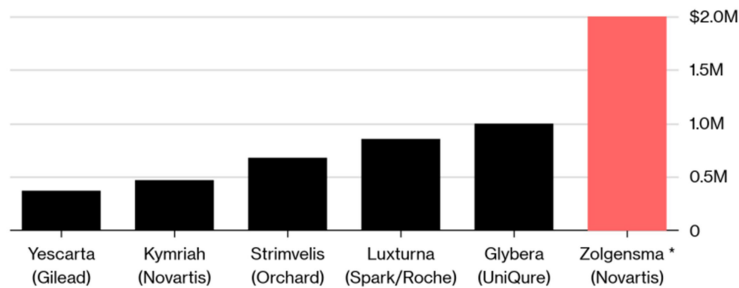
Virus	Art der Nukleinsäure	Dauer der Expression	Einbau in das Wirtsgenom	Beladungs-kapazität[#]
Adenoviren (verschiedene Serotypen)	DNA (doppelsträngig)	transient bis persistent (Je nach Gewebe)	nein, episomal	8 kb
Adeno-assoziertes Virus (verschiedene Serotypen)	DNA (einsträngig)	transient bis persistent (Je nach Gewebe)	ja, häufig episomal aber auch zufälliger Einbau ins Wirtsgenom	5 kb
Herpes Simplex Virus	DNA (doppelsträngig)	persistent	nein, episomal	30 kb
Retroviren	RNA (einsträngig)	Persistent	ja, Integration in das Wirtsgenom (nach Umschreiben in DNA mittels reverse Transkriptase)	8 kb
Lentiviren (auch Retroviren, häufig extra aufgezählt da sie auch nicht-teilende Zellen transduzieren)	RNA (einsträngig)	Persistent	ja, Integration in das Wirtsgenom (nach Umschreiben in DNA mittels reverse Transkriptase)	10 kb

[#] Maximale Größe der Nukleinsäure in Kilobasen (kb) welche in den Virus verpackt werden kann.

Pricing a Cure

The question for health systems: how much are one-time therapies worth?

■ Price in U.S. dollars



Zolgensma price is UBS assumption and hasn't been decided
Source: Bloomberg

Bloomberg

Abb. 6 – Gegenüberstellung der Kosten von Gentherapeutika auf dem US Markt nach Bloomberg (James Paton, 2019MESZ Updated on 2019MESZ). Das M steht für 10^6 .

Dass virale Vehikel derzeit die effektivsten Systeme in der Gentherapie sind, verdeutlicht ein Blick in die Tabelle der in Europa zugelassenen Gentherapeutika (**Tabelle 2**). Alle Zubereitungen beruhen auf viralen Vektoren. Dennoch gibt es einige Nachteile, welche mit viralen Transfervehikeln verbunden sind. Ein Problem stellt

die Bildung neutralisierender Antikörper als Immunantwort des Patienten dar, welche eine erneute Applikation desselben Vektors erschwert oder ausschließt. Gründe hierfür sind ein damit verbundener Wirkverlust oder Komplikationen durch die Reaktion des Immunsystems. Wegen ihres hohen immunologischen Potentials sind Adenoviren sehr anfällig für dieses Problem (Kay *et al.*, 2001). Das immunogene Potential einiger Viren, insbesondere der Adenoviren, kann auch zu überschießenden Immunreaktionen während der Behandlung führen (O'Connor und Crystal, 2006), was mit tödlichem Ausgang einhergehen kann (z.B. 1999, Tod von Jesse Gelsinger während klinischer Studie mit viralen Vektoren durch Organversagen aufgrund eines Zytokinschocks (Ferber, 2001)). Ein weiteres Problem, welches mit dem Einbau der Gensequenz in das Wirtsgenom in Verbindung steht, ist das onkogene Potenzial einiger Viren durch Insertions-Mutagenese. Diese Komplikation wurde in mehreren klinischen Studien in den frühen 2000er Jahren beobachtet, bei denen Retroviren zum Einsatz kamen (Sadelain, 2004; Marshall, 2002). Diesen Risiken viraler Vektoren stehen zusätzlich gesundheitsökonomische Aspekte gegenüber. Da virale Vektoren nur durch aufwendige biotechnologische Verfahren herstellbar sind, welche nach GMP und anderen Sicherheitsaspekten validiert werden müssen, sind die Herstellungskosten im Vergleich zu *small molecular drugs* sehr hoch. Zusätzlich spielen andere preispolitische Fragestellungen eine wichtige Rolle, wobei die Häufigkeit der Erkrankung und die Alternative einer Einmalbehandlung anstatt lebenslanger Medikation mit einfließen. Gentherapeutika zählen derzeit zu den teuersten Arzneimitteln (**Abb. 6**).

Nicht-virale Nukleinsäureträger bieten eine Alternative um die genannten Risiken viraler Systeme zu umgehen und den Herstellungsprozess kosteneffizienter zu gestalten. Dies würde auch eine breite Anwendung ermöglichen. Die physikalischen Systeme, welche auch zu den

nicht-viralen Methoden gehören, wurden bereits vorgestellt. Interessant sind weiterhin chemische (synthetische) Systeme. Dazu gehören anorganische Strukturen wie Kalziumphosphat-Nanopartikel, welche in der Lage sind Nukleinsäuren zu komplexieren und in die Zelle einzuschleusen (Maitra, 2005; Levingstone *et al.*, 2020). Die zwei größten Gruppen nicht-viraler Nukleinsäureträger bilden jedoch kationische Polymere und kationische Lipide.

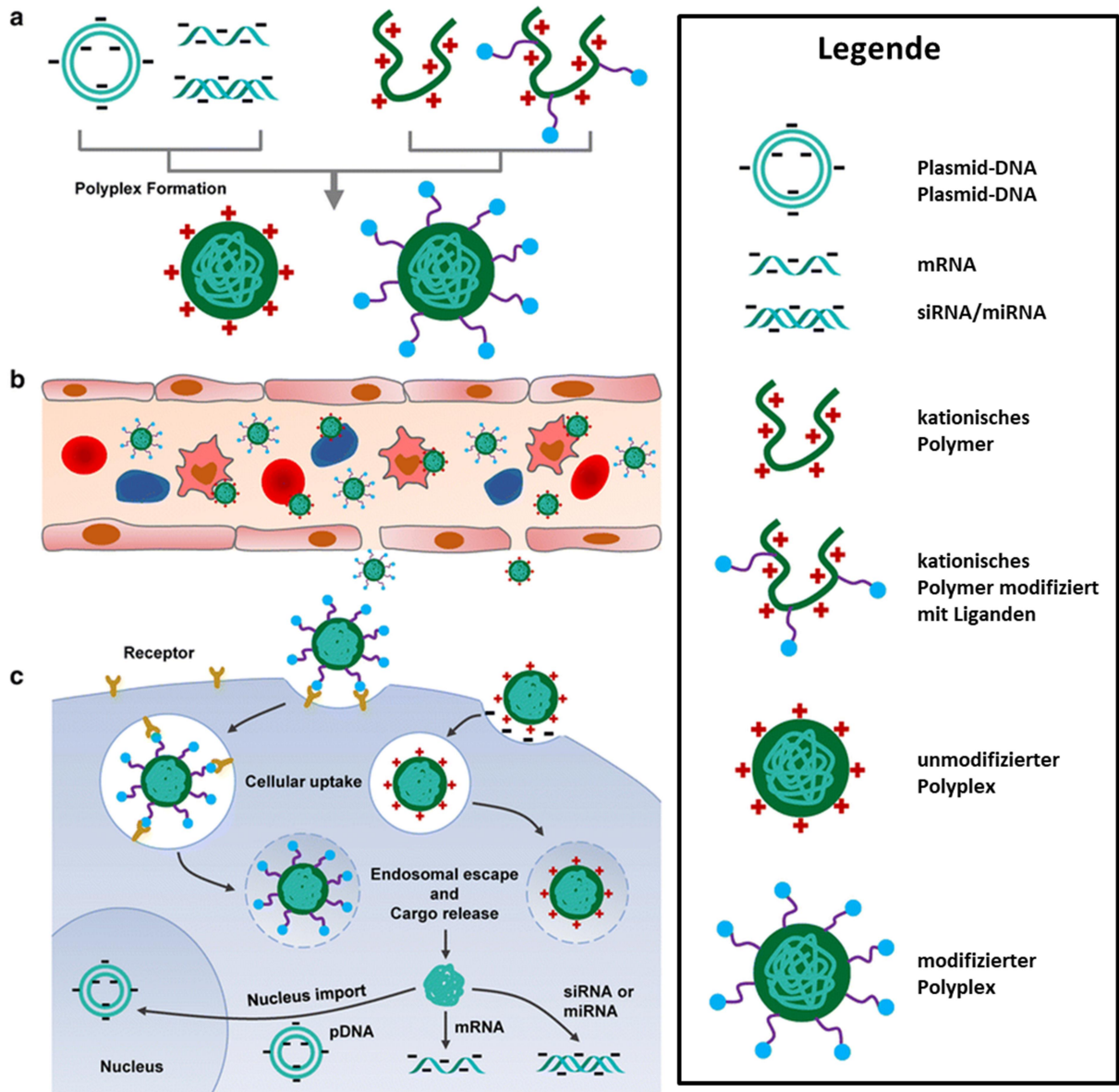


Abb. 7 – Schematische Darstellung der Polyfektion nach (Zhang and Wagner, 2017). Es sind die Hauptbarrieren der Polyfektion aufgelistet: a) eine effektive Komplexbildung zwischen Polymer und Nukleinsäure. B) Die Vermeidung einer schnellen Clearance aus dem Organismus nach intravasaler Gabe bevor das Zielgewebe erreicht wird. Eine der kritischsten Punkte dabei ist die Interaktion mit Blutkomponenten (hier schematisch dargestellt). Die Interaktion mit Immunzellen führt zur vorzeitigen Clearance. Die Interaktion mit Erythrozyten kann in Agglomerationsprozesse oder Hämolyse resultieren. Die Aktivierung von Thrombozyten kann zur Koagulation führen. C) Überwindung der zellulären Barrieren bevor der Wirkort (Zytoplasma oder Zellkern) erreicht wird.

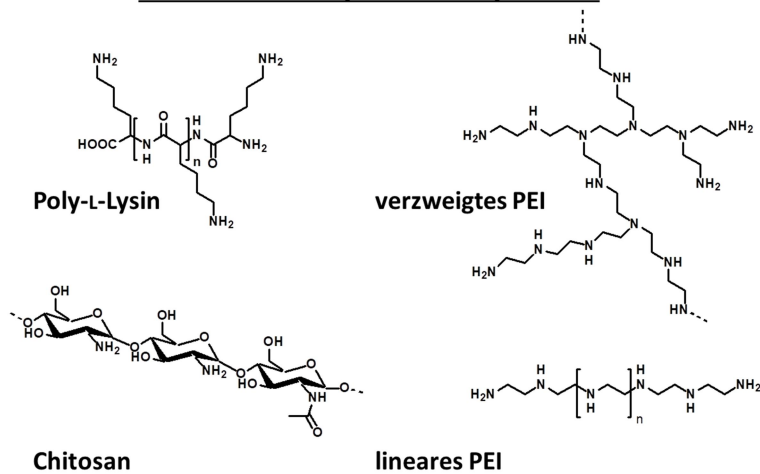
Kationische Polymere - Polyfektion

Abb. 8 – Repräsentative Vertreter von kationischen Polymeren für den Nukleinsäuretransfer. Die Polymere sind in ihrer ungeladenen Form dargestellt. Die kationischen Funktionen für die Nukleinsäurekomplexierung werden durch Protonierung der basischen Funktionen erhalten. Die Formel des Poly-L-Lysins gibt die genaue Stereochemie nicht wieder.

zu nennen (**Abb. 8**). Auch Chitosan, ein Amino-funktionalisiertes Polysaccharid, welches durch partielle Deacetylierung von Chitin gewonnen wird, ist ein immer häufiger verwendetes Polymer in der Polyfektion (Cao *et al.*, 2019). Die Eigenschaften der Polymere haben dabei einen großen Effekt auf die Effizienz. So spielt die Basizität der funktionellen Gruppe, welche die kationische Funktion bildet, eine große Rolle. Sie entscheidet einerseits, ob bei gegebenem pH-Wert die funktionelle Gruppe geladen ist und damit die Nukleinsäure komplexiert werden kann. Andererseits spielt der pK_s -Wert auch eine Rolle bei der intrazellulären Freisetzung der Nukleinsäure. So wird postuliert, dass durch den sogenannten „Protonenschwammeffekt“ der Polyplex aus dem Endosom freigesetzt werden kann, bevor der enzymatische Abbau im Lysosom beginnt (siehe Schema **Abb. 7**). Das Endosom ist ein subzelluläres Kompartiment, das nach der Reifung zum Lysosom für zelluläre Abbauprozesse verantwortlich ist. Der „Protonenschwammeffekt“ basiert auf der Protonierung funktioneller Gruppen des Polymers bei der intrazellulären Prozessierung des Endosoms, welche mit einem Absinken des pH-Wertes von 7,4 auf Werte unter 5 verbunden ist. Diese Protonierung ist mit einem Einstrom von Chloridionen verbunden. Aufgrund des damit verbundenen Anstiegs des osmotischen Drucks kommt es zur Ruptur des Endosoms. Betrachten wir die Formel von verzweigtem PEI, so sind primäre, sekundäre und tertiäre Aminofunktionen zu finden die einen pK_b Wert von 4,1-5,8 aufweisen (Harpe *et al.*, 2000). Somit sind bei pH 7 protonierte Gruppen für die Nukleinsäurekomplexierung vorhanden, die Polyplexe besitzen jedoch auch eine effektive Pufferkapazität im endosomalen pH-Milieu. An dieser Stelle soll das Thema

Kationische Polymere, als positiv geladene Polyelektrolyte, komplexieren Nukleinsäuren durch elektrostatische Interaktionen mit dem Phosphodiesterückgrat (Zhang und Wagner, 2017). Die dabei entstehenden Nukleinsäure/Polymer-Komplexe werden auch als Polyplexe bezeichnet (**Abb. 7**). Der Prozess der Transfektion mit Polyplexen wird auch Polyfektion genannt. Als bekannteste Vertreter sind Poly-L-Lysin, ein synthetisches Peptid, und Polyethylenimin (PEI)

Polyfektion jedoch nicht weiter vertieft werden. Für detailliertere Informationen wird hier auf eine Reihe weiterführender Übersichtsartikel verwiesen (Jeong *et al.*, 2007; Merdan *et al.*, 2002; Pack *et al.*, 2005; Hosseinkhani *et al.*, 2015; Zhang und Wagner, 2017).

Eine weitere Gruppe synthetischer Transfektionsagenzien sind Systeme, welche auf kationischen Lipiden basieren. Der Prozess des Gentransfers mit kationischen Lipiden wird als Lipofektion bezeichnet. Schaut man auf die statistische Verteilung der verwendeten DNA-Transfersysteme, so sind kationische Lipide die am häufigsten angewendeten synthetischen Nukleinsäureträgersysteme. (**Abb. 9**). Es soll auch hier nicht unerwähnt bleiben, dass der auf mRNA basierende Impfstoff BNT162b1 (Handelsname: Comirnaty[®]) gegen SARS-CoV-2 auf einer Lipidformulierung beruht (Mulligan *et al.*, 2020). Da der Fokus der vorliegenden Habilitationsschrift auf kationischen Lipiden liegt, wird dieses Thema hier noch einmal genauere Betrachtung finden.

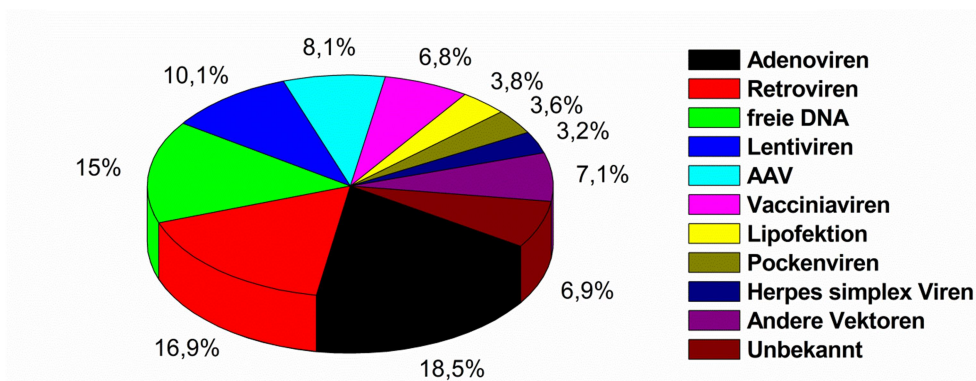


Abb. 9 – Anteil verschiedener Nukleinsäuretransfersysteme in den angemeldeten klinischen Studien zur Gentherapie nach <http://www.abedia.com/wiley> (Stand Dezember 2019)

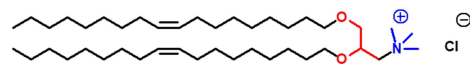
Das erste kationische Lipid, welches speziell für die Anwendung als DNA-Carrier entwickelt wurde, ist von FELGNER *et al.* 1987 unter der Abkürzung *DOTMA* beschrieben (**Abb. 10**) (Felgner *et al.*, 1987), wobei auch der Begriff Lipofektion geprägt wurde. Daraufhin wurden weiterer Vertreter wie *DC-Chol* (1991) (Gao und Huang, 1991) und *DOSPA* entwickelt (**Abb. 10**). Letzteres ist Hauptbestandteil der kommerziell erhältlichen Lipofectamine[®] Produkte (Vertrieb durch ThermoFischer), einer Reihe von „Goldstandards“, mit dem neu entwickelte Lipidformulierungen verglichen werden. In den letzten drei Dekaden wurden zahlreiche kationische Lipide entwickelt um die Effizienz des Nukleinsäuretransfers zu steigern und die toxischen Eigenschaften zu reduzieren (Felgner *et al.*, 1994; Miller, 1998; Bhattacharya und Bajaj, 2009; Chesnoy und Huang, 2000; Lv *et al.*, 2006; Dan Niculescu-Duvaz und James Heyes und Caroline J. Springer, 2003; Srinivas *et al.*, 2009). Der generelle Aufbau der amphiphilen Moleküle für die Lipofektion ist in **Abb. 10** schematisch dargestellt.

Die positive Ladung im kationischen Kopf kann dabei durch permanente Ionen, wie quartäre Ammoniumionen, aber auch durch basische Gruppen, wie Amine, Amidine oder Guanidine, gebildet werden. Letztere weisen hinsichtlich der kationischen Ladung eine Abhängigkeit vom pH-Wert auf. Deshalb wird letztere Gruppe auch als ionisierbare kationische Lipide bezeichnet (Semple *et al.*, 2010). Des Weiteren können kationische Lipide in monovalente Vertreter, d.h. Lipide mit einer kationischen/basischen Funktion wie *DOTMA*, oder polyvalente Vertreter, mit mehreren kationischen/basischen Funktionen wie *DOSPA*, unterteilt werden (**Abb. 10**).

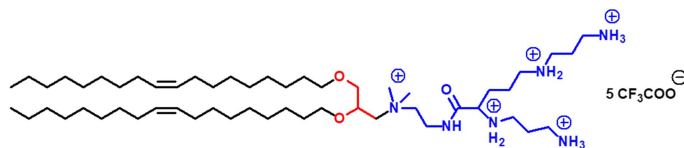
kationische Lipide - Lipofektion



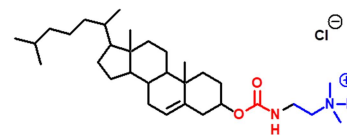
allgemeiner Aufbau



DOTMA

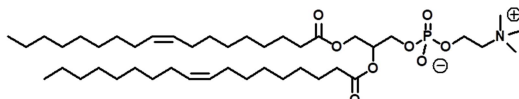


DOSPA

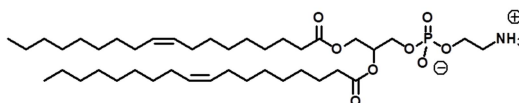


DC-Chol

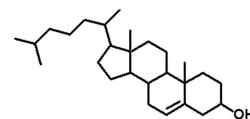
neutrale oder zwitterionische Co-Lipide



DOPC



DOPE

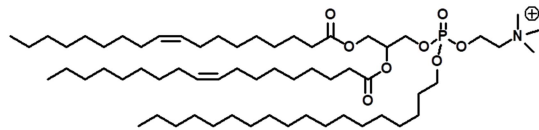


Cholesterol

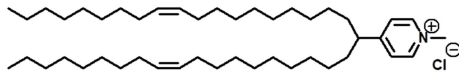
Abb. 10 – Darstellung des allgemeinen strukturellen Aufbaus von kationischen Lipiden für den Nukleinsäuretransfer. Diese Struktur wurde auf 3 klassische Vertreter (*DOTMA*, *DOSPA*, und *DC-Chol*) übertragen. Weiterhin sind typische Vertreter der Co-Lipide für die Lipidformulierungen gezeigt.

Von einigen Vertretern kationischer Lipide wurden ganze Substanzbibliotheken erstellt, um detaillierte Untersuchungen bezüglich der Effekte der Molekülstruktur auf das physikochemische Verhalten und die Nukleinsäuretransfereffizienz durchzuführen. Eine dieser Lipidklassen sind kationische Phospholipide, welche aus Phosphatidylcholinen durch Veresterung der freien Phosphorsäurefunktion mit primären Alkoholen gebildet werden (Bsp. *diC18:-C18PC*, **Abb. 11**) (Koynova und Tenchov, 2010; Koynova und Tenchov, 2009; Koynova und MacDonald, 2005; Tenchov *et al.*, 2008). Als Abkömmlinge von natürlichen

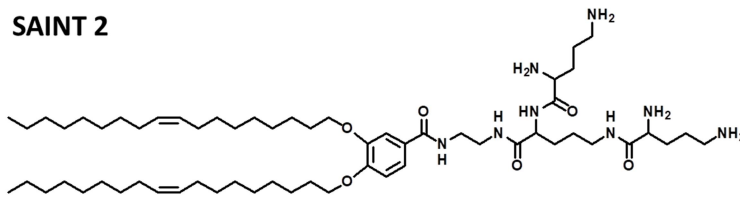
kationische Lipide – weitere Vertreter



diC18:1-C18PC



SAINT 2



MVLG2

Abb. 11 – Repräsentative Vertreter kationischer Lipide, welche Teil groß angelegter Struktur/Wirkungs-Untersuchungen sind. Stereochemische Aspekte wurden in dieser Abbildung vernachlässigt.

Phospholipiden besitzen diese ein Glycerol-Rückgrat. Des Weiteren handelt es sich um monovalente Lipide mit permanenter Ladung. Es wurden zahlreiche Derivate durch Variation der Alkylkettenkombination synthetisiert und das Assoziationsverhalten in Gegenwart und Abwesenheit von DNA untersucht. Die Ergebnisse wurden mit der Transfektionseffizienz verknüpft. Die Arbeiten zeigen somit den Einfluss des Alkyl-

kettenmusters auf die Transfektionseffizienz. Eine wichtige Kernaussage dieser Arbeiten ist der Einfluss der Mesophasen, welche nach Mischen der kationischen Lipide mit Modellmembranen für die Endosomen entstehen, auf die Transfektionseffizienz. Sind diese Mesophasen hexagonaler oder kubischer Struktur ist mit einer höheren Transfektionseffizienz zu rechnen. Begründet werden kann dies mit der Entstehung von Strukturen, welche zur Fusion mit Membranen neigen. Entstehen diese Strukturen im Endosom der Zelle, eröffnet dies die Möglichkeit in das Cytoplasma zu gelangen. Damit untermauern diese Arbeiten eine These für den Mechanismus der zellulären Aufnahme von Lipoplexen, welcher auf der Fusion artifizieller Lipidstrukturen mit den natürlichen Membranen beruht und bereits 1996 von SZOKA und Mitarbeitern postuliert wurde (Xu und Szoka, 1996; Zelphati und Szoka, 1996).

Eine weitere intensiv untersuchte Klasse ist die Gruppe der *SAINT*-Lipide (Synthetic Amphiphile INTeraction) (van der Woude *et al.*, 1997; Zuhorn *et al.*, 2002b; Zuhorn *et al.*, 2002a). Ein Vertreter dieser Lipidklasse ist *SAINT-2* (**Abb. 11**). Die Besonderheit ist das Lipidrückgrat, welches aus Pyridin gebildet wird. Durch die Methylierung bildet das Pyridiniumion gleichzeitig den Kopfbereich der Lipide. Auch diese Vertreter sind monovalent und haben eine permanente Ladung. Die Struktur/Effektivitäts-Beziehungen wurden auch hier für Vertreter mit variablen Alkylkettenmustern ermittelt.

Eine Gruppe von polyvalenten Lipiden bestehend aus zwei Oleylketten, einem 3,4-Dihydroxybenzamid-Rückgrat und einer auf Ornithin basierenden Kopfgruppe mit variabler

Anzahl an primären Aminofunktionen wurde auch detailliert charakterisiert (Bsp. *MVLG2*, **Abb. 11**). Diese Vertreter wurden intensiv auf das DNA-Komplexierungsverhalten und die Effizienz untersucht (Zidovska *et al.*, 2009a; Ahmad *et al.*, 2005; Ewert *et al.*, 2002; Zidovska *et al.*, 2009b). In den aufgeführten Arbeiten wurde die Ladungsdichte der Lipidmischung als ein Schlüsselparameter für die erfolgreiche Transfektion identifiziert. Dieser Parameter kann über die Art der verwendeten kationischen Lipide (Anzahl der kationischen Funktionen im Kopfgruppenbereich), aber auch über das Mischungsverhältnis von kationischen Lipiden mit neutralen/zwitterionischen Co-Lipiden eingestellt werden. Typische Vertreter von Co-Lipiden sind in **Abb. 10** dargestellt.

Die genannten Untersuchungen verdeutlichen auch die Komplexität der Lipofektion. Der Prozess wird durch ein Zusammenspiel von lipophilen Molekülteilen und Kopfgruppenstruktur der kationischen Lipide, sowie durch das Mischungsverhalten derer mit Co-Lipiden beeinflusst. So bestimmen die strukturellen Parameter der Lipid-Assoziat das Komplexierungsverhalten mit Nukleinsäuren. Da ein Großteil der kationischen Lipidformulierungen als Liposomen formuliert werden, kommt es häufig vor, dass Lipoplexe fälschlicherweise als DNA oder RNA gefüllte Liposomen postuliert werden. Strukturuntersuchungen mit Röntgenbeugung und Elektronenmikroskopie zeigten jedoch in den meisten Fällen komplexe Molekül-Assoziat. In diesen sind die Nukleinsäuren in die Struktur von Lipidmesophasen eingebaut. Eine Vielzahl solcher DNA/Lipid-Mesophasen sind als Lipoplexstruktur beschrieben (Rädler *et al.*, 1997; Koltover *et al.*, 1998; Ewert *et al.*, 2010; Ewert *et al.*, 2006; Leal *et al.*, 2011). Die häufigsten Vertreter sind in **Abb. 12** abgebildet.

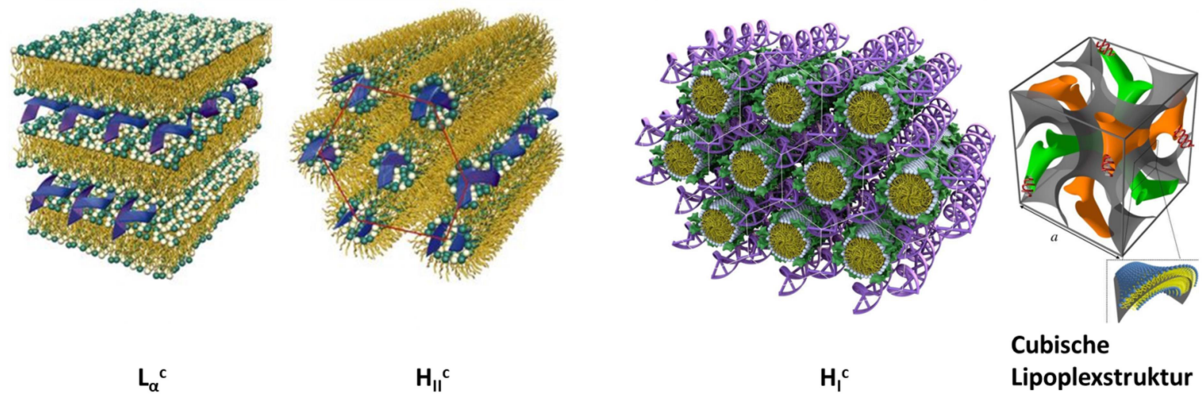


Abb. 12 – Darstellung verbreiteter Lipoplexstrukturen nach (Majzoub *et al.*, 2016). Es wurde die anerkannte Nomenklatur für Lipoplexmesophasen verwendet: lamellare Lipoplexe (L_{α}^c), invers-hexagonale Lipoplexe (H_{II}^c) und hexagonale Lipoplexe (H_I^c). Die Nomenklatur orientiert sich an der Nomenklatur der klassischen Lipidmesophasen. Das hochgestellte c resultiert aus dem Wort „Komplex“ (engl.: *complex*) und weist darauf hin, dass die Mesophase ein Lipid/Nukleinsäure-Komplex ist. Für die seltener beschriebenen kubischen Lipoplexstrukturen hat sich bisher keine einheitliche Nomenklatur etabliert.

Dennoch erreichen Lipoplexe momentan nicht die Effizienz viraler Systeme. Die hohe Beladungskapazität mit Nukleinsäuren und die im Vergleich zum Virus einfache Herstellung eröffnen aber die Möglichkeiten einer breiten Anwendung der Gentherapie. Daher ist die Entwicklung effizienterer Lipidsysteme für die Gentherapie essenziell. Eine vielversprechende Klasse ist die der kationischen Lipide auf Malonamid-Basis. Die vorliegende Arbeit hat ihren Fokus auf diese Lipidklasse gelegt.

6 Kationische Lipide auf Malonamid-Basis – Einbettung der Arbeiten im Rahmen der Habilitation in die Historie dieser Lipidklasse

Die synthetischen Arbeiten von PROF. BODO DOBNER am Institut für Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg brachten eine Vielzahl artifizieller Lipide hervor. An dieser Stelle soll auf seine Pionierarbeit auf dem Gebiet der Synthese von symmetrischen und asymmetrischen Bolaamphiphilen mit Alkyldiolen als Grundbaustein hingewiesen werden (Heiser und Dobner, 1996; Köhler *et al.*, 2004b; Köhler *et al.*, 2004a). Er entwickelte weiterhin Synthesestrategien für die Darstellung kationischer Lipide für den Gentransfer. Ein zentraler Baustein war die Malonsäure, wobei drei Klassen von kationischen Lipiden entwickelt wurden (**Abb. 13**). Die Klasse der Gemini-Lipide ist nicht direkt als Malonsäureabkömmling zu identifizieren, da hier eine Carboxylgruppe der 1,3-Dicarbonsäurestruktur durch Decarboxylierung abgespalten wurde. Dasselbe gilt für die α -verzweigten Fettsäuren, welche auch „versteckte“ Malonsäure-Derivate darstellen. Die Geminilipide wurden in drei Dissertationsschriften bearbeitet (Erdmann, 2013; Folz, 2013; Schulze, 2006), aber trotz des Potenzials nie in der Fachliteratur veröffentlicht. Die α -verzweigten Fettsäuren wurden bereits in vorangegangenen Arbeiten publiziert (Antipina *et al.*, 2009) und fanden darüber hinaus im Rahmen des vorliegenden Habilitationsprojekts Anwendung. Der Hauptteil der Habilitationsarbeit wurde mit der dritten Klasse, den Malonamiden, durchgeführt.

Malonamide werden in drei Generationen eingeteilt (**Abb. 13**), in denen die Malonsäurestruktur deutlich zu erkennen ist. Die erste Generation besitzt die Malonsäure als Rückgrat der Lipide. Bei der zweiten Generation ist diese Rückgratstruktur um einen Lysin-Baustein erweitert. Aufgrund dieses komplexen Rückgrats, welches durch zahlreiche Amidbindungen geprägt ist, werden diese Lipide auch als Peptid-mimetische Lipide bezeichnet. Bei der dritten Generation wurde eine weitere Alkylkette eingefügt. Die Untersuchung von Malonamiden der zweiten und dritten Generation nimmt den größten Teil der Arbeit ein.

kationische Lipide auf Malonsäure-Basis

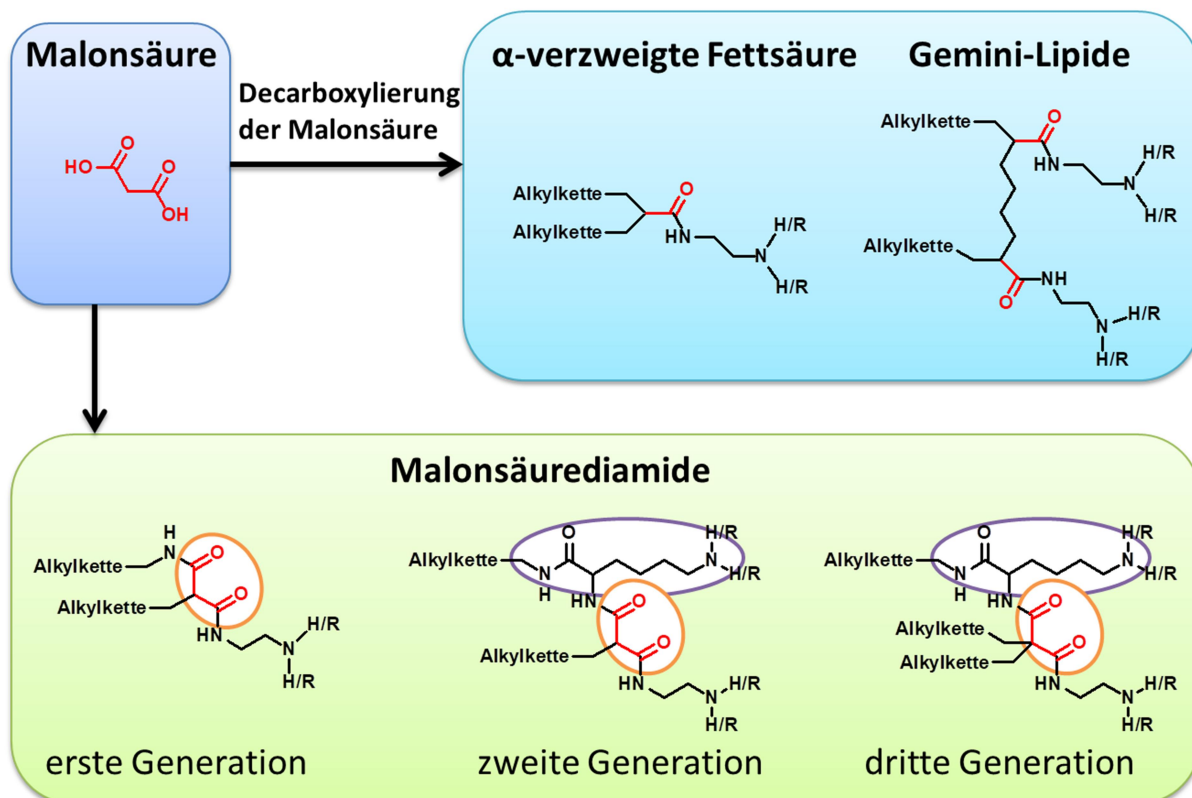


Abb. 13 – Allgemeine Darstellung kationischer Lipide deren Synthese auf Malonsäure-Basis beruht. Der Malonsäurebaustein ist rot markiert. Die α -verzweigten Fettsäuren und die Gemini-Lipide sind Derivate der Malonsäure, welche durch Decarboxylierung um ein C-Atom verkürzt sind. Malonsäurediamide haben ein Rückgrat, welches aus Malonsäure (erste Generation) oder aus einem Malonsäure-Lysin-Konstrukt (zweite und dritte Generation) gebildet wird. In diesen Strukturen ist die Malonsäure orange und das Lysin lila umrahmt. Die dritte Generation der Malonsäurediamide ist durch drei Alkylketten charakterisiert.

Die Synthese von Malonamiden stellte bereits das Thema meiner Diplom- und Dissertationsarbeit dar (Wölk, 2010; Wölk, 2014). Der Schwerpunkt in der Habilitationsphase wurde auf die physikochemische Charakterisierung der Lipide und ihrer Komplexe mit Nucleinsäuren sowie auf die Untersuchung der biologischen Aktivität gelegt. Die Ergebnisse werden im Verlauf dieser Habilitationsschrift präsentiert. Um dem Leser eine Einordnung in die Entwicklung der verschiedenen Malonsäure-basierten kationischen Lipide (ohne Berücksichtigung der Gemini-Lipide) zu geben, soll auf den folgenden Übersichtsartikel verwiesen werden (**Artikel 1**).

*Details sind in **Artikel 1** (Anhang 1) nachzulesen!*

7 Ergebnisse im Rahmen der Habilitationstätigkeit

7.1 Untersuchung der Nukleinsäurekomplexierung verschiedener Lipidformulierungen unter Berücksichtigung der Strukturaufklärung

7.1.1 Allgemeine Erläuterungen

In diesem Tätigkeitsblock wurden Lipidformulierungen und ihre Nukleinsäurekomplexe mit Methoden aus der Biophysik untersucht, welche auf 2D- und 3D-Systemen beruhen. Der Fokus der zu komplexierenden Nukleinsäure lag dabei auf DNA. Bei den 3D-Methoden handelt es sich um Volumensysteme, in denen die Lipidformulierungen oder Lipoplexe im wässrigen Milieu dispergiert sind. Eine intensiv genutzte Methode war dabei die Röntgenbeugung im Klein- und Weitwinkelbereich (*small angle x-ray scattering* – SAXS; *wide angle x-ray scattering* – WAXS, siehe Schema **Abb. 14**). Röntgenbeugungsexperimente bieten die Möglichkeit, Strukturen von Lipoplexen im nano-skalierten Bereich aufzuklären und Aussagen über die Mesophase der Lipid/DNA-Komplexe sowie der reinen Lipidformulierung zu treffen. Die Möglichkeiten dieser Technik zeigen die Pionierarbeiten von JOACHIM RÄDLER und ILYA KOLTOVER in der Gruppe von CYRUS R. SAFINYA (Rädler *et al.*, 1997; Koltover *et al.*, 1998). Als ergänzende Methoden im Volumensystem fanden schwingungsspektroskopische Methoden (Infrarotspektroskopie und Ramanspektroskopie) und *Difference Scanning Calorimetry* (DSC) Anwendung, um das Verständnis der Komplexbildung zwischen der kationischen Lipidformulierung und der DNA zu vertiefen. Dadurch wurde ein Einblick in das thermotrope Verhalten der Lipidformulierungen gewonnen.

Prinzip der Röntgenbeugung

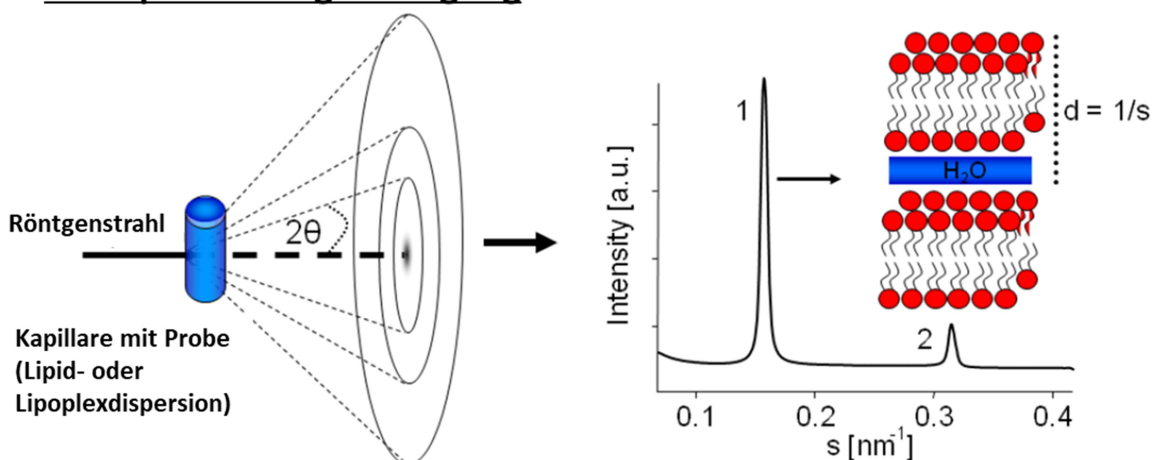


Abb. 14 – Schematische Darstellung eines SAXS Experiments inklusive exemplarisches Beugungsmuster und die dazugehörige lamellare Mesophase (L_α).

Eine weitere Möglichkeit die Wechselwirkungen in Lipidformulierungen sowie zwischen Lipiden und Nukleinsäuren zu verstehen, bilden 2D-Systeme, wobei im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen an der Luft/Wasser-Grenzfläche herangezogen wurden. Amphiphile Moleküle, wie Lipide, ordnen sich an dieser Grenzfläche an und stehen für Strukturaufklärungsuntersuchungen zur Verfügung (siehe Übersicht **Abb. 15**). Pionierarbeiten auf dem Gebiet von Amphiphilen an der Luft/Wasser-Grenzfläche lieferten AGNES LUISE WILHELMINE POCKELS (Rayleigh, 1891) und später IRVING LANGMUIR (Langmuir, 1917). Letzterer erhielt für seine Arbeiten an der Luft/Wasser-Grenzfläche den Nobelpreis für Chemie 1932. Filme aus Amphiphilen, welche nach deren Spreiten an der Luft/Wasser-Grenzfläche entstehen, werden auch als LANGMUIR-Monoschichten (LANGMUIR-*monolayer*) bezeichnet. Diese Monoschichten werden von Molekülen in der wässrigen Subphase beeinflusst, was sie zu einem interessanten Modell für Interaktionsstudien macht. Eine Kombination verschiedener optischer Methoden der Strukturaufklärung, wie verschiedene Röntgenbeugungsmethoden, Röntgenfluoreszenz und schwingungsspektroskopische Methoden, ermöglicht es konkrete Aussagen über die Struktur der Monoschicht zu treffen (Blume und Kerth, 2013; Stefaniu *et al.*, 2014; Stefaniu und Brezesinski, 2014b). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen Polynukleotiden und Lipidformulierungen, welche als LANGMUIR-Monoschichten präpariert wurden, auf diese Weise untersucht.

Lipidmonolayer als Modellsysteme für Interaktionsstudien

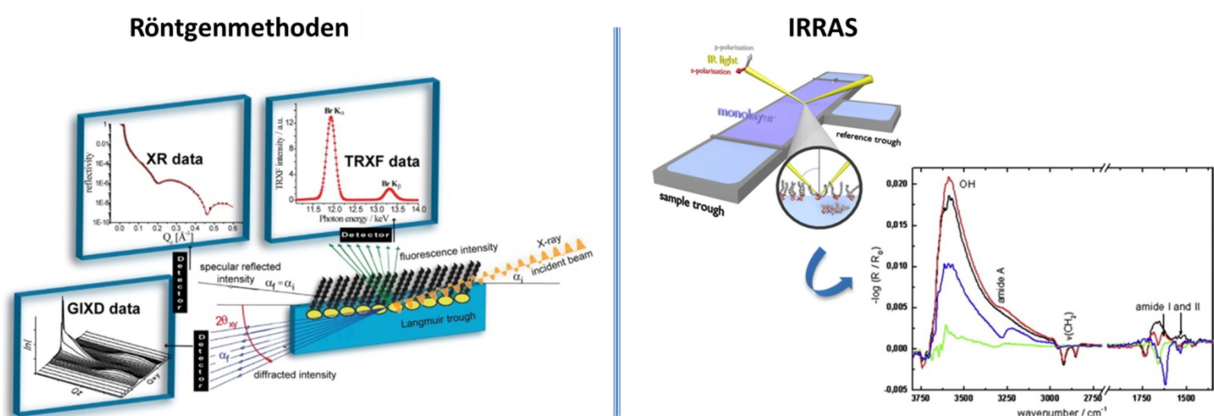


Abb. 15 – Schematische Darstellung verschiedener Charakterisierungsmethoden an der LANGMUIR-Monoschicht nach (Stefaniu und Brezesinski, 2014b) und (Blume und Kerth, 2013). Bei den Röntgenmethoden handelt es sich um die Röntgenbeugung unter streifendem Einfall des Röntgenstrahls (GIXD), Röntgen-Reflektivität (XR) und zeitaufgelöste Röntgenfluoreszenz (TRXF). Bei der Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS) wird ein IR-Spektrum von der Monoschicht aufgenommen und mit dem Spektrum der reinen Subphase korrigiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Kombination aus verschiedenen Methoden am 2D-System genutzt, um den Lipid-DNA-Interaktionsprozess besser zu verstehen. Die Schwerpunkte der Untersuchungen lagen auf folgende Methoden:

- Aufnahme von *Druck-Flächen-Isothermen* um zu ermitteln, welchen Einfluss die Interaktion der DNA auf die durchschnittliche Molekülfläche der kationischen Lipidformulierung hat, wodurch erste Indizien für eine strukturelle Änderung der LANGMUIR-Monoschicht gewonnen werden können.
- Durchführung von *Grazing-incidence X-ray diffraction* (GIXD) Messungen, welche Strukturinformationen für das Alkylkettengitter der Lipidformulierung liefern (Stefaniu und Brezesinski, 2014a). Dies ermöglicht das Erkennen von Entmischungsprozessen und Änderungen der Packungsparameter, welche durch die Komplexbildung zwischen Lipid und Nukleinsäure induziert werden. Zusätzlich können übergeordnete Strukturen wie Kopfgruppengitter der Lipide oder Nukleinsäuregitter identifiziert werden (Stefaniu *et al.*, 2019; Symietz *et al.*, 2004).
- Unter Verwendung von *Infrared reflection absorption spektoscopy* (IRRAS) kann die gebundene Menge an Nukleinsäure quantifiziert werden (Gromelski und Brezesinski, 2006). Weiterhin können Aussagen über den Einfluss der DNA-Komplexbildung auf die Struktur der Lipidmonoschicht getroffen werden.
- Die *Time resolved X-ray fluorescence* (TRXF) ist eine elegante Methode, um Elemente nach ihrer Art und Menge zu bestimmen. Somit kann sie genutzt werden, um verschiedene Ionen in der Elektrochemischen Doppelschicht am geladenen LANGMUIR-Film zu quantifizieren (Brezesinski und Schneck, 2019). Im Rahmen der Arbeit wurde die Methode zur Bestimmung der Ladung verschiedener Lipide, und somit des Protonierungsgrads, verwendet.

Weitere 2D- und 3D-Methoden zur Charakterisierung der Lipoplexbildung wurden sporadisch verwendet (z.B. Röntgenreflektivität an der Monoschicht oder Quarz-Mikro-Waage) und sollen hier nicht weiter besprochen werden.

Neben der reinen Strukturaufklärung von Lipidformulierungen und deren Komplexe mit Nukleinsäuren sollten diese Daten auch genutzt werden, um verschiedene physikochemische Parameter mit der biologischen Aktivität der Lipoplexe zu korrelieren. Aus diesem Grund finden sich in den nachfolgenden Arbeiten neben den physikochemischen Charakteri-

sierungen häufig auch Ergebnisse von *In-vitro*-Untersuchungen hinsichtlich Transfektionseffizienz und Toxizität am Zellkulturmodell.

7.1.2 Strukturuntersuchungen an Malonsäurediamiden der ersten Generation

Diese Arbeiten, welche in **Artikel 2** veröffentlicht wurden, erweitern die Erkenntnisse einer Gruppe von strukturanalogen Malonsäurediamiden der ersten Generation mit Lysinbausteinen im Kopfgruppenbereich. Die untersuchte Lipidreihe weist zielgerichtete Veränderungen im Alkylkettenmuster und im Kopfgruppenbereich auf und wurde in vorangegangenen Arbeiten bereits hinsichtlich der Transfektionseffizienz untersucht, wobei zwei Lipidformulierungen als vielversprechende Kandidaten für weitere Entwicklungsschritte hervortraten: *lipid 3/DOPE 1/3* (n/n) und *lipid 6/DOPE 2/1* (n/n) (Strukturen der kationischen Lipide sind in **Abb. 16** abgebildet) (Wölk *et al.*, 2011). **Artikel 2** zeigt nun detaillierte Strukturuntersuchungen der Lipidreihe basierend auf SAXS/WAXS Experimenten in Kombination mit DSC. Ein Schwerpunkt wurde dabei auf die zuvor genannten erfolgsversprechenden Lipidformulierungen gelegt. Komplexe Strukturübergänge von kubischen zu lamellaren Strukturen und umgekehrt konnten nachgewiesen werden. Zusammenfassend zeigen die Daten in Kombination mit der vorangegangenen Veröffentlichung (Wölk *et al.*, 2011), dass für die untersuchte Substanzklasse rigide Alkylkettensysteme von Nachteil für eine erfolgreiche Transfektion sind. Detaillierte Ergebnisse sind in **Artikel 2** nachzulesen.

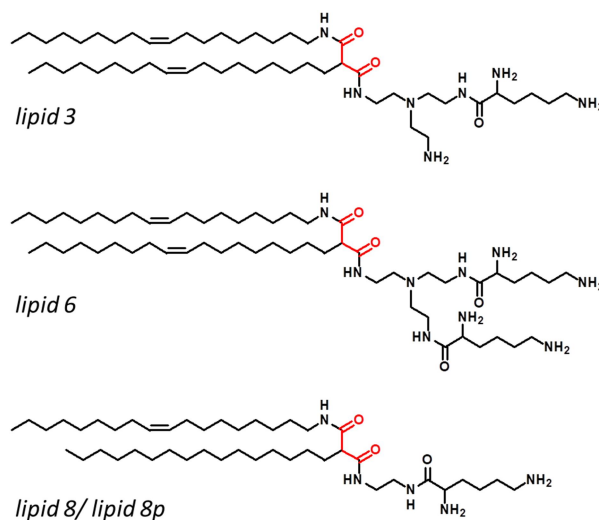


Abb. 16 – Vertreter der Malonsäurediamide der 1. Generation, welche in diesem Abschnitt behandelt werden.

Unter einem besonderen Aspekt wurde das *lipid 8* (**Abb. 16**), ein weiterer Vertreter der Malonsäurediamide der ersten Generation, in 2D- und 3D-Systemen charakterisiert. Vorangegangene Arbeiten zeigten, dass dieses Lipid in Mischung mit Cholesterol sehr effektiv im Zellkultursystem transfiziert (Heinze *et al.*, 2010; Dittrich *et al.*, 2011b). Jedoch musste bei der Betrachtung der Ergebnisse Folgendes beachtet werden: Das kationische Lipid wurde unter Verwendung von Oleylamin technischer Reinheit hergestellt, wodurch das Transfektionslipid realistisch betrachtet neben der Verbindung *lipid 8* zu 25% auch Lipidkomponenten mit analoger Kopfgruppe aber abweichenden Alkylkettenmuster enthält. Diese Verunreinigungen weisen vorrangig gesättigte Alkylketten auf.

gestellt, wodurch das Transfektionslipid realistisch betrachtet neben der Verbindung *lipid 8* zu 25% auch Lipidkomponenten mit analoger Kopfgruppe aber abweichenden Alkylkettenmuster enthält. Diese Verunreinigungen weisen vorrangig gesättigte Alkylketten auf.

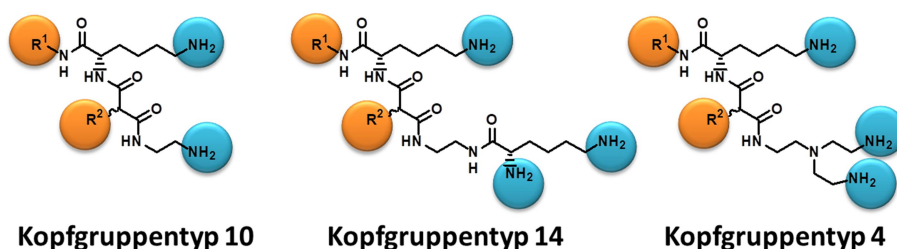
Physikochemische Untersuchungen von *lipid 8* in 3D- (Dittrich *et al.*, 2011b) und 2D-Modellsystemen (Dittrich *et al.*, 2011a) zeigen deutlich Einflüsse dieser gesättigten Lipidverunreinigungen. Aus diesem Grund sollte der Frage nachgegangen werden, ob diese Verunreinigungen einen Effekt auf die Transfektionseffizienz haben, da andere Beobachtungen zeigten, dass gesättigte Lipide vom Nachteil für die Transfektion sind (z.B. Ergebnisse aus **Artikel 2**). Zur Klärung der Fragestellung wurde ein „Alkylketten-reines“ Analogon von *lipid 8*, das *lipid 8p*, synthetisiert und in vergleichenden Untersuchungen in Volumensystemen und am Monoschichtmodell untersucht. Die Ergebnisse sind in **Artikel 3** veröffentlicht. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Verunreinigungen im Anteil von $\approx 25\%$ in physikochemischen Untersuchungen Effekte zeigten (z.B. Entmischungstendenzen, Veränderung des Phasenübergangsverhaltens in der DSC und in den LANGMUIR-Isothermen) aber keinen signifikanten Einfluss auf die DNA-Bindungskapazität der Lipidformulierung hatten. Das Transfektionsverhalten am Zellkulturmodell war vergleichbar. Detaillierte Ergebnisse sind in **Artikel 3** nachzulesen.

Details sind in Artikel 2 (Anhang 2) und Artikel 3 (Anhang 3) nachzulesen!

7.1.3 Strukturuntersuchungen an Malonsäurediamiden der zweiten Generation

Von den Malonsäurediamiden der zweiten Generation stand zu Beginn der Arbeiten eine große Substanzbibliothek mit zielgerichteten Variationen im Kopfgruppenbereich und im Alkylkettenmuster zur Verfügung (Wölk, 2014; Wölk *et al.*, 2013), welche in **Abb. 17** dargestellt ist. Jedoch war die biologische und physikochemische Charakterisierung zu diesem Zeitpunkt nur sporadisch durchgeführt worden.

Malonsäurediamide der 2. Generation – Substanzbibliothek



Alkylkettenmuster: **TT** (tetradecyl, tetradecyl) → $R^1 = C_{14}H_{29}$, $R^2 = C_{14}H_{29}$
TH (tetradecyl, hexadecyl) → $R^1 = C_{14}H_{29}$, $R^2 = C_{16}H_{33}$
OT (oleyl, tetradecyl) → $R^1 = C_{18}H_{35} \Delta 9\text{-cis}$, $R^2 = C_{14}H_{29}$
OH (oleyl, hexadecyl) → $R^1 = C_{18}H_{35} \Delta 9\text{-cis}$, $R^2 = C_{16}H_{33}$
OO (oleyl, oleyl) → $R^1 = C_{18}H_{35} \Delta 9\text{-cis}$, $R^2 = C_{18}H_{35} \Delta 9\text{-cis}$

Abb. 17 – Substanzbibliothek von Malonsäurediamiden der zweiten Generation mit systematischen Modifikationen der Alkylkettenmuster und der hydrophilen Kopfgruppenstruktur. Die primären Aminofunktionen sind blau hervorgehoben, wobei sich die Kopfgruppentypen 14 und 4 nicht in der Anzahl, sondern in der chemischen Umgebung und räumlichen Anordnung der Aminofunktionen unterscheiden. Die variablen Alkylketten sind orange gekennzeichnet.

Eine ungeklärte Fragestellung richtete sich an die Aufklärung des pH-abhängigen Protonierungsverhaltens der Lipide. Dieses beeinflusst den Ladungszustand der Verbindungen und damit das Komplexierungsverhalten von Nukleinsäuren. In **Artikel 4** wurde sich dieser wissenschaftlichen Fragestellung angenommen. Die Methode der Wahl war TRXF an der Lipidmonoschicht. Die Auswahl geeigneter Ionentypen in der Subphase (Cs^+ und Br^-) und die Verwendung des kationischen Tensides *DODAB* (Dioctadecyldimethylamoniumbromid) als pH-Wert-unabhängigen Ladungsstandard erlaubten es den Protonierungsgrad der Malonsäurediamide zu bestimmen. Da für die Untersuchungen genehmigte Messzeiten an Synchrotronquellen notwendig waren, konnten nicht alle Substanzen aus der Lipidbibliothek vermessen werden. Es wurde mit den Lipiden *TH10*, *OO10*, *TH14*, *OH14*, *OO14*, *TH4*, *OH4* und *OO4* eine Gruppe an Verbindungen mit systematischen Strukturveränderungen ausgewählt. Die Arbeit konnte beweisen, dass der Protonierungsgrad nicht nur von der Kopfgruppenstruktur, sondern auch maßgeblich vom Alkylkettenmuster beeinflusst wurde. Lipide mit einer Hexadecylkette im lipophilen Molekülteil wiesen bei gleicher Kopfgruppe einen geringeren Protonierungsgrad auf als die Analoga mit zwei Oleylketten. Packungsdichten schienen dabei

den apparenten pK_s -Wert der Lipide maßgeblich mit zu beeinflussen. Diese Beobachtungen lieferten eine Erklärung für den Fakt, dass gesättigte Lipide mit rigiden Alkylketten die weniger Effizienten Transfektionslipide sind. Dennoch gilt es darauf hinzuweisen, dass neben dem Protonierungsgrad andere Faktoren die Transfektionseffizienz von Lipidformulierungen beeinflussen, was im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit zum Ausdruck kommen wird.

In einer weiteren Reihe von Experimenten wurden die Lipide vom Kopfgruppentyp 10 (**Abb. 17**) systematisch in 2D- und 3D-Modellsystemen untersucht. Auch in diesem Fall erfolgte eine begrenzte LipidAuswahl aus der Substanzbibliothek aufgrund der eingeschränkten Zugangsmöglichkeit zu europäischen Synchrotronquellen. In **Artikel 5** wurde das Assoziationsverhalten der Lipide als Einzelkomponente an der Luft/Wasser-Grenzfläche beschrieben, wobei deutlich der „fluidisierende“ Einfluss der Oleylketten zum Ausdruck kommt. GIXD-Untersuchungen zeigten zusätzlich zum erwarteten Alkylkettengitter der Lipide eine Überstruktur eines weiteren Strukturgitters, welches sich aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen im Bereich des Rückgrats und der Kopfgruppe ausbilden konnte. Dabei ähnelte der ermittelte Wiederholabstand einem Strukturparameter der β -Faltblattstruktur in Peptiden, wodurch der Peptid-mimetische Charakter der zweiten Generation der Malonsäurediamide untermauert wurde. **Artikel 5** demonstrierte weiterhin, dass das DNA-Bindungsverhalten der Lipide vom Alkylkettenmuster beeinflusst wurde. So konnten Lipide mit ungesättigten Alkylketten mehr DNA binden. Eine mögliche Erklärung bietet der höhere Protonierungsgrad bei gleicher Kopfgruppenstruktur mit steigender Anzahl fluiden, ungesättigter Alkylketten (siehe **Artikel 4**). In **Artikel 6** wurden die Lipide der Kopfgruppe 10 im 3D-Modell untersucht. Hier wurden Untersuchungen der Phasenlage der reinen Lipide durchgeführt, wobei DSC, schwingungsspektroskopische Methoden, SAXS- und WAXS-Messungen zum Einsatz kamen. Auch hier wurde das Wasserstoffbrückennetzwerk im Bereich des Lipidrückgrats identifiziert. In **Artikel 6** wurden weiterhin Mischungen aus den Malonsäurediamiden mit *DOPE* als Co-Lipid betrachtet. *DOPE* brach dabei das Wasserstoffbrückennetzwerk in den kationischen Lipiden auf, störte die Kettenpackung und resultierte in eine Lipidformulierung mit erhöhter Kettenfluidität. Es bildeten sich kubische Mesophasen aus und nach DNA-Komplexierung konnten verschiedene Lipoplexstrukturen beobachtet werden, wobei kubische und lamellare Strukturen dominierten. Die effektivste Mischung in den Transfektionsuntersuchungen am Zellkulturmodell, *OO10/DOPE* 1/1 (n/n) N/P 4, bildete lamellare Lipoplexe aus.

*Details sind in **Artikel 4** (Anhang 4), **Artikel 5** (Anhang 5) und **Artikel 6** (Anhang 6) nachzulesen!*

7.2 Optimierung ausgewählter Lipidmischungen als Transfektionssysteme für die systemische Applikation

7.2.1 Allgemeine Erläuterungen

In diesem Kapitel liegen die Schwerpunkte darin, ausgewählte Transfektionssysteme aus den vorliegenden Substanzbibliotheken hinsichtlich des Assoziationsverhaltens zu charakterisieren, die DNA-Komplexierung besser zu verstehen, die Lipidformulierung zu optimieren und die Interaktion mit biologischen Materialien zu untersuchen. Eine Vielzahl an analytischen Methoden und biologischen Assays fanden dabei Anwendung. Diese werden in den einzelnen Artikeln beschrieben. Um zukünftige *In-vivo*-Tests für die systemische Applikation von Lipoplexen vorzubereiten, wurden auch Hämokompatibilitätstests durchgeführt. Erste *In-vivo*-Versuche mit Tierersatzmodellen nach dem 3R-Prinzip für Tierversuche (*replace* – ersetzen/vermeiden, *reduce* – verringern, und *refine* - verbessern) wurden durchgeführt. Dieses Testprinzip wurde mit dem Ziel einer Reduktion von Tierexperimenten in der europäischen Gesetzgebung verankert (europäische Richtlinie 2010/63/EU). Im folgenden Teil werden vier vielversprechende Lipidformulierungen für die Weiterentwicklung als Transfektionssystem präsentiert. Die kationischen Komponenten dieser Formulierungen sind in **Abb. 18** dargestellt.

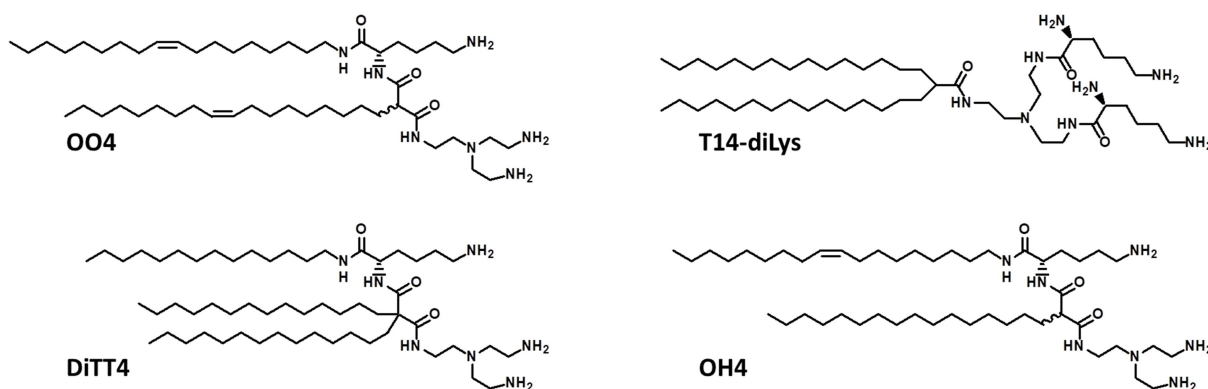


Abb. 18 – Neu entwickelte kationische Lipide, welche in effektive Lipidformulierungen resultierten und die in den folgenden Kapiteln näher betrachtet werden.

7.2.2 OO4/DOPE 1/3 Lipoplexe

OO4 (**Abb. 18**) ist ein vielversprechendes Transfektionslipid. Im vorangegangenen Kapitel fand es bereits Erwähnung in **Artikel 4**. Das Potential als Transfektionslipid zeigte sich bereits mit den ersten Zellkulturversuchen (unveröffentlichte Daten). Detaillierte Aufnahmestudien konnten im Rahmen einer Kooperation mit dem *National Center for Nanoscience and Technology* (Beijing, China) durchgeführt und veröffentlicht werden (Zhang

et al., 2015). Die Arbeit zeigte, dass die Liposomenformulierung *OO4/DOPE* 1/3 (n/n) effizient von Zellen phagozytiert und aus dem Endosom in das Zytoplasma freigesetzt werden konnte.

Ziel weiterführender Arbeiten war es die Lipidformulierung zu optimieren, wobei die Formulierungen *OO4/DOPE* und *OO4/DPPE* vergleichend untersucht wurden. Dieser Vergleich wurde gewählt um den Einfluss einzelner Komponenten auf die Eigenschaften der Formulierung besser zu verstehen. Die Charakterisierung auf physikochemischer Ebene wurde in **Artikel 7** veröffentlicht. Die Strukturaufklärungen lieferten detaillierte Einblicke in die pH-abhängige Strukturbildung der Lipidformulierungen *OO4/DOPE* 1/3 (n/n) und *OO4/DPPE* 1/3 (n/n) sowie deren Lipoplexe. Es wurde demonstriert, dass die Ladungsdichte und DNA-Bindungskapazität vom pH-Wert und der Zusammensetzung der Lipidformulierung beeinflusst worden sind. Von großer Relevanz waren dabei die Effekte der Co-Lipidspezies auf die Lipoplexstrukturen. So konnten bei pH 3 *OO4/DOPE* 1/3 (n/n) Lipoplexe von hexagonaler Struktur nachgewiesen werden und bei pH 6,5 kubische Strukturen. *OO4/DPPE* 1/3 (n/n) Lipoplexe wiesen bei beiden pH-Werten lamellare Strukturen auf. Letztere Lipoplexformulierung war im Zellkulturmodell weiterhin weniger effizient. In der Literatur wird immer wieder diskutiert, dass die Ausbildung von nicht-lamellaren Strukturen während der endosomalen Reifung nach der endozytotischen Aufnahme für eine Freisetzung von Lipoplexen in das Zytoplasma verantwortlich sein kann (Degors, Isabelle M. S. *et al.*, 2019; Zuhorn *et al.*, 2005; Hoekstra *et al.*, 2007). Die in **Artikel 8** veröffentlichten Experimente untersuchten die Stabilität von Lipoplexen der beiden Lipidformulierungen in Gegenwart von Polyanionen und Blutserumkomponenten. Diese Stabilitätsuntersuchungen beinhalteten neben der Untersuchung der unerwünschten DNA-Freisetzung und den damit verbundenen enzymatischen Abbau der Nukleinsäuren auch Untersuchungen zur kolloidalen Stabilität der Lipoplexformulierung in biologisch relevanten Medien. So zeigte die Arbeit, dass die Mischung von *OO4* mit *DOPE* der Formulierung mit *DPPE* überlegen war. *OO4/DOPE* 1/3 (n/n) Lipoplexe komplexierten Nukleinsäuren effizient, waren stabil gegen den Abbau durch Serumkomponenten und zeigten keine Aggregation in Anwesenheit von Serum. Details der Arbeiten sind in **Artikel 8** nachzulesen.

Details sind in Artikel 7 (Anhang 7) und Artikel 8 (Anhang 8) nachzulesen!

7.2.3 T14diLys/DOPE 1/2 (n/n) Lipoplexe

Neben der in **Abb. 18** gezeigten Substanzbibliothek standen auch homologe Reihen von verzweigten Fettsäuren zur Verfügung. Diese wurden systematisch mit dem Co-Lipid *DOPE* zu kationischen Liposomen formuliert und hinsichtlich der Transfektionseffizienz im Zellkulturmodell charakterisiert. *T14diLys* (**Abb. 18**) trat dabei als effektiver Vertreter für eine erfolgreiche *In-vitro*-Transfektion hervor. Die Ergebnisse wurden in **Artikel 9** zusammengefasst. Bei den Untersuchungen stellte sich die Lipidformulierung *T14diLys/DOPE* 1/2 (n/n) als besonders effizient heraus. Sie zeichnete sich durch eine effiziente DNA-Komplexierung und eine hohe Transfektionseffizienz im Zellkultursystem aus, wobei auch in Gegenwart von Serum ein effektiver DNA-Transfer beobachtet wurde. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde diese Formulierung hinsichtlich ihrer Eignung für die systemische Applikation näher untersucht. Die Details sind in **Artikel 10** nachzulesen. Verschiedene *In-vitro*-Untersuchungen demonstrierten eine hohe Stabilität der Lipoplexformulierung gegenüber Serumkomponenten. So konnte ein Schutz vor enzymatischen Abbau durch Nukleasen im Serum nachgewiesen werden. Des Weiteren war die Protein-induzierte Aggregation der Lipoplexformulierung auf einem sehr niedrigen Niveau. Die Abwesenheit hämolytischer und hämorrhagischer Aktivität wurde für einen bestimmten Konzentrationsbereich an Lipoplexen nachgewiesen. Die Proteinkorona scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen. Somit geben diese Arbeiten wichtige Parameter der Lipoplexformulierungen an, welche für weiterführende *In-vivo*-Versuche beachtet werden müssen. Erste Zellkulturversuche mit der Lipoplexformulierung *T14diLys/DOPE* 1/2 (n/n) demonstrierten das Potenzial Makrophagen, Endothelzellen und Lymphozyten zu transfizieren. Ob sich diese Experimente in therapeutische Anwendungen überführen lassen, muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

Details sind in Artikel 9 (Anhang 9) und Artikel 10 (Anhang 10) nachzulesen!

7.2.4 DiTT4 Lipoplexe

Das kationische Lipid *DiTT4* (**Abb. 18**) ist der bisher einzige Vertreter der Malonsäurediamide der dritten Generation. Es zeichnete sich durch ein besonderes Assoziationsverhalten im wässrigen Milieu aus. Es wurde nachgewiesen, dass *DiTT4* bei pH 5 Wurmizellen ausbildete, bei pH 7,3 aber erfolgreich zu Liposomen formuliert werden konnte. Dieser Strukturwechsel fand demzufolge in einem pH-Bereich statt, der bei der Reifung des Endosoms der Zelle durchlaufen wird. Erste Untersuchungen zeigten, dass *DiTT4* in der Lage war DNA zu komplexieren sowie einen effektiven Nukleinsäuretransfer im Zellkulturmodell zu erzielen. Die Details dieser Studien wurden in **Artikel 11** veröffentlicht. Da kationische Lipide zur Effizienzsteigerung üblicherweise mit Co-Lipiden gemischt werden, wurden detaillierte Studien zur Mischung von *DiTT4* mit den Phospholipiden *DOPE* (das klassische Co-Lipid), *DMPE* (das Phosphatidylethanolamin mit C-14-Ketten analog zu *DiTT4*) und *DMPC* (das Phosphatidylcholin mit C-14-Ketten analog zu *DiTT4*) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden erfolgreich publiziert (Wölk *et al.*, 2015), werden jedoch nicht in dieser Arbeit präsentiert, um den Umfang in Grenzen zu halten. Dennoch soll an dieser Stelle diese Studie kurz zusammengefasst werden. Die Mischungen mit *DOPE* zeigten die geringsten Tendenzen zur Phasenseparation und konnten als Liposomen formuliert werden. Auch in den Transfektionsstudien am Zellkulturmodell war die Lipidformulierung *DiTT4/DOPE* diejenige mit dem größten Potenzial für weiterführende Untersuchungen. Selbst in Anwesenheit von hohen Serumkonzentrationen war der *In-vitro*-Gentransfer effizient. Trotz dieser positiven Ergebnisse wurde die Transfektion mittels Co-Lipid-freien Formulierungen von *DiTT4* weiterverfolgt, da ein solches System einfacher im Rahmen der pharmazeutischen Herstellung zu handhaben ist. Da die Liposomen aus nur einer Lipidkomponente bestehen sind *Upscaling*-Prozesse und eine GMP-konforme Herstellung potenziell leichter zu realisieren. Somit sollte das Verständnis der Struktur und der biologischen Aktivität von *DiTT4*-Lipoplexen vertieft werden. Aus dieser Fragestellung heraus wurde **Artikel 12** veröffentlicht. In dieser Arbeit wurden *DiTT4* Lipoplexe genauer charakterisiert. Es handelte sich um lamellare Lipoplexe mit Partikelgrößen in einem Bereich, welcher die intravenöse Applikation erlaubt. Auch hier wurden die Serumstabilität und die Hämokompatibilität genauer untersucht, wobei die Lipoplexformulierung durch seine Stabilität und der geringen Hämolysetendenz positiv evaluiert wurde. Als finales *Proof-of-concept*-Experiment am komplexen biologischen System wurde die Transfektionseffizienz an der Chorion-Allantois-Membran des fertilisierten Hühnereis (CAM-Model) getestet. Hierbei handelt es sich um ein Ersatzmodell für Tierversuche im Sinne der 3R-Strategie (Luepke und

Kemper, 1986; Schendel *et al.*, 1994). Die *DiTT4*-Lipoplexe wurden am CAM-Modell im Vergleich zum Goldstandard Lipofectamine-2000[®] getestet und waren diesem deutlich überlegen. Folglich ist diese Lipoplexformulierung ein vielversprechender Kandidat für die Weiterentwicklung im Rahmen einer therapeutischen Anwendung.

Details sind in Artikel 11 (Anhang 11) und Artikel 12 (Anhang 12) nachzulesen!

7.2.5 OH4/DOPE 1/1 (n/n) Lipoplexe

Eine weitreichende Charakterisierung wurde mit dem Lipid *OH4* (**Abb. 18**) durchgeführt, einem Malonsäurediamid der zweiten Generation. Bereits in den ersten Screening-Tests stellte sich dieses Lipid gegenüber dem Strukturanalogon *TH4* als deutlich überlegen heraus. Die Effizienz konnte durch die Wahl eines geeigneten Co-Lipids, in diesem Falle *DOPE*, verbessert werden (Janich *et al.*, 2014). Im Rahmen der Habilitationsarbeit sollte das Verständnis für diese Lipidformulierung erweitert werden. In dieser Absicht wurden biologische und physikochemische Untersuchungen durchgeführt, welche in **Artikel 13** veröffentlicht wurden. Es wurden die Lipidformulierungen *TH4/DOPE* 1/1 (n/n), *TH4/DPPC* 1/1 (n/n), *OH4/DOPE* 1/1 (n/n) und *OH4/DPPC* 1/1 (n/n) vergleichend untersucht. Die Arbeit demonstrierte, dass eine effiziente Mischung der kationischen Lipidkomponente mit dem Co-Lipid wichtig für die Optimierung der Lipidformulierung ist. Dabei muss die Lipidmischung für eine erfolgreiche Transfektion die optimale Ladungsdichte und damit Bindungsstärke für DNA aufweisen. Nur im Ladungsdichteoptimum kann die Stabilität in Anwesenheit der extrazellulären Matrix gewährleistet werden, während dennoch eine intrazelluläre Freisetzung der DNA ermöglicht wird. Die effiziente zelluläre Aufnahme von *OH4/DOPE* 1/1 (n/n) Lipoplexen wurde in einer ausführlichen Mikroskopie-basierten Untersuchung demonstriert (Janich *et al.*, 2017b). Um das Mischungsverhalten der vier Lipidformulierungen aus **Artikel 13** genauer zu verstehen, wurden diese vor und nach der Komplexierung von DNA mittels SAXS/WAXS-Messungen, Elektronenmikroskopie und Infrarot-Spektroskopie untersucht (**Artikel 14**). Die beobachteten Entmischungsphänomene waren morphologischer Art, so dass verschiedene Lipid-Assoziate nebeneinander vorlagen (z.B. Liposomen neben Lipidbändern, Lipidbänder neben Lipidscheibchen). Dennoch bildeten sich lamellare Lipoplexe mit allen Formulierungen aus. Auch hier fanden sich Unterschiede im Wiederholabstand des DNA-Gitters und im Wiederholabstand der verschiedenen lamellaren Schichten, welche auf die Bindungsstärke zwischen Lipidformulierung und DNA zurückzuführen waren. Somit wurde auch in dieser Studie die Ladungsdichte als wichtiger Parameter hervorgehoben. Sie bestimmt die Bindungsstärke zwischen DNA und kationischer Lipidformulierung mit und hat einen Einfluss auf den DNA-Gitterabstand (Yan *et al.*, 2012). In einer weiteren Untersuchungsreihe wurden die vier Lipidformulierungen zusätzlich an der LANGMUIR-Monoschicht untersucht (**Artikel 15**), wobei Druck-Flächen- sowie Adsorptions-Isothermen ausgewertet wurden. Des Weiteren wurden die Lipidmonoschichten mittels IRRAS sowie Fluoreszenzmikroskopischen Methoden untersucht. Diese Ergebnisse am 2D-Modell untermauerten die Hypothesen, welche in **Artikel 13** und **Artikel 14** aufgestellt wurden, nämlich, dass ein

ideales Mischungsverhalten der Lipidkomponenten für die Transfektion von Vorteil ist. Die Komplexbildung zwischen kationischer Lipidformulierung und DNA beeinflusste auch das Mischungsverhalten zwischen kationischem Lipid und Co-Lipid im 2D-System (**Artikel 15**). Die effektive Mischung *OH4/DOPE* 1/1 (n/n) zeigte keine Entmischungstendenzen bei der DNA-Komplexierung, die Mischung *OH4/DPPC* 1/1 (n/n) dagegen deutlich. Zusammenfassend muss bei der Entwicklung von kationischen Lipidformulierungen für die Lipofektion auf ein optimales Zusammenspiel von Mischbarkeit und Ladungsdichte geachtet werden. Weiterführende Arbeiten loteten die Beladungskapazität aus, wobei demonstriert wurde, dass mit Hilfe der Mischung *OH4/DOPE* 1/1 (n/n) das komplette HIV-Genom transfiziert werden konnte (Janich *et al.*, 2020).

Da die Lipidformulierung *OH4/DOPE* 1/1 (n/n) im Zellkulturmodell sehr effizient war, wurden Hämokompatibilitätsstudien in Verbindung mit *In-vivo*-Studien im Sinne der 3R-Strategie durchgeführt. Die Ergebnisse werden derzeit für eine Veröffentlichung zusammengefasst. Dennoch soll hier ein kurzer Einblick in die Ergebnisse gegeben werden, um das Potenzial der Lipoplexformulierung zu veranschaulichen. Bis zu einer Konzentration von 125 µg/ml traten keine hämolytischen Effekte im *In-vitro*-Test auf (**Abb. 19A**). Die Lipoplexformulierung mit einem Modellplasmid, welches GFP kodiert, transfizierte erfolgreich am CAM-Modell. Als weiteres Ersatzmodell für genehmigungspflichtige Tierversuche wurde die Lipoplexformulierung am Zebrafischembryomodell hinsichtlich Transfektionseffizienz und Bioverteilung untersucht (Sieber *et al.*, 2019; Campbell *et al.*, 2018). Diese Versuche wurden im Rahmen eines ERASMUS-Austauschprojekts an der Universität Leiden unter Betreuung von JEROEN BUSSMANN (*Assistent Professor, Leiden Academic Centre for Drug Research LACDR/Drug Delivery Technology*) durchgeführt. In der Versuchsreihe wurden die Lipoplexe mit pDNA oder mRNA beladen, welche für das Reportergen GFP codierten. Die Lipoplexe verteilten sich effizient im Gefäßsystem des Fischebryos und transfizierten Endothelzellen, wobei vorrangig Endothelzellen am Herzen Effekte zeigten (**Abb. 19D-I**). Weiterhin wurde auch die Möglichkeit Neurone zu transfizieren untersucht. Nach Applikation in die Hirnventrikel verteilten sich die Lipoplexe im Liquor und transfizierten effizient Neurone (**Abb. 19B, C**). Eine aktuelle Kooperation mit Partnern an der Universität Wien ergab die Möglichkeit eine Pilotstudie an drei Mäusen durchzuführen. Die intravenöse Applikation der Lipoplexe zeigte keinerlei akut toxischen Effekte und eine nachweisbare Transfektion in der Lunge (Daten nicht präsentiert). Dies verdeutlicht auch den Erfolg der vorangegangenen Arbeiten zur Charakterisierung und

Optimierung der Formulierung. Diese weiterführenden Versuche legitimieren nun einen Fokus auf therapeutische Anwendungen.

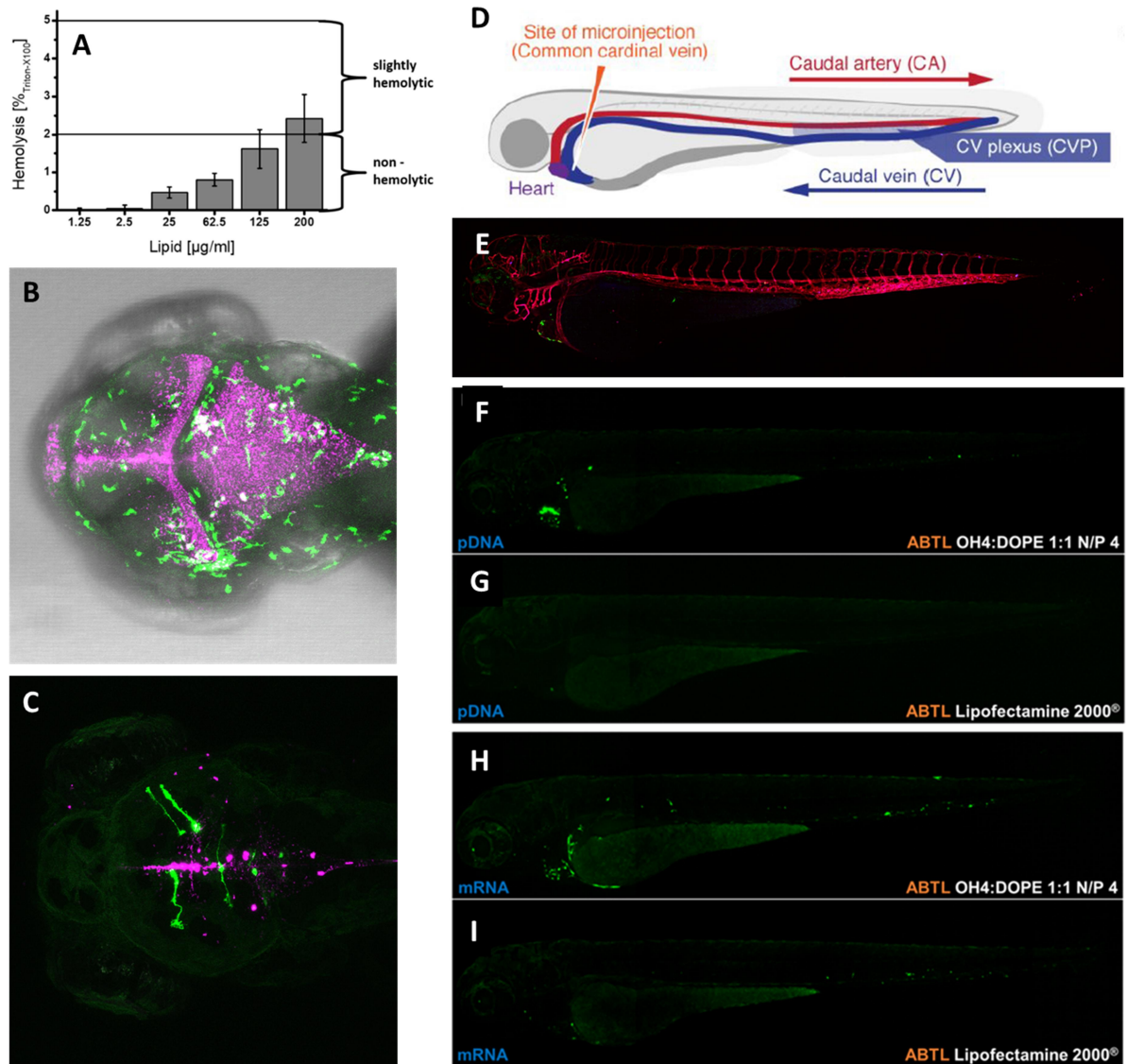


Abb. 19 – Weiterführende Untersuchungen von OH4/DOPE 1/1 Lipoplexen. A) Hämolytische Aktivität (*in vitro*) von OH4/DOPE 1/1 (n/n) Lipoplexen unterschiedlicher Konzentration. Die Hämolyse-Aktivität ist nach den ASTM-Richtlinien beurteilt. B) Draufsicht auf den Zebrafischembryoschädel 1 hpi (*hours post injection*) nach Injektion einer OH4/DOPE 1/1 (n/n) N/P 4 Lipoplexformulierung (Rhodamin-DOPE label, magenta) in den Hirnventrikel. Die Injektion erfolgte 54 hpf (*hours post fertilization*) am Embryo. Die grünen Strukturen sind GFP-markierte Makrophagen der transgenen Fischlinie. Die Lipoplexformulierung verteilte sich im Liquorraum. C) Draufsicht auf den Zebrafischembryoschädel nach intraventrikulärer Injektion einer OH4/DOPE 1/1 (n/n) N/P 4 pDNA Lipoplexformulierung (Rhodamin-DOPE label, magenta) 24 hpi. Die Injektion erfolgte 54 hpf. Die grünen Strukturen sind GFP-exprimierende Zellen. Da es sich um einen Wildtyp Embryo handelt kann eine GFP Expression nur auf das eingeschleuste GFP-Reportergen der Lipoplexe zurückgeführt werden. D) Schematische Darstellung des Zebrafischembryos 54 hpf. E) Transgene Fischlinie 54 hpf mit RFP-exprimierenden Endothelzellen (rot). Die Abbildung zeigt somit das komplette Gefäßsystem des Zebrafischembryos in diesem Entwicklungsstadium. Die grün fluoreszierenden Zellen am Herz sind ein Resultat der Transfektion mit OH4/DOPE 1/1 (n/n) N/P 4 Lipoplexen, welche mit GFP-kodierender pDNA beladen waren. F-I) Transfektionsexperimente am wildtyp Zebrafischembryo (54 hpf) mit pDNA oder mRNA beladenen Lipoplexen 24 hpi. Die Nukleinsäure kodiert in jedem Fall für GFP. Bei der grünen Fluoreszenz im Dotter handelt es sich um Autofluoreszenz. Die Lipoplexformulierung und die verwendete Nukleinsäure sind im unteren Teil des jeweiligen Bildes angegeben. Die Transfektion fand vorrangig am Herzen statt. OH/DOPE 1/1 NP4 Lipoplexe waren dem Standard Lipofektamin 2000 überlegen.

*Details sind in **Artikel 13** (Anhang 13), **Artikel 14** (Anhang 14) und **Artikel 15** (Anlage 15) nachzulesen!*

7.3 Spezielle Anwendungen von Malonsäurediamiden

7.3.1 Allgemeine Erläuterung

Um das Anwendungsspektrum der Malonsäurediamide zu erweitern, wurden nachfolgende Projekte gestartet. In diesen werden die kationische Ladung oder die freien Aminogruppen der Lipide genutzt, um komplexere Systeme zu entwickeln, welche über den Bereich der Gentherapie hinaus Anwendung finden sollen. Die in diesem Kapitel aufgeführten Projekte können im Bereich der regenerativen Medizin und der Materialwissenschaften angesiedelt werden. Die folgenden zwei Kapitel werden diese weiterführenden Arbeiten im Detail vorstellen.

7.3.2 Malonsäurediamide der 2. Generation im Bereich der regenerativen Medizin mit Schwerpunkt auf die Knochenregeneration

Die regenerative Medizin ist ein Bereich der Biomedizin der sich mit der Reparatur, dem Ersatz sowie der Regeneration von zellulären, gewebsbedingten und organischen Funktionsstörungen unterschiedlicher Genese beschäftigt (Jungebluth *et al.*, 2015). ATMPs stellen dabei die Mittel der Wahl dar. Im Rahmen dieser Arbeit und als Bestandteil des DFG Projekts 396823779 lag der Fokus auf der Regeneration von Knochengewebe. In der westlichen Welt weisen schätzungsweise 5-10% aller Knochenbrüche eine unzureichende Heilung auf, wodurch lange Arbeitsausfälle und erhebliche Kosten im Gesundheitssystem entstehen (Bessa *et al.*, 2008a). Knochengewebe ist ein komplexes dynamisches Gewebe, welches sich aus organischen und anorganischen Bestandteilen zusammensetzt (Salgado *et al.*, 2004). So stellt die Ausbesserung von großen Knochendefekten in der regenerativen Medizin immer noch eine enorme Herausforderung dar. Einen ausführlichen Überblick über die Möglichkeiten der Bildung von Knochen in der regenerativen Medizin bieten die Übersichtsartikel von SALGADO *et al.* (Salgado *et al.*, 2004) sowie AMINI *et al.* (Amini *et al.*, 2012). Eine vielversprechende Methode ist dabei die induzierte Differenzierung von Stammzellen nach der Rekrutierung an künstlichen Gerüstsubstanzen. *Bone morphogenic proteins* (BMP's) sind Zytokine, welche eine wichtige Rolle in der Osteoneogenese spielen (Salgado *et al.*, 2004; Bessa *et al.*, 2008a). Das von der FDA zugelassene BMP-2 spielt in diesem Zusammenhang eine führende Rolle. Dennoch gibt es Nachteile bei der Anwendung des Proteins. So beträgt die therapeutische Dosis beim Menschen 800 µg/ml (Bessa *et al.*, 2008a), was einen hohen Bedarf an kostenintensiven Proteintherapeutika bedeutet. Ein weiteres Problem stellen der enzymatische Abbau und die physikalische Stabilität des Peptids dar. Weiterhin werden BMP's durch körpereigene Inhibitoren wie Noggin oder Sclerostin

inhibiert. Ein zusätzliches Problem bei der Anwendung von *BMP*'s stellt die Bildung von spezifischen Antikörpern dar, was neben einer erhöhten Abbaurrate auch zu immunologischen Komplikationen führen kann (Bessa *et al.*, 2008a; Bessa *et al.*, 2008b). Die Arbeitsgruppe um CATHERINE PICART versucht diese Probleme durch *BMP-2* beladene Polyelektrolytmultischichtsysteme (PEM-Filme) als lokale Freisetzungssysteme zu umgehen (Bouyer *et al.*, 2016; Crouzier *et al.*, 2009). Einen anderen Ansatz nutzen PARK *et al.* durch die Liposomenvermittelte transiente *BMP-2* Expression (Park *et al.*, 2007).

Mit Hilfe der lokalen transienten *In-situ*-Transfektion, in diesem Fall der Implantatvermittelten Transfektion am Knochendefekt, werden rekrutierte körpereigene Zellen selbst angeregt *BMP-2* räumlich und zeitlich begrenzt zu bilden, wodurch das Risiko der ektopischen Knochenbildung stark verringert wird. Weiterhin sind Nukleinsäuren in der Anwendung und Haltbarkeit stabiler als Proteine. Somit galt es ein Transfektionssystem zu entwickeln, welches als flexibler, Lipoplex-beladener Film auf Implantate jeglicher Form aufgetragen werden kann. Die Entwicklung der *Proof-of-Concept*-Strategie für ein solches System wurde in **Artikel 16** veröffentlicht. Die Arbeit charakterisierte ein Polyelektrolyt-Multischichtsystem basierend auf der alternierenden Adsorption von Chitosan und Hyaluronsäure, in das *OH4/DOPE* 1/1 (n/n) Lipoplexe eingebettet wurden (siehe auch 7.2.5). Die Filme, welche eine Dicke im Sub-Mikrometerbereich aufwiesen, wurden intensiv charakterisiert und die Beladung mit den Lipoplexen optimiert. Weiterhin wurden die Wechselwirkungen von Zellen mit den Filmen hinsichtlich der Adhäsivität der Zellen und der Transfektionseffizienz der Filme untersucht. Erste Tests in Hinblick auf die *In-vivo*-Anwendung wurden unter Verwendung des zuvor erwähnten CAM-Modells durchgeführt. Die Datenlage aus **Artikel 16** zeigte, dass die auf Hyaluronsäure und Chitosan basierenden Lipoplex-beladenden Filme ein effizientes System für die *In-situ*-Transfektion darstellen. Aktuelle weiterführende Arbeiten beschäftigen sich mit der Wechselwirkung zwischen diesem Transfektionssystem und humanen Stammzellen, wobei die Lipoplexe mit einem für *BMP-2* kodierenden Plasmid beladen sind. So konnte durch Nutzung dieses Systems eine Mineralisierung der Stammzellkultur nachgewiesen werden, ein starkes Indiz für eine osteogene Differenzierung (**Abb. 20**).

Eine weitere Strategie die osteogene Differenzierung zu induzieren, ist die Applikation von Dexamethason, wobei liposomale Formulierungen ideale Trägersysteme für das Glucocorticoid darstellen (Monteiro *et al.*, 2015). Die Lipidformulierungen mit Malonsäurediamiden sind in der Lage kationische Liposomen zu bilden. Aufgrund dieser

Voraussetzungen wurde ein Arzneistoffträgersystem - basierend auf Polyelektrolytmultischichten - entwickelt, welches mit Dexamethason-haltigen Liposomen beladen wurde. Die Liposomen enthielten Malonamide der zweiten Generation, welche es ermöglichten, eine genügend starke positive Ladung für ein erfolgreiches Einbetten in die PEM's zu erzeugen. Die Ergebnisse wurden in **Artikel 17** zusammengefasst. Als Liposomenformulierung diente *OO4/DOPE* 1/3 (n/n) die mit 2,5 % (Masse) Dexamethason beladen waren (siehe auch 7.2.2). Als Polyelektrolyte für den Filmaufbau wurden Kollagen Typ 1 und Chondroitinsulfat gewählt. Beide Polyelektrolyte sind Bestandteile der extrazellulären Matrix und können Zellen in ihrer Differenzierung beeinflussen (über direkten Integrin-vermittelten Kontakt oder indirekt über Wachstumsfaktoren mit Bindungsmotiven für die extrazelluläre Matrix) (Di Lullo *et al.*, 2002; Hachim *et al.*, 2019). Die Arbeit zeigte den effektiven Einbau der *OO4/DOPE* 1/3 (n/n) Liposomen in die Polyelektrolytmultischicht. Weiterhin konnte die Aufnahme der Liposomen von Zellen, welche auf dem Film wachsen, gezeigt werden. Weitere Untersuchungen demonstrierten eine erfolgreiche osteogene Differenzierung von Zellen auf den Multischichtsystemen, welche mit Dexamethason-haltigen Liposomen beladen wurden.

Somit zeigen die beiden Arbeiten, dass kationische Lipidformulierungen auch in komplexen Systemen für die Arzneistofffreisetzung aus Biomaterialien angewendet werden können. Da es sich bei diesen zwei Arbeiten um erste *Proof-of-concept*-Studien handelte, soll die Weiterentwicklung dieser Systeme in zukünftigen Arbeiten erfolgen.

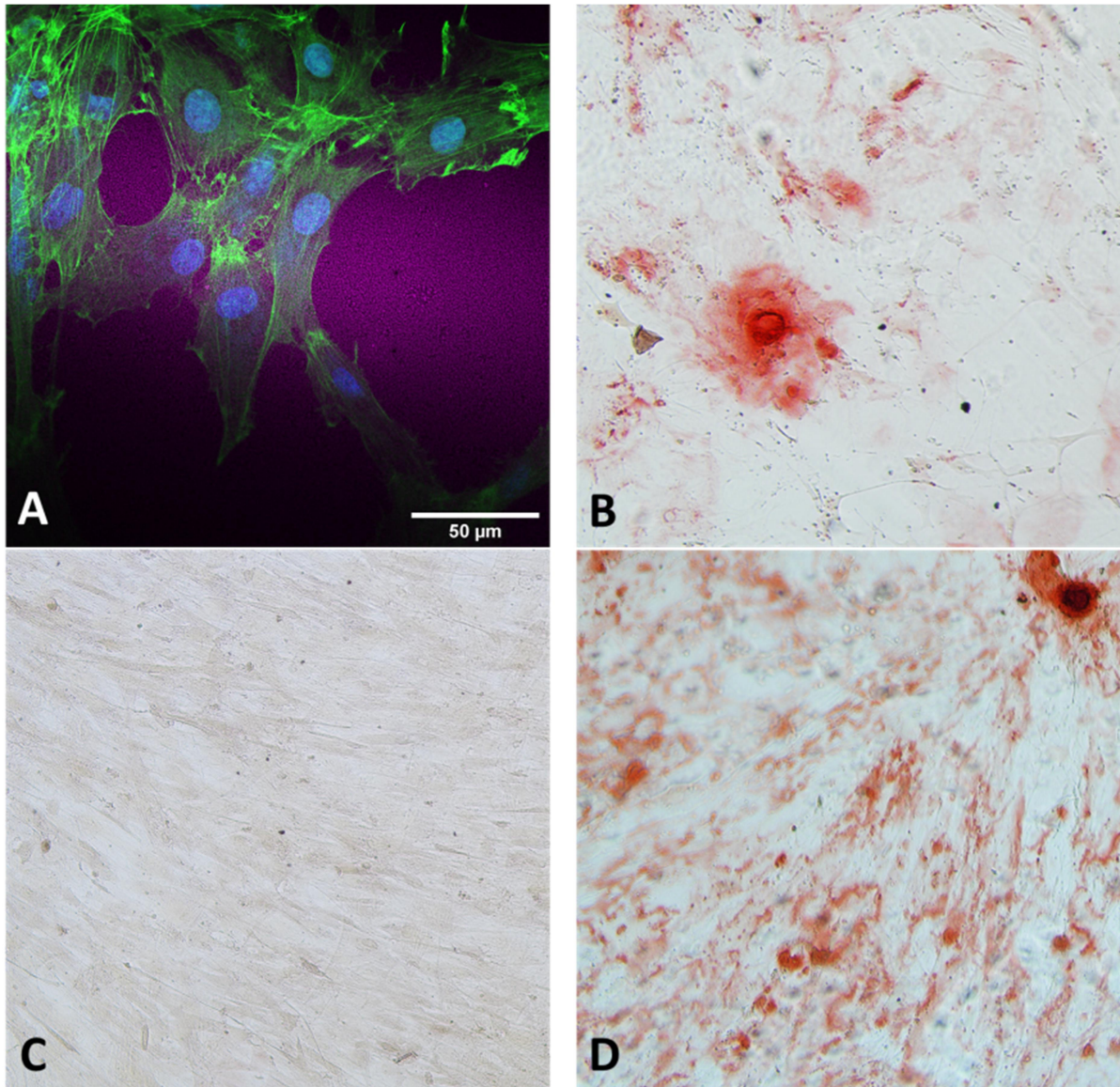


Abb. 20 – Erste Ergebnisse zur Wechselwirkung von ADHSC's mit Lipoplex-beladenen PEM's. A) Konfokalmikroskopisches Bild von ADHSC's in Wechselwirkung mit einem Lipoplex-beladenen PEM-Film bestehend aus Hyaluronsäure und Chitosan. Das Chitosan ist kovalent mit Atto-Rho-6G, einem Rhodaminderivat, gelabelt, welches hier in magenta zu sehen ist. Das Zytoskelett der Zellen ist mit AlexaFluor488-Phalloidin (grün) und der Zellkern mit BOBO-1 (blau) gekennzeichnet. B-D) Ergebnisse der Alizarinfärbung auf Calciumphosphatablagerung in der Zellkultur 21 Tage nachdem die ADHSC's auf (B) BMP-2-pDNA-Lipoplex-beladene PEM's, (C) Lipoplex-freie PEM's in Abwesenheit von osteogenem Medium und (D) Lipoplex-freie PEM's in Präsenz von osteogenem Medium kultiviert wurden. Eine rote Färbung weist auf Calciumphosphatablagerungen hin und ist ein Indiz für eine osteogene Differenzierung der Stammzellen. Das osteogene Medium enthält unter anderem BMP-2 und Dexametason und stimuliert ADHSC's zur osteogenen Differenzierung wodurch (D) als Positivkontrolle anzusehen ist. In Abwesenheit von osteogenem Medium ist keine Allizarinfärbung zu erkennen, was in der Negativkontrolle (C) ersichtlich wird. In (B) kann also die positive Allizarinfärbung auf eine erfolgreiche Expression des BMP-2 durch *In-situ*-Transfektion, vermittelt durch den Lipoplex-beladenen PEM-Film, zurückgeführt werden, wodurch die osteogene Differenzierung angeregt wird.

Details sind in Artikel 16 (Anhang 16) und Artikel 17 (Anhang 17) nachzulesen!

7.3.3 Darstellung amphiphiler ultradünner Filme für Oberflächenmodifikationen mittels 2D-Polymerisation.

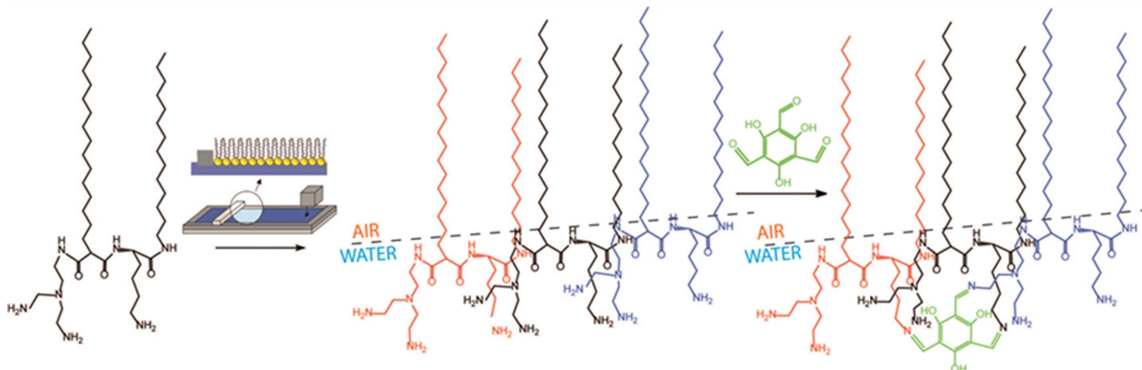
Im Bereich der Materialwissenschaften spielen Polymere eine wichtige Rolle. Die Herausforderung auf diesem Gebiet liegt in der kontrollierten Polymerisation in definierte Dimensionen. Eine Möglichkeit bietet die Origami-artige Polymerisation von rigiden Monomeren zu flächigen Strukturen (Xiang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018; Evans *et al.*, 2018). Die Polymerisation an Grenzflächen bietet dabei eine elegante Methode (Sakamoto *et al.*, 2009; Grill und Hecht, 2020; Sakamoto *et al.*, 2017). Auch die Luft/Wasser-Grenzfläche kann dafür ausgenutzt werden (Murray *et al.*, 2015; Payamyar *et al.*, 2014; Dai *et al.*, 2016; Rodríguez-San-Miguel *et al.*, 2020; Kan *et al.*, 2018; Müller *et al.*, 2018; Gadwal *et al.*, 2018). Die Anwendungsmöglichkeiten solcher Systeme sind weitreichend, von der Produktion chiraler Oberflächen, elektronischer Materialien, und akustischer Medien, über Biomaterialien, bis hin zu molekularen Maschinen (Payamyar *et al.*, 2014).

Die in den vorangegangenen Kapiteln besprochenen Lipide ordnen sich an der Luft/Wasser Grenzfläche an und besitzen mit den Aminofunktionen eine nukleophile Gruppe, die sich für Quervernetzungsreaktionen eignet. In einem zielgerichteten Vorscreening wurden Malonsäurediamide unterschiedlicher Generationen hinsichtlich ihrer Orientierung und Wechselwirkung in der LANGMUIR-Monoschicht untersucht. Dabei wurde ein alkalischer pH-Wert eingestellt, damit die Aminogruppen in ihrer ungeladenen Form vorlagen. Die Ergebnisse sind in **Artikel 18** nachzulesen. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass alle Vertreter ein intensives Wasserstoffbrückennetzwerk im Kopfgruppenbereich ausbilden. Weiterhin war die Geometrie der Anordnung an der Luft/Wasser-Grenzfläche stark vom Strukturtyp des Lipids, anders gesagt von der Generation der Malonamide, abhängig. Die erste Generation wies aufrechtstehende Alkylketten auf, während in der zweiten Generation diese sehr stark geneigt waren. Die dritte Generation befand sich hinsichtlich der Orientierung dazwischen. Folglich lassen sich durch die Auswahl der Lipide der Ausgangszustand der Quervernetzungsreaktion und somit hypothetisch auch die Reaktionskinetik und Reaktionsmöglichkeit steuern.

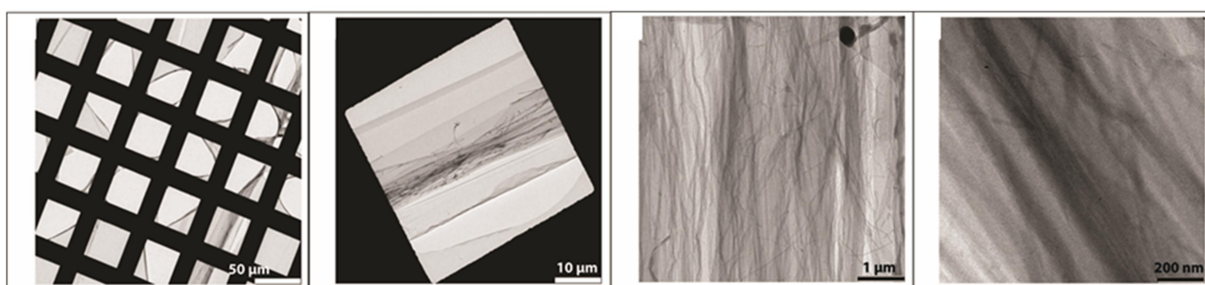
In einem Pilotprojekt wurden erste 2D-Polymerisationen mit den Lipiden aus **Artikel 18** durchgeführt. Die Quervernetzung der Lipide erfolgte mittels Imin-Bildung zwischen den Aminogruppen der Malonamide und den Aldehydgruppen des Quervernetzers 1,3,5-Triformylphoroglucinol (**Abb. 21A**). Es konnten stabile ultradünne Filme hergestellt werden (**Abb. 21B**), wobei verschiedene Techniken eingesetzt wurden, um die 2D-Polymerisation zu

verfolgen (Abb. 21C). Somit stehen die Techniken nun für zukünftige Projekte zur Verfügung.

A) Schematic concept of 2D polymerization of aminolipids at the air-water interface



B) Transmission electron micrographs of a cross-linked ultra-thin film at different magnifications



C) Methods to follow the crosslinking reaction

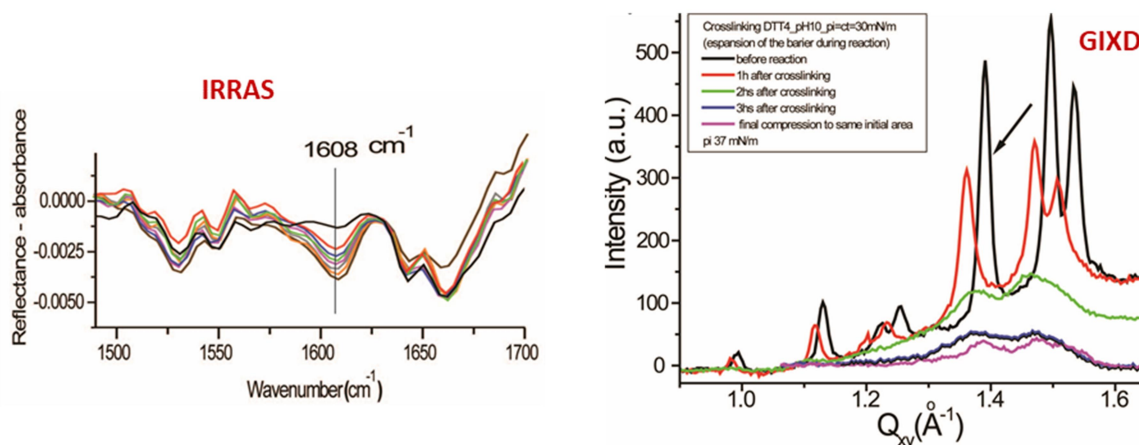


Abb. 21 – Ergebnisse der Pilotstudien zur Polymerisation an der Luft/Wasser-Grenzfläche A) Schematische Darstellung der 2D-Polymerisation von *TH4* mit 1,3,5-Triformylphoroglucinol bei pH 9-10 an der Luft/Wasser-Grenzfläche. B) Elektronenmikroskopische Aufnahmen des entstandenen 2D-Polymers (ultradünner amphiphiler Film) bei verschiedenen Vergrößerungen. C) Analytische Methoden, welche die Filmbildung verfolgen können. IRRAS: Zunahme der Bandenintensität der aromatischen Iminbande bei 1608 cm^{-1} . GIXD: Verlust der geordneten Struktur der Alkylketten und des Kopfgruppengitters mit zunehmendem Reaktionsverlauf am Beispiel der Reaktion von *DiTT4* mit 1,3,5-Triformylphoroglucinol bei pH 9-10. Dies resultiert in eine Abnahme der Signalintensitäten bzw. in dem Verschwinden einiger Signale.

Details sind in Artikel 18 (Anhang 18) nachzulesen!

8 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der Habilitationsarbeit wurden verschiedene Substanzbibliotheken von Amino-funktionalisierten Lipiden charakterisiert, wobei unterschiedliche Schwerpunkte gesetzt wurden. So lag ein Fokus darin, ein Verständnis für das Ladungsverhalten der protonierbaren Lipide zu entwickeln. Es konnte gezeigt werden, dass der scheinbare pKs-Wert erheblich durch die Wahl der Alkylketten der Lipide beeinflusst werden kann. Damit wurde auch das Selbst-Assoziationsverhalten der Lipide und die Komplexierung der Nukleinsäuren beeinflusst. Für einzelne Lipidreihen mit zielgerichteten Strukturvariationen konnten somit erfolgreich Struktur/Effektivitäts-Beziehungen abgeleitet werden. Diese beinhalteten den Einfluss des Lipidmischungsverhaltens und der optimalen Ladungsdichte auf die Transfektionseffizienz. Auch Korrelationen zwischen den ausgebildeten Mesophasen, in An- und Abwesenheit von DNA, und der DNA-Transfereffizienz im Zellkulturmodell wurden gefunden. Dennoch verdeutlicht die in dieser Arbeit präsentierte Datenlage das komplexe Verhalten der Lipoplexbildung und die Schwierigkeit allgemeingültige harte Parameter für die Vorhersage von biologischen Aktivitäten zu finden. So fanden wir für die effektivsten Lipoplexformulierungen sowohl lamellare als auch nicht-lamellare Mesophasen. Folglich können in diesem Bereich zum aktuellen Zeitpunkt noch keine eindeutigen Aussagen zu Struktur/Effizienz-Beziehungen getroffen werden. Jedoch konnte der Einfluss einer guten Mischbarkeit auf die Homogenität der Lipidformulierung als Grundvoraussetzung für eine effiziente Einstellung der Ladungsdichte in verschiedenen Arbeiten verdeutlicht werden. In diesem Bereich bieten die präsentierten Arbeiten ein breites Spektrum an Methoden, unter Berücksichtigung der probenspezifischen Limitierungen, um das Mischungsverhalten von kationischen Lipidformulierungen in An- und Abwesenheit von Nukleinsäuren zu untersuchen. Eine zielgerichtete Kombination dieser Methoden kann für die zukünftige Optimierung neuer Lipidmischungen für die Lipofektion genutzt werden. Die Relevanz für derartige zielgerichtete Entwicklungen von kationischen Lipidformulierung für den Nukleinsäuretransfer hält uns die aktuelle SARS-CoV-2-Pandemie vor Augen. Der Impfstoffkandidat der ersten Stunde, Comirnaty (BIONTEC, EU-Zulassung 2020), beruht auf einer kationischen Lipidformulierung der Firma ACUITAS THERAPEUTICS, eine kanadische Firma, welche sich auf die Entwicklung von kationischen Lipidformulierungen für den Nukleinsäuretransfer spezialisiert hat. Diese Anwendung von Lipid/Nukleinsäure-Formulierungen als Impfstoff ist ein Meilenstein in der klinischen Anwendung der

„Lipofektion“ und wird mit hoher Wahrscheinlichkeit die Entwicklung weiterer Lipoplex-basierter Therapien oder Vakzinen positiv beeinflussen.

Großes Potential für die Entwicklung klinischer Anwendungen liegt bei den vier Lipidformulierungen, deren biologische Aktivität im Rahmen dieser Arbeit detailliert untersucht wurde. Diese werden derzeit in aktuellen Projekten bearbeitet, bzw. sind ein wesentlicher Bestandteil neuer Projekte, welche sich in der Planungsphase befinden.

DiTT4 überzeugt vor allem als Ein-Komponenten-Lipidsystem. So wurden die ersten Untersuchungen nicht nur erfolgreich publiziert, sondern die Ergebnisse der Entwicklung des kationischen Lipids schafften es auch in die Finalisten-Runde der Rubrik „Innovativste Projekte der Grundlagenforschung“ des HUGO-JUNKERS-Preises 2017 (IMG Sachsen Anhalt). Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse im Tierersatzmodell sind weiterführende Untersuchungen mit *DiTT4* im Mausmodell geplant, um die Bioverteilung im Säugetier zu verstehen und Möglichkeiten für therapeutische Anwendungen zu finden. Darüber hinaus gilt es auch den Fokus auf das *Up-scaling* der Lipoplexformulierung auf einen GMP-konformen Herstellungsprozess zu legen. Damit soll der bisher postulierte Vorteil des kationischen Lipids experimentell untermauert werden.

T14diLys ist auch in weiterführenden Forschungsprojekten vertreten. So haben die in dieser Arbeit präsentierten Untersuchungen unser Verständnis für die Interaktion der Lipidformulierung mit biologischen Materialien deutlich erweitert. Der Schwerpunkt lag dabei auf der systemischen Applikation. Es gilt nun den Erkenntnisstand durch weiterführende Untersuchungen auszubauen. Um das potenzielle Anwendungsspektrum zu erweitern, wird das Potenzial von *T14diLys* als siRNA-Trägersystem untersucht. Aktuell werden *T14diLys*-basierte siRNA-Lipoplexe im Bereich der Knochenregeneration getestet. Dabei soll die Lipoplexformulierung auf Mikropartikel geladen werden, um so ein System mit kontrollierter Freisetzung zu erhalten. Erste Versuche zeigen ein vielversprechendes *Gene-silencing* in humanen Stammzellen.

OO4 wird in einer aktuellen Kooperation mit der AG Biomedizinische Materialien (Leiter PROF. THOMAS GROTH, Institut für Pharmazie, MLU Halle/Wittenberg) im Rahmen eines DAAD Projekts unter Leitung von PROF. GROTH verwendet. Hier werden die ersten Arbeiten, welche in Kapitel 7.3.2 beschrieben sind, weiter ausgebaut. Neben der osteogenen Differenzierung von Stammzellen ist auch die chondrogene Differenzierung in den Fokus getreten. Dabei wird sowohl die Strategie der Dexamethason-beladenen Liposomen als auch

der Lipoplex-vermittelten Transfektion für die Expression von BMP-2 genutzt. PEM-Systeme aus Komponenten der extrazellulären Matrix sind dabei die Mittel der Wahl um Liposomen sowie Lipoplexe zu immobilisieren und die Adhäsion von Stammzellen zu forcieren.

OH4 ist derzeit das am intensivsten charakterisierte Lipid der Malonsäure-basierten Lipide. Es findet in Projekten für die Osteoneogenese Anwendung und wird in weiteren Studien hinsichtlich biologischer Effekte nach systemischer Applikation im Tiermodell untersucht (Details in Kapitel 7.2.5). Sowohl für die systemische Applikation, als auch für die Applikation am zentralen Nervensystem, gilt es nun eine therapeutische Anwendung zu finden. Erste Überlegungen bewegen sich in Richtung Tumortherapie und Arteriosklerose im Falle der systemischen Gabe von nano-skalierten Lipoplexen. Im Bereich der Therapie am ZNS soll der Fokus auf die juvenile Neuronale Ceroid Lipofuszinose (JNCL) gelegt werden, wobei konkrete Projekte noch ausgearbeitet werden müssen. Auf letzteres Thema wurde ich von einem hilfeschuchenden Vater gebracht, dessen Tochter an JNCL erkrankt ist. So gibt es derzeit virale Gentherapiestrategien auf diesem Gebiet (Bosch *et al.*, 2016), welche vielversprechende Ergebnisse liefern. Eine nicht-virale Strategie wäre jedoch als sinnvolle Alternative anzusehen, um eine Mehrfachapplikation der therapeutischen Gensequenzen zu realisieren.

Auch wenn mein Arbeitsfeld bereits seit 10 Jahren auf dem Gebiet der Gentherapie liegt, soll ein Zukunftsprojekt sich dem materialwissenschaftlichen Bereich widmen, welcher im Kapitel 7.3.3 behandelt wurde. Die Arbeiten auf diesem Gebiet laufen derzeit weiter. Es konnten erfolgreich Nanometer-dünne amphiphile Filme aus einer Reihe von Malonamiden hergestellt werden. Für diese Arbeiten konnte PROF. EMANUEL SCHNECK (TU Darmstadt) als Kooperationspartner gewonnen werden. Damit steht dieses Projekt auf einer soliden Basis, da sowohl Expertisen aus dem Bereich der Lipidsynthese, als auch der physikalischen Charakterisierung von *Soft Matter* vorhanden sind. Das Reizvolle an diesem Projekt ist die Anwendungsvielfalt dieser Materialien. Für die Anwendung dieser Filme könnte der Weg zurück zu den Biomaterialien eingeschlagen werden, aber auch neue Anwendungsgebiete können erschlossen werden, z.B. die Entwicklung hydrophober Oberflächen oder die Anwendung in der Halbleitertechnologie. Somit möchte ich mit einer Abwandlung des Eingangszitats dieser Arbeit abschließen: *Die Wissenschaft besteht aus Etappenzielen, die jede für sich spannende Fragen klären und den Reiz dieses Berufs ausmachen.*

9 Literaturverzeichnis

- Ahmad A.**, Evans H. M., Ewert K., George C. X., Samuel C. E., und Safinya C. R. (2005), New multivalent cationic lipids reveal bell curve for transfection efficiency versus membrane charge density: lipid–DNA complexes for gene delivery. *J. Gene Med.* **7**, 739–748.
- Amini A. R.**, Laurencin C. T., und Nukavarapu S. P. (2012), Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering* **40**, 363–408.
- Antipina M. N.**, Schulze I., Heinze M., Dobner B., Langner A., und Brezesinski G. (2009), Physical–Chemical Properties and Transfection Activity of Cationic Lipid/DNA Complexes. *ChemPhysChem* **10**, 2471–2479.
- Aung W.**, Hasegawa S., Koshikawa-Yano M., Obata T., Ikehira H., Furukawa T., Aoki I., und Saga T. (2009), Visualization of in vivo electroporation-mediated transgene expression in experimental tumors by optical and magnetic resonance imaging. *Gene Therapy* **16**, 830–839.
- Bang J.**, Viswanathan K., Lodge T. P., Park M. J., und Char K. (2004), Temperature-dependent micellar structures in poly(styrene-*b*-isoprene) diblock copolymer solutions near the critical micelle temperature. *The Journal of Chemical Physics* **121**, 11489–11500.
- Bangham A. D.** und Horne R. W. (1964), Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology* **8**, 660–668.
- Barnes A. L.**, Wassel R. A., Mondalek F., Chen K., Dormer K. J., und Kopke R. D. (2007), Magnetic characterization of superparamagnetic nanoparticles pulled through model membranes. *BioMagnetic Research and Technology* **5**, Article number 1.
- Bergmann-Leitner E. S.** und Leitner W. W. (2015), Vaccination Using Gene-Gun Technology. In: *Malaria Vaccines: Methods and Protocols* (Vaughan A., ed.). Springer New York, New York, NY, pp. 289–302.
- Bessa P. C.**, Casal M., und Reis R. L. (2008a), Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *J Tissue Eng Regen Med* **2**, 81–96.
- Bessa P. C.**, Casal M., und Reis R. L. (2008b), Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *J Tissue Eng Regen Med* **2**, 1–13.
- Bhattacharya S.** und Bajaj A. (2009), Advances in gene delivery through molecular design of cationic lipids. *Chemical Communications*, 4632–4656.
- Blume A.** und Kerth A. (2013), Peptide and protein binding to lipid monolayers studied by FT-IRRA spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1828**, 2294–2305.
- Bosch M. E.**, Aldrich A., Fallet R., Odvody J., Burkovetskaya M., Schuberth K., Fitzgerald J. A., Foust K. D., und Kielian T. (2016), Self-Complementary AAV9 Gene Delivery Partially Corrects Pathology Associated with Juvenile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis (CLN3). *The Journal of Neuroscience* **36**, 9669.

- Bouyer M.**, Guillot R., Lavaud J., Plettinx C., Olivier C., Curry V., Boutonnat J., Coll J.-L., Peyrin F., Josserand V., Bettega G., und Picart C. (2016), Surface delivery of tunable doses of BMP-2 from an adaptable polymeric scaffold induces volumetric bone regeneration. *Biomaterials* **104**, 168–181.
- Braasch D. A.**, Liu Y., und Corey D. R. (2002), Antisense inhibition of gene expression in cells by oligonucleotides incorporating locked nucleic acids: effect of mRNA target sequence and chimera design. *Nucleic Acids Res* **30**, 5160–5167.
- Brezesinski G.** und Schneck E. (2019), Investigating Ions at Amphiphilic Monolayers with X-ray Fluorescence. *Langmuir* **35**, 8531–8542.
- Bulbake U.**, Doppalapudi S., Kommineni N., und Khan W. (2017), Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics* **9**.
- Burton E. A.**, Fink D. J., und Glorioso J. C. (2002), Gene Delivery Using Herpes Simplex Virus Vectors. *DNA and Cell Biology* **21**, 915–936.
- Campbell F.**, Bos F. L., Sieber S., Arias-Alpizar G., Koch B. E., Huwyler J., Kros A., und Bussmann J. (2018), Directing Nanoparticle Biodistribution through Evasion and Exploitation of Stab2-Dependent Nanoparticle Uptake. *ACS Nano* **12**, 2138–2150.
- Cao Y.**, Tan Y. F., Wong Y. S., Liew M. W., und Venkatraman S. (2019), Recent Advances in Chitosan-Based Carriers for Gene Delivery. *Mar Drugs* **17**, 381.
- Chesnoy S.** und Huang L. (2000), Structure and Function of Lipid-DNA Complexes for Gene Delivery. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **29**, 27–47.
- Counsell J. R.**, Asgarian Z., Meng J., Ferrer V., Vink C. A., Howe S. J., Waddington S. N., Thrasher A. J., Muntoni F., Morgan J. E., und Danos O. (2017), Lentiviral vectors can be used for full-length dystrophin gene therapy. *Scientific Reports* **7**, 44775.
- Crouzier T.**, Ren K., Nicolas C., Roy C., und Picart C. (2009), Layer-By-Layer Films as a Biomimetic Reservoir for rhBMP-2 Delivery: Controlled Differentiation of Myoblasts to Osteoblasts. *Small* **5**, 598–608.
- Dai W.**, Shao F., Szczerbiński J., McCaffrey R., Zenobi R., Jin Y., Schlüter A. D., und Zhang W. (2016), Synthesis of a Two-Dimensional Covalent Organic Monolayer through Dynamic Imine Chemistry at the Air/Water Interface. *Angewandte Chemie* **55**, 213–217.
- Dan Niculescu-Duvaz** und James Heyes und Caroline J. Springer (2003), Structure-Activity Relationship in Cationic Lipid Mediated Gene Transfection. *Current Medicinal Chemistry* **10**, 1233–1261.
- Davidson B. L.** und Breakefield X. O. (2003), Viral vectors for gene delivery to the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience* **4**, 353–364.
- Degors, Isabelle M. S.**, Wang C., Rehman Z. U., und Zuhorn I. S. (2019), Carriers Break Barriers in Drug Delivery: Endocytosis and Endosomal Escape of Gene Delivery Vectors. *Accounts of Chemical Research* **52**, 1750–1760.
- Di Lullo G. A.**, Sweeney S. M., Körkkö J., Ala-Kokko L., und San Antonio J. D. (2002), Mapping the Ligand-binding Sites and Disease-associated Mutations on the Most Abundant Protein in the Human, Type I Collagen. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 4223–4231.
- Dittrich M.**, Böttcher M., Oliveira J. S. L., Dobner B., Möhwald H., und Brezesinski G. (2011a), Physical–chemical characterization of novel cationic transfection lipids and the binding of model DNA at the air–water interface. *Soft Matter* **7**, 10162–10173.

- Dittrich M.**, Heinze M., Wölk C., Funari S. S., Dobner B., Möhwald H., und Brezesinski G. (2011b), Structure–Function Relationships of New Lipids Designed for DNA Transfection. *ChemPhysChem* **12**, 2328–2337.
- Dörfler H.-D.** (2002), Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Erdmann N.** (2013), Untersuchung und Charakterisierung neuartiger kationischer Lipide für die nicht-virale Gentransfektion. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, Halle (Saale).
- Evans A. M.**, Parent L. R., Flanders N. C., Bisbey R. P., Vitaku E., Kirschner M. S., Schaller R. D., Chen L. X., Gianneschi N. C., und Dichtel W. R. (2018), Seeded growth of single-crystal two-dimensional covalent organic frameworks. *Science* **361**, 52.
- Ewert K.**, Ahmad A., Evans H. M., Schmidt H.-W., and Safinya C. R. (2002), Efficient Synthesis and Cell-Transfection Properties of a New Multivalent Cationic Lipid for Nonviral Gene Delivery. *Journal of Medicinal Chemistry* **45**, 5023–5029.
- Ewert K. K.**, Evans H. M., Zidovska A., Boussein N. F., Ahmad A., und Safinya C. R. (2006), 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* **128**, 3998–4006.
- Ewert K. K.**, Zidovska A., Ahmad A., Boussein N. F., Evans H. M., McAllister C. S., Samuel C. E., and Safinya C. R. (2010), Cationic Liposome–Nucleic Acid Complexes for Gene Delivery and Silencing: Pathways and Mechanisms for Plasmid DNA and siRNA. In: *Nucleic Acid Transfection* (Bielke W. and Erbacher C., eds.). Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 191–226.
- Felgner J. H.**, Kumar R., Sridhar C. N., Wheeler C. J., Tsai Y. J., Border R., Ramsey P., Martin M., und Felgner P. L. (1994), Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 2550–2561.
- Felgner P. L.**, Gadek T. R., Holm M., Roman R., Chan H. W., Wenz M., Northrop J. P., Ringold G. M., und Danielsen M. (1987), Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**, 7413–7417.
- Ferber D.** (2001), Safer and Virus-Free? *Science* **294**, 1638.
- Flockhart B.** (1961), The effect of temperature on the critical micelle concentration of some paraffin-chain salts. *Journal of Colloid Science* **16**, 484–492.
- Folz M.** (2013), Synthese verzweigter Lipide und Gemini-Lipide für die kationische liposomale Gentransfektion. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, Halle (Saale).
- Fry L. M.**, Bastos R. G., Stone B. C., Williams L. B., Knowles D. P., und Murphy S. C. (2019), Gene gun DNA immunization of cattle induces humoral and CD4 T-cell-mediated immune responses against the *Theileria parva* polymorphic immunodominant molecule. *Vaccine* **37**, 1546–1553.
- Gadwal I.**, Sheng G., Thankamony R. L., Liu Y., Li H., und Lai Z. (2018), Synthesis of Sub-10 nm Two-Dimensional Covalent Organic Thin Film with Sharp Molecular Sieving Nanofiltration. *ACS Applied Materials & Interfaces* **10**, 12295–12299.

- Gao X.** und **Huang L.** (1991), A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **179**, 280–285.
- Grill L.** und **Hecht S.** (2020), Covalent on-surface polymerization. *Nature Chemistry* **12**, 115–130.
- Gromelski S.** und **Brezesinski G.** (2006), DNA Condensation and Interaction with Zwitterionic Phospholipids Mediated by Divalent Cations. *Langmuir* **22**, 6293–6301.
- Hachim D.**, **Whittaker T. E.**, **Kim H.**, und **Stevens M. M.** (2019), Glycosaminoglycan-based biomaterials for growth factor and cytokine delivery: Making the right choices. *Journal of Controlled Release* **313**, 131–147.
- Harpe A. von**, **Petersen H.**, **Li Y.**, und **Kissel T.** (2000), Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery. *Journal of Controlled Release* **69**, 309–322.
- Hashidzume A.** und **Harada A.** (2015), Micelles and Vesicles. In: *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials* (Kobayashi S. and Müllen K., eds.). Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1238–1241.
- Heinze M.**, **Brezesinski G.**, **Dobner B.**, und **Langner A.** (2010), Novel Cationic Lipids Based on Malonic Acid Amides Backbone: Transfection Efficacy and Cell Toxicity Properties. *Bioconjugate Chemistry* **21**, 696–708.
- Heiser U. F.** und **Dobner B.** (1996), Novel bipolar phospholipids with different headgroups. *Chemical Communications*, 2025–2026.
- Heller L. C.** und **Heller R.** (2006), In Vivo Electroporation for Gene Therapy. *Human Gene Therapy* **17**, 890–897.
- Hinz T.**, **Kallen K.**, **Britten C. M.**, **Flamion B.**, **Granzer U.**, **Hoos A.**, **Huber C.**, **Khleif S.**, **Kreiter S.**, **Rammensee H.-G.**, **Sahin U.**, **Singh-Jasuja H.**, **Türeci Ö.**, und **Kalinke U.** (2017), The European Regulatory Environment of RNA-Based Vaccines. In: *RNA Vaccines: Methods and Protocols* (Kramps T. and Elbers K., eds.). Springer New York, New York, NY, pp. 203–222.
- Hoekstra D.**, **Rejman J.**, **Wasungu L.**, **Shi F.**, und **Zuhorn I.** (2007), Gene delivery by cationic lipids: in and out of an endosome. *Biochem Soc Trans* **35**, 68–71.
- Hope M. J.**, **Bally M. B.**, **Mayer L. D.**, **Janoff A. S.**, und **Cullis P. R.** (1986), Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. *Chemistry and Physics of Lipids* **40**, 89–107.
- Hosseinkhani H.**, **Abedini F.**, **Ou K.-L.**, und **Domb A. J.** (2015), Polymers in gene therapy technology. *Polym. Adv. Technol.* **26**, 198–211.
- IMG Sachsen Anhalt**, Nominierte - Innovativste Vorhaben der Grundlagenforschung. <https://www.youtube.com/watch?v=PhBH0IZdUuU&list=PLJHglueAaz9d8kRUaee9lOYS-3MbwQONg&index=3>.
- Israelachvili J. N.** (2011), *Intermolecular and Surface Forces*. Elsevier.
- Israelachvili J. N.**, **Marčelja S.**, und **Horn R. G.** (1980), Physical principles of membrane organization. *Quarterly Reviews of Biophysics* **13**, 121–200.
- Israelachvili J. N.**, **Mitchell D. J.**, und **Ninham B. W.** (1976), Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* **72**, 1525–1568.

- Janich C.**, Hädicke A., Bakowsky U., Brezesinski G., und Wölk C. (2017a), Interaction of DNA with Cationic Lipid Mixtures—Investigation at Langmuir Lipid Monolayers. *Langmuir* **33**, 10172–10183.
- Janich C.**, Ivanusic D., Giselbrecht J., Janich E., Pinnapireddy S. R., Hause G., Bakowsky U., Langner A., und Wölk C. (2020), Efficient Transfection of Large Plasmids Encoding HIV-1 into Human Cells—A High Potential Transfection System Based on a Peptide Mimicking Cationic Lipid. *Pharmaceutics* **12**, 805.
- Janich C.**, Pinnapireddy S. R., Erdmann F., Groth T., Langner A., Bakowsky U., und Wölk C. (2017b), Fast therapeutic DNA internalization – A high potential transfection system based on a peptide mimicking cationic lipid. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **118**, 38–47.
- Janich C.**, Wölk C., Taßler S., Drescher S., Meister A., Brezesinski G., Dobner B., und Langner A. (2014), Composites of malonic acid diamides and phospholipids – Structural parameters for optimal transfection efficiency in A549 cells. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **116**, 1184–1194.
- Jeong J. H.**, Kim S. W., und Park T. G. (2007), Molecular design of functional polymers for gene therapy. *Progress in Polymer Science* **32**, 1239–1274.
- Jungebluth P.**, Haag J. C., und Macchiarini P. (2015), Regenerative Medizin. *Zeitschrift für Herz-,Thorax- und Gefäßchirurgie* **29**, 213–220.
- Kan X.**, Ban Y., Wu C., Pan Q., Liu H., Song J., Zuo Z., Li Z., und Zhao Y. (2018), Interfacial Synthesis of Conjugated Two-Dimensional N-Graphdiyne. *ACS Applied Materials & Interfaces* **10**, 53–58.
- Kay M. A.**, Glorioso J. C., und Naldini L. (2001), Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Medicine* **7**, 33–40.
- Köhler K.**, Förster G., Hauser A., Dobner B., Heiser U. F., Ziethe F., Richter W., Steiniger F., Drechsler M., Stettin H., und Blume A. (2004a), Self-Assembly in a Bipolar Phosphocholine–Water System: The Formation of Nanofibers and Hydrogels. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 245–247.
- Köhler K.**, Förster G., Hauser A., Dobner B., Heiser U. F., Ziethe F., Richter W., Steiniger F., Drechsler M., Stettin H., und Blume A. (2004b), Temperature-Dependent Behavior of a Symmetric Long-Chain Bolaamphiphile with Phosphocholine Headgroups in Water: From Hydrogel to Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 16804–16813.
- Koltover I.**, Salditt T., Rädler J. O., und Safinya C. R. (1998), An Inverted Hexagonal Phase of Cationic Liposome-DNA Complexes Related to DNA Release and Delivery. *Science* **281**, 78.
- Koynova R.** und MacDonald R. C. (2005), Lipid transfer between cationic vesicles and lipid–DNA lipoplexes: Effect of serum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1714**, 63–70.
- Koynova R.** und Tenchov B. (2008), Lipids: Phase Transitions. In: *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*.
- Koynova R.** und Tenchov B. (2009), Cationic phospholipids: structure–transfection activity relationships. *Soft Matter* **5**, 3187–3200.

- Koynova R.** und **Tenchov B. (2010)**, Cationic Lipids: Molecular Structure/Transfection Activity Relationships and Interactions with Biomembranes. In: *Nucleic Acid Transfection* (Bielke W. and Erbacher C., eds.). Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 51–93.
- Kranz L. M.**, **Diken M.**, **Haas H.**, **Kreiter S.**, **Loquai C.**, **Reuter K. C.**, **Meng M.**, **Fritz D.**, **Vascotto F.**, **Hefesha H.**, **Grunwitz C.**, **Vormehr M.**, **Hüsemann Y.**, **Selmi A.**, **Kuhn A. N.**, **Buck J.**, **Derhovanessian E.**, **Rae R.**, **Attig S.**, **Diekmann J.**, **Jabulowsky R. A.**, **Heesch S.**, **Hassel J.**, **Langguth P.**, **Grabbe S.**, **Huber C.**, **Türeci Ö.**, und **Sahin U. (2016)**, Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature* **534**, 396–401.
- Langmuir I. (1917)**, The Constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids. II. *Journal of the American Chemical Society* **39**, 1848–1906.
- Leal C.**, **Ewert K. K.**, **Shirazi R. S.**, **Bouxein N. F.**, und **Safinya C. R. (2011)**, Nanogyroids Incorporating Multivalent Lipids: Enhanced Membrane Charge Density and Pore Forming Ability for Gene Silencing. *Langmuir* **27**, 7691–7697.
- Levingstone T. J.**, **Herbaj S.**, **Redmond J.**, **McCarthy H. O.**, und **Dunne N. J. (2020)**, Calcium Phosphate Nanoparticles-Based Systems for RNAi Delivery: Applications in Bone Tissue Regeneration. *Nanomaterials* **10**, 146.
- Lippold B. C.**, **Müller-Goymann C.**, und **Schubert R. (2017)**, *Bauer/Frömming/Führer Pharmazeutische Technologie Mit Einführung in Biopharmazie und Biotechnologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Loehr B. I.**, **Willson P.**, **Babiuk L. A.**, und **van Drunen Littel-van den Hurk S. (2000)**, Gene Gun-Mediated DNA Immunization Primes Development of Mucosal Immunity against Bovine Herpesvirus 1 in Cattle. *Journal of Virology* **74**, 6077.
- Luepke N. P.** und **Kemper F. H. (1986)**, The HET-CAM test: An alternative to the draize eye test. *Food and Chemical Toxicology* **24**, 495–496.
- Luzzati V.**, **Tardieu A.**, und **Gulik-Krzywicki. (1968a)**, Polymorphism of Lipids. *Nature* **217**, 1028–1030.
- Luzzati V.**, **Tardieu A.**, **Gulik-Krzywicki T.**, **Rivas E.**, und **Reiss-Husson F. (1968b)**, Structure of the Cubic Phases of Lipid–Water Systems. *Nature* **220**, 485–488.
- Lv H.**, **Zhang S.**, **Wang B.**, **Cui S.**, und **Yan J. (2006)**, Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *Journal of Controlled Release* **114**, 100–109.
- Maitra A. (2005)**, Calcium phosphate nanoparticles: second-generation nonviral vectors in gene therapy. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **5**, 893–905.
- Majzoub R. N.**, **Ewert K. K.**, und **Safinya C. R. (2016)**, Cationic liposome–nucleic acid nanoparticle assemblies with applications in gene delivery and gene silencing. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **374**, 20150129.
- Marsh D. (2013)**, *Handbook of Lipid Bilayers*. CRC Press, Boca Raton.
- Marshall E. (2002)**, What to Do When Clear Success Comes With an Unclear Risk? *Science* **298**, 510.
- Mehier-Humbert S.** und **Guy R. H. (2005)**, Physical methods for gene transfer: Improving the kinetics of gene delivery into cells. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 733–753.

- Merdan T.**, Kopeček J., und Kissel T. (2002), Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**, 715–758.
- Miller A. D.** (1998), Cationic Liposomes for Gene Therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 1768–1785.
- Mohanty R.**, Chowdhury, Chitran, Roy, Arega S., Sen P., Ganguly P., und Ganguly N. (2019), CAR T cell therapy: A new era for cancer treatment (Review). *Oncol Rep* **42**, 2183–2195.
- Monteiro N.**, Martins A., Ribeiro D., Faria S., Fonseca N. A., Moreira J. N., Reis R. L., und Neves N. M. (2015), On the use of dexamethasone-loaded liposomes to induce the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* **9**, 1056–1066.
- Müller V.**, Hinaut A., Moradi M., Baljovic M., Jung T. A., Shahgaldian P., Möhwald H., Hofer G., Kröger M., King B. T., Meyer E., Glatzel T., und Schlüter A. D. (2018), A Two-Dimensional Polymer Synthesized at the Air/Water Interface. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 10584–10588.
- Mulligan M. J.**, Lyke K. E., Kitchin N., Absalon J., Gurtman A., Lockhart S., Neuzil K., Raabe V., Bailey R., Swanson K. A., Li P., Koury K., Kalina W., Cooper D., Fontes-Garfias C., Shi P.-Y., Türeci Ö., Tompkins K. R., Walsh E. E., Frenck R., Falsey A. R., Dormitzer P. R., Gruber W. C., Şahin Ü., und Jansen K. U. (2020), Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature* **586**, 589–593.
- Murray D. J.**, Patterson D. D., Payamyar P., Bhola R., Song W., Lackinger M., Schlüter A. D., und King B. T. (2015), Large Area Synthesis of a Nanoporous Two-Dimensional Polymer at the Air/Water Interface. *Journal of the American Chemical Society* **137**, 3450–3453.
- Nayerossadat N.**, Maedeh T., und Ali P. (2012), Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced Biomedical Research* **1**, 27.
- Neumann E.**, Schaefer-Ridder M., Wang Y., und Hofschneider P. H. (1982), Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO Journal* **1**, 841–845.
- O'Connor T. P.** und Crystal R. G. (2006), Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nature Reviews Genetics* **7**, 261–276.
- Pack D. W.**, Hoffman A. S., Pun S., und Stayton P. S. (2005), Design and development of polymers for gene delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* **4**, 581–593.
- Park J.**, Lutz R., Felszeghy E., Wiltfang J., Nkenke E., Neukam F. W., und Schlegel K. A. (2007), The effect on bone regeneration of a liposomal vector to deliver BMP-2 gene to bone grafts in peri-implant bone defects. *Biomaterials* **28**, 2772–2782.
- Payamyar P.**, Kaja K., Ruiz-Vargas C., Stemmer A., Murray D. J., Johnson C. J., King B. T., Schiffmann F., VandeVondele J., Renn A., Götzinger S., Ceroni P., Schütz A., Lee L.-T., Zheng Z., Sakamoto J., und Schlüter A. D. (2014), Synthesis of a Covalent Monolayer Sheet by Photochemical Anthracene Dimerization at the Air/Water Interface and its Mechanical Characterization by AFM Indentation. *Adv. Mater.* **26**, 2052–2058.
- PEI (2020)**, Gentherapie. <https://www.pei.de/DE/arzneimittel/atmp/gentherapie/gentherapie-node.html>.
- Prokopovich P.**, ed. (2016), *Biological and Pharmaceutical Applications of Nanomaterials*. CRC Press.

- Rädler J. O.**, Koltover I., Salditt T., und Safinya C. R. (1997), Structure of DNA-Cationic Liposome Complexes: DNA Intercalation in Multilamellar Membranes in Distinct Interhelical Packing Regimes. *Science* **275**, 810.
- Rayleigh (1891)**, Surface Tension. *Nature* **43**, 437–439.
- Rodríguez S.D.**, Montoro C., und Zamora F. (2020), Covalent organic framework nanosheets: preparation, properties and applications. *Chemical Society Reviews* **49**, 2291–2302.
- Sadava D.**, Hillis D. M., Heller H. C., Hacker S. D., Markl J., eds. (2019), *Purves Biologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Sadelain M.** (2004), Insertional oncogenesis in gene therapy: how much of a risk? *Gene Therapy* **11**, 569–573.
- Sahin U.**, Karikó K., und Türeci Ö. (2014), mRNA-based therapeutics — developing a new class of drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* **13**, 759–780.
- Sakamoto J.**, van Heijst J., Lukin O., und Schlüter A. D. (2009), Two-Dimensional Polymers: Just a Dream of Synthetic Chemists? *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 1030–1069.
- Sakamoto R.**, Takada K., Pal T., Maeda H., Kambe T., und Nishihara H. (2017), Coordination nanosheets (CONASHs): strategies, structures and functions. *Chemical Communications* **53**, 5781–5801.
- Salgado A. J.**, Coutinho O. P., und Reis R. L. (2004), Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. *Macromol. Biosci.* **4**, 743–765.
- Šatkauskas S.**, André F., Bureau M. F., Scherman D., Miklavčič D., und Mir L. M. (2005), Electrophoretic Component of Electric Pulses Determines the Efficacy of In Vivo DNA Electrotransfer. *Human Gene Therapy* **16**, 1194–1201.
- Schendel K. U.**, Erdinger L., Komposch G., und Sonntag H.-G. (1994), Untersuchung kieferorthopädischer Materialien im HET-CAM-Test auf schleimhautreizende Wirkung. *Fortschritte der Kieferorthopädie* **55**, 28–35.
- Schlake T.**, Thess A., Thran M., und Jordan I. (2019a), mRNA as novel technology for passive immunotherapy. *Cellular and Molecular Life Sciences* **76**, 301–328.
- Schlake T.**, Thran M., Fiedler K., Heidenreich R., Petsch B., und Fotin-Mleczek M. (2019b), mRNA: A Novel Avenue to Antibody Therapy? *Molecular Therapy* **27**, 773–784.
- Schulze I. C.** (2006), Synthese von Lipiden für die liposomale Gentransfektion. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, Halle (Saale).
- Semple S. C.**, Akinc A., Chen J., Sandhu A. P., Mui B. L., Cho C. K., Sah D. W. Y., Stebbing D., Crosley E. J., Yaworski E., Hafez I. M., Dorkin J. R., Qin J., Lam K., Rajeev K. G., Wong K. F., Jeffs L. B., Nechev L., Eisenhardt M. L., Jayaraman M., Kazem M., Maier M. A., Srinivasulu M., Weinstein M. J., Chen Q., Alvarez R., Barros S. A., De S., Klimuk S. K., Borland T., Kosovrasti V., Cantley W. L., Tam Y. K., Manoharan M., Ciufolini M. A., Tracy M. A., Fougerolles A. de, MacLachlan I., Cullis P. R., Madden T. D., und Hope M. J. (2010), Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nature Biotechnology* **28**, 172–176.
- Sessa G.** und Weissmann G. (1968), Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *Journal of Lipid Research* **9**, 310–318.
- Setten R. L.**, Rossi J. J., und Han S. (2019), The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* **18**, 421–446.

- Sieber S.**, Grossen P., Bussmann J., Campbell F., Kros A., Witzigmann D., und Huwyler J. (2019), Zebrafish as a preclinical in vivo screening model for nanomedicines. *Advanced Drug Delivery Reviews* **151-152**, 152–168.
- Srinivas R.**, Samanta S., und Chaudhuri A. (2009), Cationic amphiphiles: promising carriers of genetic materials in gene therapy. *Chemical Society Reviews* **38**, 3326–3338.
- Stefaniu C.** und Brezesinski G. (2014a), Grazing incidence X-ray diffraction studies of condensed double-chain phospholipid monolayers formed at the soft air/water interface. *Advances in Colloid and Interface Science* **207**, 265–279.
- Stefaniu C.** und Brezesinski G. (2014b), X-ray investigation of monolayers formed at the soft air/water interface. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **19**, 216–227.
- Stefaniu C.**, Brezesinski G., and Möhwald H. (2014), Langmuir monolayers as models to study processes at membrane surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science* **208**, 197–213.
- Stefaniu C.**, Latza V. M., Gutowski O., Fontaine P., Brezesinski G., und Schneck E. (2019), Headgroup-Ordered Monolayers of Uncharged Glycolipids Exhibit Selective Interactions with Ions. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **10**, 1684–1690.
- Sung Y. K.** und Kim S. W. (2019), Recent advances in the development of gene delivery systems. *Biomaterials Research* **23**, 8.
- Symietz C.**, Schneider M., Brezesinski G., und Möhwald H. (2004), DNA Alignment at Cationic Lipid Monolayers at the Air/Water Interface. *Macromolecules* **37**, 3865–3873.
- Taniyama Y.**, Tachibana K., Hiraoka K., Aoki M., Yamamoto S., Matsumoto K., Nakamura T., Ogihara T., Kaneda Y., und Morishita R. (2002), Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Therapy* **9**, 372–380.
- Tenchov B. G.**, Wang L., Koynova R., und MacDonald R. C. (2008), Modulation of a membrane lipid lamellar–nonlamellar phase transition by cationic lipids: A measure for transfection efficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1778**, 2405–2412.
- Tschierske C.** (2013), Development of Structural Complexity by Liquid-Crystal Self-assembly. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 8828–8878.
- van der Woude I.**, Wagenaar A., Meekel A. A. P., Beest M. B. A. ter, Ruiters M. H. J., Engberts, Jan B. F. N., und Hoekstra D. (1997), Novel pyridinium surfactants for efficient, nontoxic & in vitro gene delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 1160.
- Villemejeane J.** and Mir L. M. (2009), Physical methods of nucleic acid transfer: general concepts and applications. *British journal of pharmacology* **157**, 207–219.
- Walther W.**, Fichtner I., Schlag P. M., und Stein U. S. (2009), Nonviral Jet-Injection Technology for Intratumoral In Vivo Gene Transfer of Naked DNA. In: *Gene Therapy of Cancer: Methods and Protocols* (Walther W. and Stein U. S., eds.). Humana Press, Totowa, NJ, pp. 195–208.
- Walther W.**, Stein U., Fichtner I., Kobelt D., Aumann J., Arlt F., und Schlag P. M. (2005), Nonviral Jet-Injection Gene Transfer for Efficient in Vivo Cytosine Deaminase Suicide Gene Therapy of Colon Carcinoma. *Molecular Therapy* **12**, 1176–1184.

- Williams R. J., Phillips J. N., and Mysels K. J. (1955)**, The critical micelle concentration of sodium lauryl sulphate at 25° C. *Transactions of the Faraday Society* **51**, 728–737.
- Wölk C. (2010)**, Synthese und Charakterisierung von Lysin-haltigen Malonamiden als kationische Lipide für die Gentransfektion. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, Halle (Saale).
- Wölk C. (2014)**, Kationische Lipide für den Gentransfer - Synthese und Characterisierung neuer Lipide auf Malonamidbasis sowie Beiträge zur Untersuchung des Aggregationsverhaltens im wässrigen Milieu. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, Halle (Saale).
- Wölk C., Drescher S., Meister A., Blume A., Langner A., und Dobner B. (2013)**, General Synthesis and Physicochemical Characterisation of a Series of Peptide-Mimic Lysine-Based Amino-Functionalised Lipids. *Chem. Eur. J.* **19**, 12824–12838.
- Wölk C., Heinze M., Kreideweiß P., Dittrich M., Brezesinski G., Langner A., und Dobner B. (2011)**, Synthesis and DNA transfection properties of new head group modified malonic acid diamides. *International Journal of Pharmaceutics* **409**, 46–56.
- Wölk C., Janich C., Meister A., Drescher S., Langner A., Brezesinski G., and Bakowsky U. (2015)**, Investigation of Binary Lipid Mixtures of a Three-Chain Cationic Lipid with Phospholipids Suitable for Gene Delivery. *Bioconjugate Chemistry* **26**, 2461–2473.
- Xiang Z., Cao D., and Dai L. (2015)**, Well-defined two dimensional covalent organic polymers: rational design, controlled syntheses, and potential applications. *Polymer Chemistry* **6**, 1896–1911.
- Xu Y. und Szoka F. C. (1996)**, Mechanism of DNA Release from Cationic Liposome/DNA Complexes Used in Cell Transfection. *Biochemistry* **35**, 5616–5623.
- Yan J., Berezhnoy N. V., Korolev N., Su C.-J., und Nordenskiöld L. (2012)**, Structure and internal organization of overcharged cationic-lipid/peptide/DNA self-assembly complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1818**, 1794–1800.
- Zelphati O. und Szoka F. C. (1996)**, Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 11493.
- Zhang N., Wang T., Wu X., Jiang C., Chen F., Bai W., und Bai R. (2018)**, Self-exfoliation of 2D covalent organic frameworks: morphology transformation induced by solvent polarity. *RSC Advances* **8**, 3803–3808.
- Zhang P. und Wagner E. (2017)**, History of Polymeric Gene Delivery Systems. *Topics in Current Chemistry* **375**, 26.
- Zhang X., Dai L., Wang A., Wölk C., Dobner B., Brezesinski G., Tang Y., Wang X., und Li J. (2015)**, The Directional Observation of Highly Dynamic Membrane Tubule Formation Induced by Engulfed Liposomes. *Scientific Reports* **5**, 16559.
- Zidovska A., Evans H. M., Ahmad A., Ewert K. K., und Safinya C. R. (2009a)**, The Role of Cholesterol and Structurally Related Molecules in Enhancing Transfection of Cationic Liposome–DNA Complexes. *The Journal of Physical Chemistry B* **113**, 5208–5216.
- Zidovska A., Evans H. M., Ewert K. K., Quispe J., Carragher B., Potter C. S., und Safinya C. R. (2009b)**, Liquid Crystalline Phases of Dendritic Lipid–DNA Self-Assemblies: Lamellar, Hexagonal, and DNA Bundles. *The Journal of Physical Chemistry B* **113**, 3694–3703.

- Zuhorn I. S., Bakowsky U., Polushkin E., Visser W. H., Stuart M. C., Engberts J. B., and Hoekstra D. (2005)**, Nonbilayer phase of lipoplex–membrane mixture determines endosomal escape of genetic cargo and transfection efficiency. *Molecular Therapy* **11**, 801–810.
- Zuhorn I. S., Oberle V., Visser W. H., Engberts J. B., Bakowsky U., Polushkin E., and Hoekstra D. (2002a)**, Phase Behavior of Cationic Amphiphiles and Their Mixtures with Helper Lipid Influences Lipoplex Shape, DNA Translocation, and Transfection Efficiency. *Biophysical Journal* **83**, 2096–2108.
- Zuhorn I. S., Visser W. H., Bakowsky U., Engberts J. B., and Hoekstra D. (2002b)**, Interference of serum with lipoplex–cell interaction: modulation of intracellular processing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1560**, 25–36.

10 Lebenslauf

Geburtsdatum: 20 Mai 1984, Wolmirstedt (Sachsen-Anhalt, Deutschland)

Familienstatus: -

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Akademische Ausbildung

11/2014 **Disputation, Dr. rer. nat - Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (MLU Halle-Wittenberg)**

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

04/2010 **Diplom Pharmazeut, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

Titel: Synthese und Charakterisierung von Lysin-haltigen Malonamiden als kationische Lipide für die Gentransfektion, Verteidigt an der MLU Halle-Wittenberg

12/2009 **Approbation als Apotheker**

10/2004-09/2008 **Pharmaziestudium, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Deutschland)**

08/1996-07/2003 **Hochschulreife (Abitur), Kurfürst-Joachim-Friedrich-Gymnasium Wolmirstedt (Deutschland)**

Wissenschaftliche Karriere

Seit 11.2019 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Universität Leipzig, Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Technologie**

07/2015-/10.2019 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie**

04/2015-11/2015 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Philipps University Marburg, Institut für Pharmazeutische Technologie and Biopharmazie**

11/2014-03/2015 **Postdoc, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie**

04/2011-11/2014 **Doktorand, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie**

11/2009-03/2011 **Graduiertenstipendiat des Landes Sachsen-Anhalt, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie**

10/2008-04/2009 **Hilfswissenschaftler, Max Planck Institute für Kolloid- und Grenzflächenforschung**

11 Veröffentlichte Originalarbeiten

Research articles		
#	Jahr	Publikationen (Corresponding Authors sind mit * gekennzeichnet)
38	2021	M.U. Amin, S. Ali, I. Tariq, M.Y. Ali, S.R. Pinnapreddy, E. Preis, C. Wölk, R.D. Harvey, G. Hause, J. Brüßler, U. Bakowsky*. <i>Ultrasound-Responsive Smart Drug Delivery System of Lipid Coated Mesoporous Silica Nanoparticles</i> . Pharmaceutics DOI 10.3390/pharmaceutics13091396
37	2021	J. Roerig, L. Schiller, H. Kalwa, G. Hause, C. Vissiennon, M.C. Hacker, C. Wölk, M. Schulz-Siegmund*. <i>A focus on critical aspects of uptake and transport of milk-derived extracellular vesicles across the Caco-2 intestinal barrier model</i> . European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 166, 61-74
36	2021	M.U. Amin, S. Ali, M.Y. Ali, I. Tariq, U. Nasrullah, S.R. Pinnapreddy, C. Wölk, U. Bakowsky, J. Brüßler*. <i>Enhanced efficacy and drug delivery with lipid coated mesoporous silica nanoparticles in cancer therapy</i> . European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 165, 31-40
35	2021	R. Rehal, R.D. Barker, Z. Lu, T.T. Bui, B. Demé, G. Hause, C. Wölk*, R.D. Harvey*. <i>Lipid domain formation and non-lamellar structures associated with varied lysylphosphatidylglycerol analogue content in a model Staphylococcal plasma membrane</i> , Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes 1863, 183571
34	2020	C. Husteden, F. Doberenz, N. Goergen, S.R. Pinnapreddy, C. Janich, A. Langner, F. Syrowatka, A. Repanas, F. Erdmann, J. Jedelská, U. Bakowsky, T. Groth, C. Wölk*. <i>Contact-Triggered Lipofection from Multilayer Films Designed as Surfaces for in Situ Transfection Strategies in Tissue Engineering</i> . ACS Applied Materials and Interfaces 12, 8963–8977.
33	2020	S.R. Pinnapreddy, J. Giselsbrecht, B. Strehlow, C. Janich, C. Husteden, A. Meister, H. Loppnow, D. Sedding, F. Erdmann, G. Hause, G. Brezesinski, T. Groth, A. Langner, U. Bakowsky*, C. Wölk*: <i>A triple chain polycationic peptide-mimicking amphiphile – efficient DNA-transfer without co-lipids</i> . Biomaterial Science 8, 232-249.
32	2020	S. Ali, M.U. Amin, M. Yasir, A.I. Tariq, S.R. Pinnapreddy, L. Duse, N. Goergen, C. Wölk, G. Hause, J. Jedelská, J. Schäfer, U. Bakowsky*: <i>Wavelength dependent photocytotoxicity to ovarian carcinoma cells using temoporfin loaded tetraether liposomes as efficient drug delivery system</i> . European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 150, 50-65.
31	2020	C. Wölk, H.A. Nawaz, I. Maqsood, F. Strati, G. Brezesinski, G. Hause, M. Schulz-Siegmund, M.C. Hacker*. <i>Amphiphilic Functionalized Oligomers: A Promising Strategy for the Postfabrication Functionalization of Liposomes</i> . Advanced Materials Interfaces 7, 2001168.
30	2020	M. Alawak, G. Mahmoud, A.A. Dayyih, L. Duse, S.R. Pinnapreddy, K. Engelhardt, I. Awak, C. Wölk, A.M. König, J. Brüßler, U. Bakowsky*: <i>Magnetic resonance activatable thermosensitive liposomes for controlled doxorubicin delivery</i> . Materials Science and Engineering: C 115, 111116.
29	2020	C. Janich*, D. Ivanusic, J. Giselsbrecht, E. Janich, S.R. Pinnapreddy, G. Hause, U. Bakowsky, A. Langner*, C. Wölk: <i>Efficient Transfection of Large Plasmids Encoding HIV-1 into Human Cells—A High Potential Transfection System Based on a Peptide Mimicking Cationic Lipid</i> . Pharmaceutics 12, 805.

28	2020	Y.A. Brito Barrera, G. Hause, M. Menzel, C.E.H. Schmelzer, E. Lehner, K. Mäder, C. Wölk, T. Groth*: <i>Engineering osteogenic microenvironments by combination of multilayers from collagen type I and chondroitin sulfate with novel cationic liposomes. Materials Today Bio 7, 100071.</i>
27	2020	J.J. Schüer, A. Arndt, C. Wölk, S.R. Pinnapireddy, Udo Bakowsky*: <i>Establishment of a Synthetic In Vitro Lung Surfactant Model for Particle Interaction Studies on a Langmuir Film Balance. Langmuir 36, 4808–4819.</i>
26	2020	C. Wölk*, H. Youssef, T. Guttenberg, H. Marbach, G. Vizcay-Barrena, C. Shen, G. Brezesinski, R.D. Harvey*: <i>Phase Diagram for a Lysyl-Phosphatidylglycerol Analogue in Biomimetic Mixed Monolayers with Phosphatidylglycerol: Insights into the Tunable Properties of Bacterial Membranes. ChemPhysChem 21, 702-706</i>
25	2020	J.J. Schüer, C. Wölk, U. Bakowsky, S.R. Pinnapireddy*: <i>Comparison of Tanaka lipid mixture with natural surfactant Alveofact to study nanoparticle interactions on Langmuir film balance. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 188, 110750.</i>
24	2019	C. Stefaniu*, C. Wölk, G. Brezesinski, E. Schneck: <i>Relationship between structure and molecular interactions in monolayers of specially designed aminolipids. Nanoscale Advances 1, 3529-3536.</i>
23	2019	C. Wölk, G. Hause, O. Gutowski, R.D. Harvey*, G. Brezesinski: <i>Enhanced chain packing achieved via putative headgroup ion-triplet formation in binary anionic lipid/cationic surfactant mixed monolayers. Chemistry and Physics of Lipids 225, 104827.</i>
22	2019	D. Pawlowska, C. Janich, A. Langner, B. Dobner, C. Wölk*, G. Brezesinski: <i>The Impact of Alkyl-Chain Purity on Lipid-Based Nucleic Acid Delivery Systems – Is the Utilization of Lipid Components with Technical Grade Justified? ChemPhysChem 20, 2110-2121.</i>
21	2019	J. Giselbrecht, S. Wiedemann, S. Reddy Pinnapireddy, N. Goergen, H. Loppnow, D. Sedding, F. Erdmann, U. Bakowsky, G. Hause, M. Lúcio, A. Langner, C. Wölk*: <i>Nucleic acid carrier composed of a branched fatty acid lysine conjugate—Interaction studies with blood components. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 184, 110547.</i>
20	2019	S. Tassler, B. Dobner, L. Lampp, R. Ziólkowski, E. Malinowska, C. Wölk*, G. Brezesinski: <i>DNA Delivery Systems Based on Peptide-Mimicking Cationic Lipids—The Effect of the Co-Lipid on the Structure and DNA Binding Capacity. Langmuir 35, 4613-4625.</i>
19	2018	M. Dittrich, C. Brauer, S.S. Funari, B. Dobner, G. Brezesinski*, C. Wölk*: <i>Interactions of Cationic Lipids with DNA – a Structural Approach. Langmuir 34, 14858-14868.</i>
18	2018	M. Schmid, C. Wölk*, J. Giselbrecht, K.L.A. Chan, R.D. Harvey: <i>A combined FTIR and DSC study on the bilayer-stabilising effect of electrostatic interactions in ion paired lipids. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 169, 298-394.</i>
17	2018	S. Tassler, D. Pawlowska, C. Janich, J. Giselbrecht, S. Drescher, A. Langner, C. Wölk*, G. Brezesinski*: <i>Lysine-based amino-functionalized lipids for gene transfection: the influence of chain composition on 3D phase behaviour and transfection performance. Physical Chemistry Chemical Physics 20, 17393-17405.</i>
16	2018	J. Giselbrecht, C. Janich, S.R. Pinnapireddy, G. Hause, U. Bakowsky, C. Wölk*, A. Langner: <i>Overcoming the polycation dilemma - Explorative studies to characterise the efficiency and biocompatibility of newly designed lipofection reagents. International Journal of Pharmaceutics 541, 81-92.</i>
15	2018	S. Tassler, D. Pawlowska, C. Janich, B. Dobner, C. Wölk, G. Brezesinski*: <i>Lysine-based amino-functionalized lipids for gene transfection: the influence of chain composition on 2D properties. Physical Chemistry Chemical Physics 20, 6936-6944.</i>

14	2017	C. Janich, A. Hädicke, U. Bakowsky, G. Brezesinski, C. Wölk*: <i>Interaction of DNA with Cationic Lipid Mixtures—Investigation at Langmuir Lipid Monolayers</i> . Langmuir 33, 10172-10183
13	2017	S. Tassler, C. Wölk, C. Janich, B. Dobner, G. Brezesinski*: <i>Lysine-based amino-functionalized lipids for gene transfection: the protonation state in monolayers at the air–liquid interface</i> . Physical Chemistry Chemical Physics 19, 20271-20280.
12	2017	C. Janich, S.R. Pinnapireddy, F. Erdmann, T. Groth, A. Langner, U. Bakowsky*, C. Wölk: <i>Fast therapeutic DNA internalization – a high potential transfection system based on a peptide mimicking cationic lipid</i> . European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 118, 38-47.
11	2016	C. Janich*, S. Taßler, A. Meister, G. Hause, J. Schäfer, U. Bakowsky, G. Brezesinski, C. Wölk*: <i>Structures of malonic acid diamide/phospholipid composites and their lipoplexes</i> . Soft Matter 12, 5854-5866.
10	2015	C. Janich, C. Wölk, F. Erdmann, T. Groth, G. Brezesinski, B. Dobner, A. Langner*: <i>Composites of malonic acid diamides and phospholipids — Impact of lipoplex stability on transfection efficiency</i> . Journal of Controlled Release 220, 295–307.
9	2015	C. Wölk*, C. Janich, A. Meister, S. Drescher, A. Langner, G. Brezesinski, U. Bakowsky: <i>Investigation of Binary Lipid Mixtures of a Three-Chain Cationic Lipid with Phospholipids Suitable for Gene Delivery</i> . Bioconjugate Chemistry 26, 2461–2473.
8	2015	X. Zhang, L. Dai, A. Wang, C. Wölk, B. Dobner, G. Brezesinski, Y. Tang, X. Wang, J. Li*: <i>The Directional Observation of Highly Dynamic Membrane Tubules Formation Induced by Engulfed Liposomes</i> . Scientific Reports 5, Art. Num. 16559
7	2015	N. Erdmann, C. Wölk*, I. Schulze, C. Janich, M. Folz, S. Drescher, M. Dittrich, A. Meister, J. Vogel, T. Groth, B. Dobner*, A. Langner. <i>Tris(2-aminoethyl)-amine-based α-branched fatty acid amides – Synthesis of lipids and comparative study of transfection efficiency of their lipid formulations</i> . European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 96, 349-362.
6	2015	C. Wölk*, C. Janich, D. Pawlowska, S. Drescher, A. Meister, G. Hause, B. Dobner, A. Langner, G. Brezesinski: <i>Lamellar versus Micellar Structures - Aggregation Behaviour of a Three-Chain Cationic Lipid Designed for Nonviral Polynucleotide Transfer</i> . ChemPhysChem 16, 2115-2126. ChemPhysChem 16, 2029. (Cover Profile)
5	2014	C. Janich, C. Wölk, S. Taßler, S. Drescher, A. Meister, G. Brezesinski, B. Dobner, A. Langner*: <i>Composites of malonic acid diamides and phospholipids - structural parameters for optimal transfection efficiency in A549 cells</i> . European Journal of Lipid Science and Technology 116, 1205-1216.
4	2014	C. Wölk*, D. Pawlowska, S. Drescher, A. Auerswald, A. Meister, G. Hause, A. Blume, A. Langner, G. Brezesinski, B. Dobner*: <i>New micellar transfection agents</i> . Langmuir 30, 4905–4915.
3	2013	C. Wölk, S. Drescher, A. Meister, A. Blume, A. Langner, B. Dobner*: <i>General Synthesis and Physico-Chemical Characterisation of a Series of Peptide-Mimic Lysine-Based Amino-Functionalised Lipids</i> . Chemistry – a European Journal 19, 12824-12838
2	2011	M. Dittrich*, M. Heinze, C. Wölk, S. S. Funari, B. Dobner, H. Möhwald, G. Brezesinski*. <i>Structure-Function Relationships of New Lipids Designed for DNA Transfection</i> . ChemPhysChem 12, 2328-2337.

1	2011	C. Wölk, M. Heinze, P. Kreideweiß, M. Dittrich, G. Brezesinski, A. Langner, B. Dobner*. <i>Synthesis and DNA transfection properties of new head group modified malonic acid diamides</i> . International Journal of Pharmaceutics 409, 46-56.
Reviewartikel		
2	2021	C. Husteden, T. Groth, C. Wölk* Implantatüberzüge für die in situ-Transfektion in der regenerativen Medizin Biospektrum 27, 445.
1	2017	C. Wölk*, C. Janich, U. Bakowsky, A. Langner, G. Brezesinski* <i>Malonic acid based cationic lipids – The way to highly efficient DNA-carriers</i> . Advances in Colloid and Interface Science 248, 20-34.
Buchkapitel		
1	2019	C. Wölk and R.D. Harvey: Chapter 8.1 " <i>Lipid-Based Nanosystems for Gene and Drug Co-Delivery in Cancer Therapy</i> " in review volume "Functional Lipid Nanosystems in Cancer", Pan Stanford Publishing, accepted

12 Danksagung

Der Umfang so einer Arbeit kann nicht alleine entstehen, weshalb ich einigen Menschen danksagen möchte.

In erster Linie danke ich Herrn Prof. Andreas Langner, da er mir alle Freiheiten gegeben hat meinen Weg selbstständig zu gehen. Sie sind einer der integersten und ehrlichsten Menschen die ich kenne. Ich danke Prof. Udo Bakowsky für die Anstellung nachdem meine Stelle in Halle auslief. Daraus ist eine wunderbare Dauerkooperation entstanden und eine Beziehung über die rein berufliche Ebene hinaus. Ich danke Professor Bodo Dobner, auch wenn ich bei der Habilitationsarbeit frei von ihm agierte ist er doch ein Kollege der immer für einen da war. Ich danke Professor Gerald Brezesinski für die vielen schönen Diskussionen, privaten Gespräche und für die Einführung in die Physikochemie. Durch ihn habe ich viel gelernt und heute ein unglaublich gutes Netzwerk an Partnern und Freunden aus dem Bereich der Biophysik. Auch bei Prof. Thomas Groth muss ich mich bedanken. Er ist zu einem effektiven Kooperationspartner geworden und in jüngster Zeit auch ein hervorragender Mentor. Weiterhin ist er der einzige Mensch den ich kenne, der ein Gespräch immer mit einer Frage nach dem privaten Befinden beginnt und einem so vor Augen führt, das es viele wichtige Sachen im Leben gibt.

Nun möchte ich mich bei denen bedanken, die mit mir gelitten haben, mit denen ich aber auch wunderbare Momente geteilt haben. Dr. Christopher Janich, er war nicht nur der erste Doktorand den ich betreute, er ist heute sogar einer meiner besten Freunde. Julia Giselbrecht, meine Doktorandin die sich auch immer wieder in neue Methoden einarbeiten musste, nachdem ich mit einer neuen Idee kam. Julia, du warst eine tolle Doktorandin. Und ich denke wir haben in der gemeinsamen Zeit das Maximum rausgeholt. Außerdem war es toll zu sehen wie du an Selbstbewusstsein gewonnen hast. Catharina Husteden, der ich danken muss, dass sie sich so spontan auf die Diplomstelle gemeldet hat. Weiterhin hat sie einen London-Erasmus-Austausch abgesagt um die DFG-Stelle bei mir anzutreten. Wir haben gemeinsam viel erreicht auf dem Gebiet der Entwicklung der *In-situ*-Transfektionssysteme. Und du hast dich hervorragend geschlagen bei der Einarbeitung in dieses neue Arbeitsfeld. Ich freue mich sehr auf das letzte Jahr deiner Arbeit. Ich möchte mich auch bei all den Diplomstudenten bedanken die uns unterstützt haben

Weiterhin habe ich weitere Bekanntschaften gemacht, die ich nicht missen möchte. Dr. Richard Harvey und Prof. Lea Ann Daily. Beide sind unfassbar offene Menschen. Dr. Harvey ist nicht nur ein guter Kooperationspartner geworden, sondern wir haben mit der Zeit eine Freundschaft aufgebaut. Danke Richard für die unfassbar tollen Gespräche, auch über Wissenschaft hinaus, gerade während der Zeiten am Synchrotron. In diesem Zusammenhang möchte ich dem ganzen „smart team“ an der Beamline danken, Richard, Dr. Gianluca Bello und Dr. Chen Shen, eine tolle Zeit. Ich danke Fabio Strati für die Hilfe wenn Not am Mann war. Und die Leute vom Max Planck Institut: Dr. Dorothea Pawlowska, Dr. Stephanie Tassler, Dr. Cristina Stephaniu. Dank an Dr. Gerd Hause, der immer, wirklich immer, da war wenn man TEM Aufnahmen brauchte. Dank an Prof. Karsten Mäder für die Unterstützung, als Herr Prof. Langner ausfiel. Das war so unkompliziert. Danke PD Dr. Frank Erdmann, für die Unterstützung im molekularbiologischen Bereich. Dank der Gruppe von Thomas Groth, die immer geholfen hat wenn wir neue Fragen hatten. Danke auch PD Dr. Simon Drescher und seiner Gruppe, auch wenn es immer mal Meinungsverschiedenheiten gab, hatten wir doch auch eine sehr schöne Zeit. Danke auch Dr. Schaschank Pinnapireddy, Julia Schüer, und Dr. Jarmilla Jardelska für die Laborunterstützung in Marburg sowie den anderen Mitarbeitern die uns geholfen haben. Dank auch an Dr. Jeroen Bussman, der sich auf die Kooperation mit mir eingelassen hat und der Julias Experimente am Zebrafisch ermöglichte.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, und da vor allem meiner Frau Nicole und meiner beiden Kinder Paul und Ella. Beide Kinder sind während der Habilitationsphase geboren, und ich bin mir bewusst, dass ich das ein oder andere Mal viel Zeit in die Arbeit gesteckt habe, in der meine Frau alleine für die Familie da war. Danke Nicole, dass du immer versucht hast mir den Rücken frei zu halten. Und danke Ella und Paul, dass ihr immer meine Aufmerksamkeit auf euch gerichtet habt und mir gezeigt habt das es auch Bereiche jenseits der Arbeit gibt.

Letztendlich möchte ich mich bei allen bedanken die auch hier stehen müssten, die vielen Kontakte die ich in der Zeit hatte, welche hier aber keine Erwähnung fanden.

13 Erklärung

Hiermit erkläre ich, Dr. Christian Wölk, an Eides statt, dass die vorliegende Habilitationsschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht wurden. Weiterhin versichere ich, dass ich diese Arbeit an keiner anderen Universität oder Hochschule im In- und Ausland vorgelegt habe.

Dr. Christian Wölk

Leipzig im August 2021

14 Anhang 1 - Artikel 1

C. Wölk*, C. Janich, U. Bakowsky, A. Langner, G. Brezesinski: *Malonic acid based cationic lipids – The way to highly efficient DNA-carriers*. **Advances in Colloid and Interface Science** 2017 (248), p. 20-34, DOI 10.1016/j.cis.2017.08.003

<https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.08.003>

15 Anhang 2 - Artikel 2

M. Dittrich, C. Brauer, S.S. Funari, B. Dobner, G. Brezesinski, **C. Wölk***: *Interactions of Cationic Lipids with DNA – a Structural Approach*. **Langmuir** 2018 (34), p. 14858-14868, DOI 10.1021/acs.langmuir.8b01635

<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01635>

16 Anhang 3 - Artikel 3

D. Pawlowska, C. Janich, A. Langner, B. Dobner, C. Wölk*, G. Brezesinski: *The Impact of Alkyl-Chain Purity on Lipid-Based Nucleic Acid Delivery Systems – Is the Utilization of Lipid Components with Technical Grade Justified?* **ChemPhysChem** 2019 (20), p. 2110-2121, DOI 10.1002/cphc.201900480

<https://doi.org/10.1002/cphc.201900480>

17 Anhang 4 - Artikel 4

S. Tassler, C. Wölk, C. Janich, B. Dobner, G. Brezesinski: *Lysine-based amino-functionalized lipids for gene transfection: the protonation state in monolayers at the air-liquid interface*. **Physical Chemistry Chemical Physics** 2017 (19), p. 20271-20280, DOI 10.1039/C7CP03107F

<https://doi.org/10.1039/C7CP03107F>

18 Anhang 5 - Artikel 5

S. Tassler, D. Pawlowska, C. Janich, B. Dobner, C. Wölk, G. Brezesinski: *Lysine-based amino-functionalized lipids for gene transfection: the influence of chain composition on 2D properties*. **Physical Chemistry Chemical Physics** 2018 (20), p. 6936-6944, DOI 10.1039/C8CP00047F

<https://doi.org/10.1039/C8CP00047F>

19 Anhang 6 - Artikel 6

S. Tassler, D. Pawlowska, C. Janich, J. Giselbrecht, S. Drescher, A. Langner, **C. Wölk***, G. Brezesinski: *Lysine-based amino-functionalized lipids for gene transfection: the influence of chain composition on 3D phase behaviour and transfection performance*. **Physical Chemistry Chemical Physics** 2018 (20), p. 17393-17405, DOI 10.1039/C8CP01922C

<https://doi.org/10.1039/C8CP01922C>

20 Anhang 7 - Artikel 7

S. Tassler, B. Dobner, L. Lampp, R. Ziółkowski, E. Malinowska, **C. Wölk***, G. Brezesinski: *DNA Delivery Systems Based on Peptide-Mimicking Cationic Lipids—The Effect of the Co-Lipid on the Structure and DNA Binding Capacity*. **Langmuir** 2019 (35), 13, p. 4613-4625, DOI 10.1021/acs.langmuir.8b04139

<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b04139>

21 Anhang 8 - Artikel 8

J. Giselbrecht, C. Janich, S.R. Pinnapireddy, G. Hause, U. Bakowsky, **C. Wölk***, A. Langner: *Overcoming the polycation dilemma - Explorative studies to characterise the efficiency and biocompatibility of newly designed lipofection reagents.* **International Journal of Pharmaceutics** 2018 (541), p. 81-92, DOI 10.1016/j.ijpharm.2018.02.029

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.02.029>

22 Anhang 9 - Artikel 9

N. Erdmann, **C. Wölk***, I. Schulze, C. Janich, M. Folz, S. Drescher, M. Dittrich, A. Meister, J. Vogel, T. Groth, B. Dobner, A. Langner: *Tris(2-aminoethyl)-amine-based α -branched fatty acid amides – Synthesis of lipids and comparative study of transfection efficiency of their lipid formulations*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 2015 (96), p. 349-362, DOI 10.1016/j.ejpb.2015.08.011

<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.08.011>

23 Anhang 10 - Artikel 10

J. Giselbrecht, S. Wiedemann, S.R. Pinnapireddy, N. Goergen, H. Loppnow, D. Sedding, F. Erdmann, U. Bakowsky, G. Hause, M. Lúcio, A. Langner, **C. Wölk***: *Nucleic acid carrier composed of a branched fatty acid lysine conjugate—Interaction studies with blood components*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 2019 (184), p. 110547-110561, DOI 10.1016/j.colsurfb.2019.110547

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110547>

24 Anhang 11 - Artikel 11

C. Wölk*, C. Janich, D. Pawlowska, S. Drescher, A. Meister, G. Hause, B. Dobner, A. Langner, G. Brezesinski: *Lamellar versus Micellar Structures - Aggregation Behaviour of a Three-Chain Cationic Lipid Designed for Nonviral Polynucleotide Transfer*. **ChemPhysChem** 2015 (16), p. 2115-2126, DOI 10.1002/cphc.201500188

<https://doi.org/10.1002/cphc.201500188>

25 Anhang 12 - Artikel 12

S.R. Pinnapireddy, J. Giselbrecht, B. Strehlow, C. Janich, C. Husteden, A. Meister, H. Loppnow, D. Sedding, F. Erdmann, G. Hause, G. Brezesinski, T. Groth, A. Langner, U. Bakowsky, **C. Wölk***. *A triple chain polycationic peptide-mimicking amphiphile – efficient DNA-transfer without co-lipids*. **Biomaterial Science** 2020 (8), p. 232-249, DOI 10.1039/C9BM01093A

<https://doi.org/10.1039/C9BM01093A>

26 Anhang 13 - Artikel 13

C. Janich, C. Wölk, F. Erdmann, T. Groth, G. Brezesinski, B. Dobner, A. Langner: *Composites of malonic acid diamides and phospholipids — Impact of lipoplex stability on transfection efficiency*. **Journal of Controlled Release** 2015 (220), p. 295–307, DOI 10.1016/j.jconrel.2015.10.045

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.10.045>

27 Anhang 14 - Artikel 14

C. Janich, S. Taßler, A. Meister, G. Hause, J. Schäfer, U. Bakowsky, G. Brezesinski, **C. Wölk***: *Structures of malonic acid diamide/phospholipid composites and their lipoplexes*. **Soft Matter** 2016 (12), p. 5854-5866, DOI 10.1039/C6SM00807K

<https://doi.org/10.1039/C6SM00807K>

28 Anhang 15 - Artikel 15

C. Janich, A. Hädicke, U. Bakowsky, G. Brezesinski, **C. Wölk***: *Interaction of DNA with Cationic Lipid Mixtures—Investigation at Langmuir Lipid Monolayers*. **Langmuir** 2017 (33), p. 10172-10183, DOI 10.1021/acs.langmuir.7b02014

<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b02014>

29 Anhang 16 - Artikel 16

C. Husteden, F. Doberenz, N. Goergen, S. R. Pinnapireddy, C. Janich, A. Langner, F. Syrowatka, A. Repanas, F. Erdmann, J. Jedelská, U. Bakowsky, T. Groth, **C. Wölk***: *Contact-Triggered Lipofection from Multilayer Films Designed as Surfaces for In Situ Transfection Strategies in Tissue Engineering*. **ACS Applied Materials and Interfaces** 2020 (12), p. 8963-8977, DOI 10.1021/acsami.9b18968

<https://doi.org/10.1021/acsami.9b18968>

30 Anhang 17 - Artikel 17

Y.A. Brito Barrera, G. Hause, M. Menzel, C.E.H. Schmelzer, E. Lehner, K. Mäder, **C. Wölk**, T. Groth: *Engineering osteogenic microenvironments by combination of multilayers from collagen type I and chondroitin sulfate with novel cationic liposomes*. **Materials Today Bio** 2020 (7) p. 100071, DOI 10.1016/j.mtbio.2020.100071

<https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2020.100071>

31 Anhang 18 - Artikel 18

C. Stefaniu, C. Wölk, G. Brezesinski, E. Schneck: *Relationship between structure and molecular interactions in monolayers of specially designed aminolipids*. **Nanoscale Advances** 2019 (1), p. 3529-3536, DOI 10.1039/C9NA00355J

<https://doi.org/10.1039/C9NA00355J>