

über Celite filtriert. Der Filterkuchen wird mit Chloroform (30 mL) gewaschen, die vereinigten organischen Lösungsmittel werden im Vakuum entfernt, und das Produkt wird durch Säulenchromatographie gereinigt (Kieselgel, Ethylacetat:Hexan 1:9). Analysenreines Propiophenon wurde als farblose Flüssigkeit erhalten (193 mg, 90%).

Eingegangen am 20. Januar 1999 [Z 12941]  
International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1960–1962

**Stichwörter:** Aldehyde • Alkohole • Homogene Katalyse • Isomerisierungen • Ruthenium

- [1] Allgemeines zu Oxidationen: a) R. C. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH, New York, **1989**, S. 604; b) G. Procter in *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 7 (Hrsg.: B. M. Trost, I. Fleming, S. V. Ley), Pergamon, Oxford, **1991**, S. 305; c) S. V. Ley, A. Madin in *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 7 (Hrsg.: B. M. Trost, I. Fleming, S. V. Ley), Pergamon, Oxford, **1991**, S. 251; d) T. V. Lee in *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 7 (Hrsg.: B. M. Trost, I. Fleming, S. V. Ley), Pergamon, Oxford, **1991**, S. 291.
- [2] a) R. A. Sheldon, J. K. Kochi in *Metal-Catalyzed Oxidations of Organic Compounds*, Academic Press, New York, **1981**; b) S. V. Ley, J. Norman, W. P. Griffith, S. P. Marsden, *Synthesis* **1994**, 639; c) R. Noyori, S. Hashiguchi, *Acc. Chem. Res.* **1997**, 30, 97, zit. Lit.; d) S.-I. Murahashi, N. Komiya, *Catal. Today* **1998**, 41, 339.
- [3] a) R. A. Sheldon in *Dioxygen Activation and Homogeneous Catalytic Oxidation* (Hrsg.: L. L. Simandi), Elsevier, Amsterdam, **1991**, S. 573; b) B. R. James in *Dioxygen Activation and Homogeneous Catalytic Oxidation* (Hrsg.: L. L. Simandi), Elsevier, Amsterdam, **1991**, S. 195; c) A. K. Mandal, J. Iqbal, *Tetrahedron* **1997**, 53, 7641; d) T. Nishimura, T. Onoue, K. Ohe, S. Uemura, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 6011; e) A. Hanyu, E. Takezawa, S. Sakaguchi, Y. Ishii, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 5557; f) K. P. Peterson, R. C. Larock, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 3185.
- [4] a) I. E. Markó, P. R. Giles, M. Tsukazaki, S. Brown, C. J. Urch, *Science* **1996**, 274, 2044; b) I. E. Markó, M. Tsukazaki, P. R. Giles, S. M. Brown, C. J. Urch, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2297; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 2208; c) I. E. Markó, A. Gautier, I. Chellé-Regnaut, P. R. Giles, M. Tsukazaki, C. J. Urch, S. M. Brown, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 7576.
- [5] I. E. Markó, P. R. Giles, M. Tsukazaki, I. Chellé-Regnaut, C. J. Urch, S. M. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 12661.
- [6] Eine andere Arbeit über die TPAP-katalysierte aerobe Oxidation von Alkoholen: a) R. Lenz, S. V. Ley, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 3291; b) B. Hinzen, R. Lenz, S. V. Ley, *Synthesis* **1998**, 977. c) Eine hervorragende Übersicht über Ruthenium-katalysierte Reaktionen: T. Naota, H. Takaya, S.-I. Murahashi, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 2599.
- [7] a) H. C. Clark, H. Kurosawa, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1972**, 150; b) M. Krais, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1972**, 37, 460; c) Y. Lin, X. Zhu, Y. Zhou, *J. Organomet. Chem.* **1992**, 429, 269; d) T. Karlen, A. Ludi, *Helv. Chim. Acta* **1992**, 75, 1604; e) D. V. McGrath, R. H. Grubbs, J. W. Ziller, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 3611; f) S. H. Bergens, B. Bosnich, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 958; g) W. Smadja, G. Ville, C. Georgoulis, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1980**, 594; h) M. Dedieu, Y.-L. Pascal, *C. R. Acad. Sci. Ser. C* **1976**, 282, 65; i) W. Strohmeier, L. Weigelt, *J. Organomet. Chem.* **1975**, 86, C17; j) Y. Sasson, G. L. Rempel, *Tetrahedron Lett.* **1974**, 4133; k) B. M. Trost, R. J. Kulawiec, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 2027; l) B. M. Trost, R. J. Kulawiec, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 3039; m) J.-E. Bäckvall, U. Andreasson, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 5459.
- [8] Beispielsweise ist Trosts Ruthenium-Katalysator bei der Isomerisierung von Geraniol **1** zu Citronellal **2** unwirksam.<sup>[7k]</sup>
- [9] Bei diesen Reaktionen wird im allgemeinen eine größere Menge (30–45%) an 2-Undecanon **5** gebildet. Der Unterschied zwischen der theoretischen und der experimentellen Menge an **5** resultiert aus der Reoxidation des Ru<sup>III</sup>-Katalysators in eine Ru<sup>V</sup>-Spezies durch O<sub>2</sub>. Die nachfolgende Reduktion des Ru<sup>V</sup>-Komplexes zurück zum aktiven, niedervalenten Ru<sup>III</sup>-Derivat erfordert einen zusätzlichen Verbrauch des Alkohols-Additivs **4**. Siehe auch: S.-I. Murahashi, T. Naota, N. Hirai, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 7318.

- [10] Daß ein Rutheniumalkoxid **7** als Zwischenstufe in diesem Prozeß auftritt, wird dadurch belegt, daß der aus **6** erhaltene Trimethylsilyl-ether vollkommen unreaktiv ist.
- [11] Die 1,4-Addition von Rutheniumhydriden an Enone ist gut bekannt; siehe z.B.: Y. Ishii, K. Osakada, T. Ikariya, M. Saburi, S. Yoshikawa, *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 2034. Für einen ähnlichen Mechanismus mit einer 1,4-Hydridaddition an Iminium-Zwischenstufen siehe z. B.: S.-I. Inoue, H. Takaya, K. Tani, S. Otsuka, T. Sato, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 4897.
- [12] Außer als Nebenprodukt bei der Oxidation von **4** scheint 2-Undecanon auch als Ligand für den niedervalenten Ruthenium-Katalysator zu fungieren.

## Peptid-Minivektoren als Gen-Transporter\*\*

Robert G. Cooper, Richard P. Harbottle,  
Holm Schneider, Charles Coutelle und  
Andrew D. Miller\*

Es wird allgemein erwartet, daß sich die Gentherapie zu einer der wichtigsten medizinischen Technologien des nächsten Jahrhunderts entwickeln wird. Um dies jedoch zu ermöglichen, müssen noch viele Fortschritte gemacht werden. Die Gentherapie läßt sich ganz allgemein als „Einschleusen von Nucleinsäuren (mit einem Vektor) in einen Patienten für therapeutische Zwecke“ definieren.<sup>[1a]</sup> Die aktuelle Forschung auf dem Gebiet der Gentherapie beschäftigt sich folglich mit dem Design geeigneter Vektoren für den Nucleinsäuretransport. In diesem Bereich kommt dem Chemiker eine klar definierte Rolle zu; wir selbst arbeiten an der Entwicklung synthetischer Vektorsysteme aus kationischen Liposomen zum Transport von Nucleinsäuren in vivo.<sup>[2]</sup> Hier beschreiben wir als Alternative ein System auf Peptidbasis, das eines der kleinsten und einfachsten Vektorsysteme zum Einschleusen von Nucleinsäuren ist, die bislang beschrieben worden sind.<sup>[1]</sup>

[\*] Dr. A. D. Miller, Dr. R. G. Cooper  
The Imperial College Genetic Therapies Centre  
Department of Chemistry  
Imperial College of Science, Technology & Medicine  
South Kensington, London SW72AY (Großbritannien)  
Fax: (+44) 171-594-5803  
E-mail: a.miller@ic.ac.uk

Dr. R. P. Harbottle, H. Schneider, Prof. C. Coutelle  
Cystic Fibrosis Gene Therapy Research Group  
Molecular Genetics Division of Biomedical Sciences  
Imperial College School of Medicine  
London (Großbritannien)

[\*\*] Cationic lipids for gene therapy, 2. Mitteilung. Diese Arbeit wurde von der Association Française de Lutte contre la Mucoviscidose (AFLM), vom BBSRC sowie von Genzyme Corporation gefördert. H.S. dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ein Postdoktoranden-Stipendium. Wir danken der Mitsubishi Chemical Corporation für die Förderung des Imperial College Genetic Therapies Centre und Sandy Carne (Chester Beatty Laboratories, Institute of Cancer Research, London) für seine Hilfe bei der Massenspektrometrie. – 1. Mitteilung: Lit. [2].



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.wiley-vch.de/home/angewandte/> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Das hier vorgestellte System auf Peptidbasis geht auf unsere Entdeckung zurück, daß das synthetische Peptid **1**, das eine cyclische N-terminale Gruppe und eine Hexadeca(L-lysin)-DNA-Bindungsdomäne enthält, den Gentransport in vitro bewirken konnte.<sup>[3]</sup> Die cyclische N-terminale Gruppe von **1** enthält das Peptidmotiv Arg-Gly-Asp (RGD), das bekanntlich mit Integrinen wie  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$ <sup>[4, 5]</sup> wechselwirkt. Integrine sind Zelloberflächen-Proteine, die man als integrale Bestandteile vieler Zellmembranen findet.<sup>[5, 6]</sup> Wir nahmen an, daß **1** über die Hexadeca(L-lysin)-Einheit an Nucleinsäuren binden und dann in einem zweistufigen Prozeß in Zellen eindringen würde, bei dem zunächst eine Bindung an Zelloberflächen-Integrine erfolgen und anschließend eine Rezeptor-vermittelte Endocytose stattfinden sollte. Dieser von Integrinen vermittelte Prozeß wird von verschiedenen Pathogenen genutzt, um in Zellen einzudringen, z.B. auch vom Adenovirus,<sup>[7]</sup> das selbst in letzter Zeit zum Gegenstand vieler Studien zum Gentransport geworden ist.<sup>[1]</sup> Wir erwarteten daher, daß **1** wie ein minimalistischer Adenovirus-Vektor Gene in Zellen einschleusen würde.

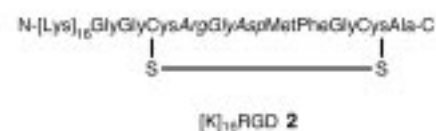
Erfreulicherweise verhielt sich Peptid **1** wie erwartet,<sup>[3]</sup> war jedoch schwierig zu synthetisieren. Mit dem Peptid **2**, in dem sich die Hexadeca(L-lysin)-Einheit am N-Terminus befand, stand ein RGD-Peptidvektor der zweiten Generation zur Verfügung. **2** war zwar **1** als Gentransport-Vektor überlegen, jedoch war seine Herstellung ebenfalls schwierig.<sup>[8]</sup> In der Festphasen-Peptidsynthese kennt man „schwierige Sequenzen“, dabei handelt es sich um Sequenzen, die Sekundärstrukturelemente (wie  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter) während der Festphasensynthese am Harz bilden. Man nimmt an, daß diese Sekundärstrukturelemente die Kupplung der Aminosäuren erschweren und damit die Ausbeute an Peptidprodukt verringern.<sup>[9, 10]</sup> Diese „schwierigen Sequenzen“ lassen sich anhand der Gleichung von Milton et al.<sup>[11]</sup> [Gl. (1)] identi-

$$\langle P_c^* \rangle = \sum P_{c^*}^* \cdot i_{-n} / n \quad (1)$$

zieren, in der  $\langle P_c^* \rangle$  der gemittelte Knäuel-Parameter (coil parameter) für den Aufbau einer geschützten Peptidkette mit einer Gesamtlänge von  $n$  Resten und  $P_{c^*}^* \cdot i_{-n}$  der individuell verfeinerte Knäuel-Parameter für jede einzelne Aminosäure in der geschützten Peptidkette an der jeweiligen Position  $i$  ist. Analysiert man die Sequenz einer geschützten Peptidkette nach Gleichung (1), so weist ein hoher Wert für  $\langle P_c^* \rangle$  (1.0–1.4) typischerweise auf die Tendenz der Kette hin, als statistisches Knäuel (random coil) vorzuliegen. Das bedeutet, daß die Kupplung mit der nächsten Aminosäure leicht auszuführen sein wird (Kupplungseffizienz > 99.8%). Ein kleiner Wert für  $\langle P_c^* \rangle$  (0.7–0.9) bedeutet genau das Gegenteil. Für die Synthese der geschützten Peptidkette von **1** ergab sich nach vollständiger Analyse durchgehend ein  $\langle P_c^* \rangle$ -Wert von ca. 0.9. Ähnliche Ergebnisse wurden für das Peptid **2** erhalten. Deshalb kann man bei **1** und **2** von „schwierigen Sequenzen“ ausgehen.

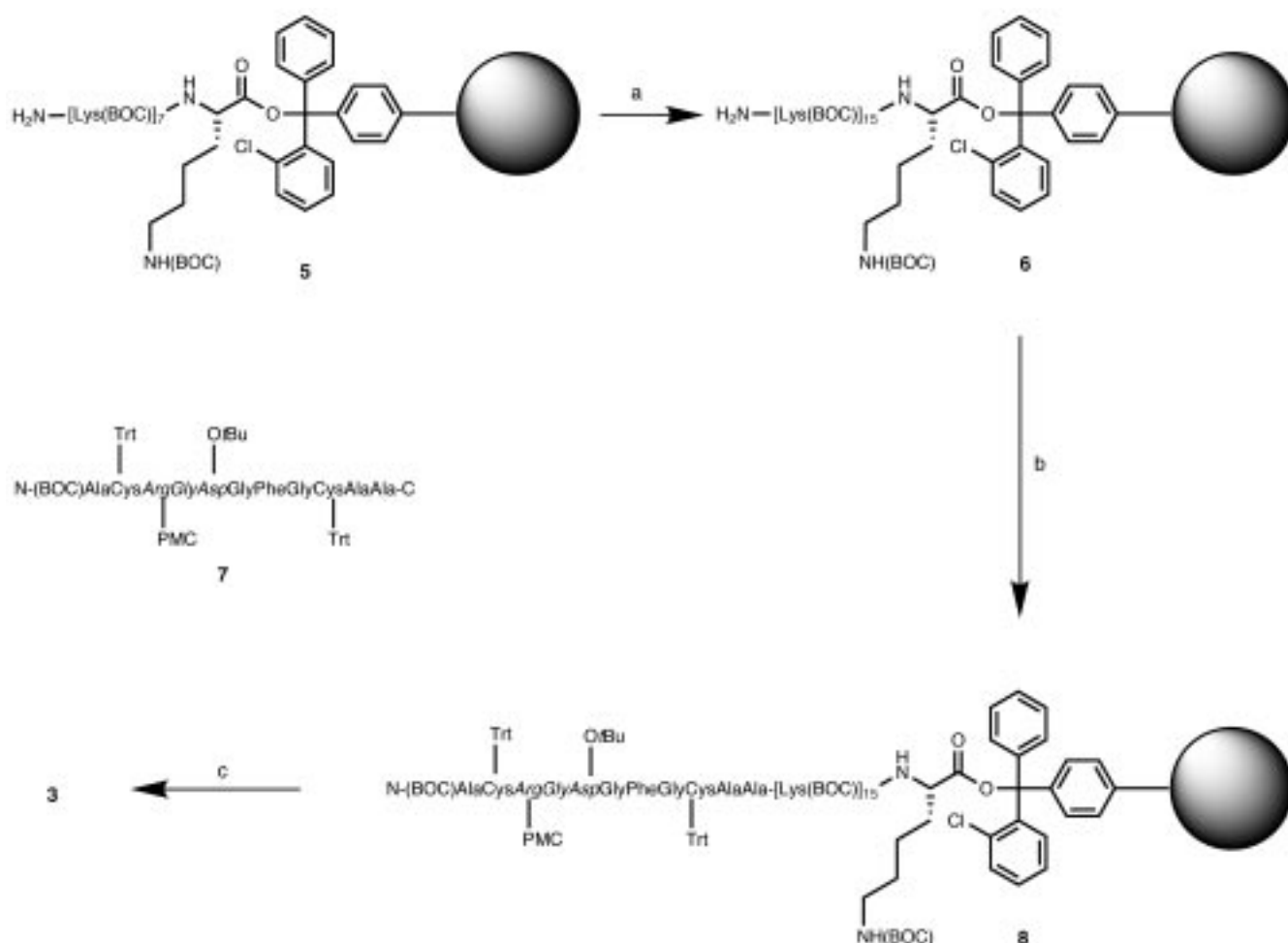
Wegen der enormen Bedeutung, die **1** und **2** für den Nucleinsäuretransport haben, waren wir bemüht, eine alternative Strategie für die Festphasen-Peptidsynthese zu entwickeln, die die Probleme, die solche schwierigen Sequenzen aufwerfen, lösen kann und es gleichzeitig ermöglicht, andere

funktionelle Peptidbausteine an Hexadeca(L-lysin) zu knüpfen. Das würde den Nutzen und die potentielle Verwendbarkeit von Vektorsystemen auf Peptidbasis zum Transport von Nucleinsäuren erweitern. Im Laufe der Entwicklung dieser alternativen Strategie entschieden wir uns, zwei neue Peptide, **3** und **4**, für den Nucleinsäuretransport herzustellen. Peptid **3**



ist eine Variante von **1** und stellt einen RGD-Peptidvektor der dritten Generation dar. Im Unterschied dazu wurde Peptid **4** aus einem Fusions-vermittelnden Peptid aufgebaut, das an den N-Terminus der Hexadeca(L-lysin)-DNA-Bindungsdomäne geknüpft wurde. Es wurde gezeigt, daß diese Fusions-vermittelnde Peptideinheit starke endosomolytische Eigenschaften aufweist.<sup>[12]</sup> Wir schlossen daraus, daß bei kombinierter Verwendung von **3** und **4** das resultierende Vektorsystem auf Peptidbasis zum Nucleinsäuretransport in der Lage sein würde, elektrostatisch an Nucleinsäuren zu binden, und anschließend durch Endocytose, die durch die vom RGD-Peptidmotiv in **3** vermittelte Integrinbindung ermöglicht wird, in Zellen eingeschleust werden würde. Die elektrostatisch assoziierten Nucleinsäuren könnten dann aus ihren Endosom-Kompartimenten durch die endosomolytische Aktivität der N-terminalen, Fusions-vermittelnden Peptideinheit von **4** freigesetzt werden. Die Freisetzung aus dem Endosom stellt bekanntlich beim Einsatz nichtviraler Systeme zum Nucleinsäuretransport ein ernsthaftes Problem dar.<sup>[1]</sup> Man sollte daher erwarten, daß **4** synergistisch mit **3** wirkt und damit ein effizienteres Vektorsystem auf Peptidbasis zum Transport von Nucleinsäuren resultieren würde.

Zur Herstellung von **3** und **4** wurde folgende Festphasen-Synthesestrategie ausgearbeitet: Zur Synthese des harzgebundenen Hexadeca(L-lysins) **6** wurde eine konvergente Segmentkondensation angewendet; zunächst wurde dazu harzgebundenes Octa(L-lysin) **5** an einem äußerst säurelabilen 2-Chlortrityl-Harz hergestellt und anschließend mit Fmoc-[L-Lys(BOC)]<sub>8</sub>-OH **5a** unter Verwendung des Kupplungsreagens Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP) zu harzgebundenem Hexadeca(L-lysin) **6** gekuppelt (Schema 1).<sup>[13]</sup> Oligo(L-lysin)-Peptide sind normalerweise sehr schwer über eine direkte,



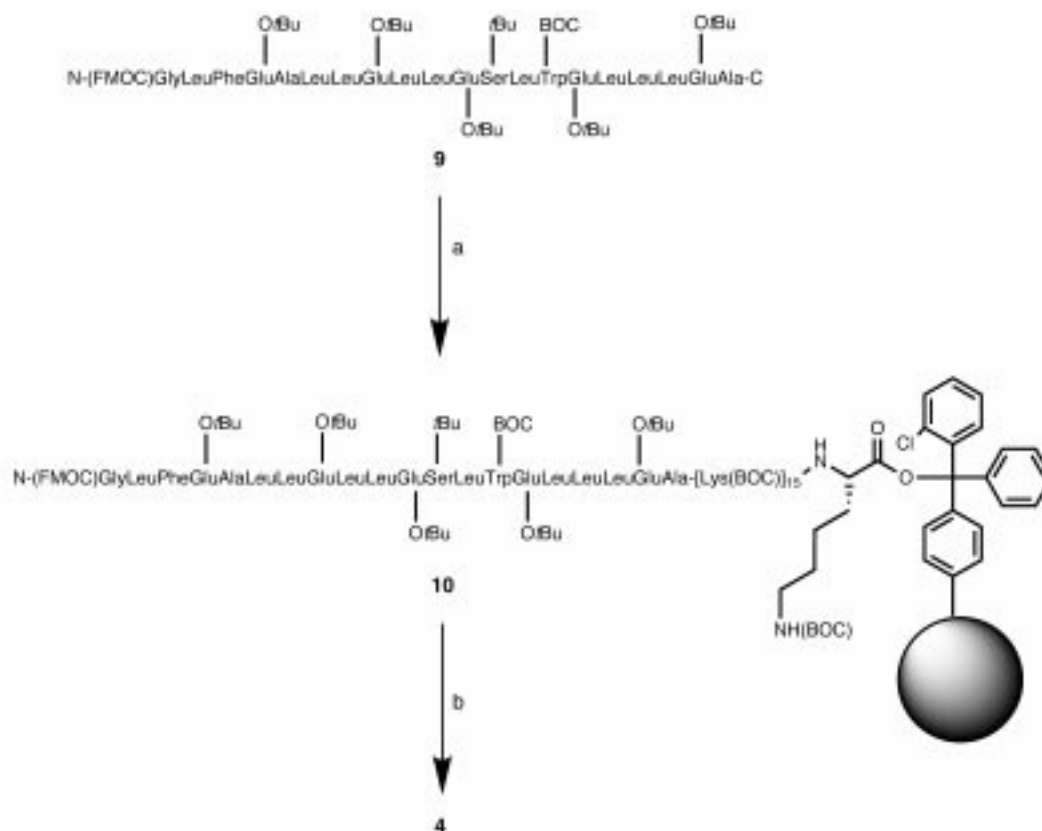
Schema 1. Reagentien und Reaktionsbedingungen: a) 1. Fmoc-[L-Lys(BOC)]<sub>8</sub>-OH **5a**, PyBOP (2 Äquiv.), *i*Pr<sub>2</sub>EtN (3 Äquiv.), DMSO/DMF (1/3), RT, 72 h; 2. 20proz. Piperidin in DMF (v/v); b) **7**, PyBOP (10 Äquiv.), *i*Pr<sub>2</sub>EtN (10 Äquiv.), DMSO/DMF (1/3), RT, 24 h; c) 1. 7proz. Phenol (w/v), 2proz. Ethandithiol (v/v), 4proz. Thioanisol (v/v), 4proz. Wasser (v/v) in TFA, RT, 5 h; 2. MTBE; Gesamtausbeute 3%. BOC = *tert*-Butoxycarbonyl, Fmoc = Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl, MTBE = Methyl-*tert*-butylether, PMC = 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl, TFA = Trifluoressigsäure, Trt = Triphenylmethyl = Trityl.

lineare Synthesestrategie zugänglich, besonders wenn mehr als acht Aminosäurereste enthalten sind ( $\langle P_c^* \rangle$ -Werte 0.8–0.9). Um diese Komplikationen zu vermeiden und um die Ausbeute an vollständig synthetisiertem **6** zu optimieren, wurde diese besondere Segmentkondensation gewählt. Eine Teilmenge von **6** wurde dann mit PyBOP an das vollständig geschützte Peptid **7** gekuppelt, das das RGD-Motiv enthält; dabei entsteht **8**, das anschließend vom Harz abgespalten und entschützt wird, wobei **3** in einer Gesamtausbeute von 3% erhalten wird (Schema 1).

Eine andere Teilmenge von **6** wurde an das vollständig geschützte, Fusions-vermittelnde Peptid **9** mit Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol (DCC/HOBt) zu **10** gekuppelt. Nach Abspalten vom Harz und Entschützen erhielt man **4** in einer Gesamtausbeute von 3% (Schema 2). Die Synthese des Zwischenprodukts **7**, das das RGD-Motiv enthält, verlief ohne Komplikationen durch lineare Festphasen-Peptidsynthese. Im Unterschied dazu erwies sich die Synthese des intermediären Fusions-vermittelnden Peptids **9** als schwieriger ( $\langle P_c^* \rangle$ -Werte ca. 0.8 während der gesamten Synthese) und konnte nur mit drastisch verlängerten Kupplungszeiten und doppelte Kupplungen erreicht wer-

den. Insgesamt waren die Ausbeuten an **3** und **4** zufriedenstellend, besonders wenn man bedenkt, daß deren Synthesen mit gewöhnlichen linearen Synthesestrategien aufgrund einer Analyse nach Gleichung (1) nahezu unmöglich erschienen.

**3** wurde zunächst *in vitro* im Vergleich zu **2** auf seine Tauglichkeit als Vektor zum Transport des Plasmids pGL3 in CaCo2-Zellen (menschliche koloniebildende Epithelzellen) überprüft. Das pGL3-Plasmid enthält das Luciferase-Reportergen des amerikanischen Glühwürmchens (*Photinus pyralis*), was zu einer Akkumulation der Luciferase-Enzymaktivität in CaCo2-Zellen nach dem Einschleusen des Plasmid-codierten Gens führt. Das Ausmaß der Enzymaktivität, das man daraufhin in den Zellen mißt, korreliert direkt mit der Effizienz des Gentransport-Prozesses.<sup>[8]</sup> Je höher die Enzymaktivität ist, desto effizienter ist der Prozeß. Im pGL3-Transport-Assay waren die Peptide **2** und **3** als Vektoren zum Plasmidtransport nicht zu unterscheiden (Ergebnisse nicht gezeigt). Im Unterschied dazu konnte unser RGD-Peptidvektor **3** der dritten Generation im Vergleich zum endosomolytischen Vektor **4** das pGL3-Plasmid vier- bis fünfmal effizienter einschleusen (Abbildung 1). Erfreulicher-



Schema 2. Reagentien und Reaktionsbedingungen: a) **6**, DCC (40 Äquiv.), HOBT (40 Äquiv.), DMSO/DMF (1/4), RT, 24 h; b) 1. 20proz. Piperidin in DMF (v/v), RT, 45 min; 2. 2.5proz. Ethandithiol (v/v), 2.5proz. Wasser in TFA (v/v), RT, 3 h; 3. MTBE (Gesamtausbeute 3%).

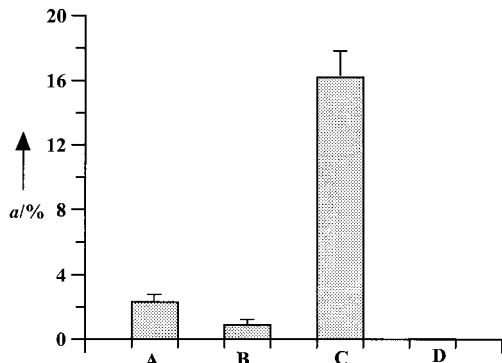


Abbildung 1. Luciferase-Enzymaktivität *a* in zellfreien Extrakten von CaCo2-Zellen 48 h nach der Einschleusung des pGL3-Plasmids, das das Luciferase-Gen codiert, mit einem Peptid-Minivektor. Der Transport des Plasmid-codierten Gens wurde dadurch erreicht, daß Zellen mit pGL3-Plasmiden im Gemisch mit **3** und/oder **4** behandelt wurden. Bei jeder Transfektion betrug das optimale Verhältnis von Plasmid zu Gesamtpeptid 1 µg/2.5 µg (1:2.5, w/w). Die Plasmid/Peptid-Gemische hatten folgende Zusammensetzung: pGL3 + **3** (A), pGL3 + **4** (B), pGL3 + **3** + **4** (C), nur pGL3 (D). Die Luciferase-Enzymaktivität wird als prozentualer Anteil der Aktivität angegeben, die man in Kontrollexperimenten zum durch kationische Liposomen vermittelten Gentransport mit einem zellfreien Extrakt von CaCo2-Zellen mißt, nachdem diese gleichzeitig mit kationischen Liposomen (LipofectAMINE, GIBCO BRL) und pGL3-Plasmid (24 µg/1 µg; 24:1, w/w) behandelt wurden.

weise stellte man für die Kombination von **3** und **4** eine fast zehnmal so hohe Effizienz des Gentransports fest wie bei der Verwendung von **3** allein (Abbildung 1). Es zeigte sich, daß **3**

und **4** tatsächlich synergistisch wirken, wahrscheinlich nach dem oben vorgeschlagenen Mechanismus, so wie wir es erwartet hatten. Die kombinierten Effekte von **3** und **4** beim Gentransport kommen der Effizienz des Gentransports mit kationischen Liposomen, z.B. LipofectAMINE, recht nahe (Abbildung 1). Deshalb sind wir zuversichtlich, daß das hier beschriebene kombinierte Peptidsystem die Verwendung kationischer Liposomen in vitro nach weiteren Optimierungsstudien ersetzen könnte. Allerdings könnte es sich auch als ein fruchtbarer Weg erweisen, eine zusätzliche Kombinationsstrategie einzuschlagen, in der sowohl Peptide als auch kationische Liposomen zusammen eingesetzt werden, um den Transport von Nucleinsäuren zu bewirken. Tatsächlich entdeckten wir kürzlich, daß das Peptid **2**, unser RGD-Peptidvektor der zweiten Generation, in vitro die Effizienz des Gentransportes durch die kationischen Liposomen LipofectAMINE<sup>[1]</sup> um mehr als eine Größenordnung verstärkt.<sup>[14]</sup> Solch eine Erhöhung der Effizienz des Gentransportes durch kationische Liposomen kann auch entscheidende Auswirkungen auf die durch kationische Liposomen vermittelte Gentransport in vivo haben.

Wir haben eine konvergente Synthese für Peptid-Minivektoren entwickelt, die in der Lage sind, den Transport Plasmid-codierter Gene in vitro zu vermitteln. Unseres Wissens sind diese im Moment die kleinsten Vektoren zum Transport von Nucleinsäuren und könnten deshalb in Zukunft als äußerst nützliches Werkzeug in der Genthherapie eingesetzt werden.

## Experimentelles

Alle Peptide wurden mit einem ABI-431A-Festphasen-Peptidsynthesizer im Batch-Verfahren synthetisiert. Wenn nicht anders beschrieben wurden die Synthesen im 0.1-mmol-Maßstab durchgeführt, wobei FMOC-geschützte L-Aminosäuren (Novabiochem, Nottingham, Großbritannien) im fünffachen Überschuß und die FastMoc-Reagentien 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat/Hydroxybenzotriazol (HBTU/HOBt) (Alexis Corporation, Laufelfingen, Schweiz und SMPE Ltd., Croydon, Großbritannien) zur Amidkupplung eingesetzt wurden. Die Kupplungsschritte wurden in *N*-Methylpyrrolidinon (NMP) und Dichlormethan (Rathburn, Walkerburn, Großbritannien) an sehr säurelabilen 2-Chlortriyl-Harzen (200–400 mesh; Novabiochem, Nottingham, Großbritannien) als fester Phase durchgeführt. Nach der Synthese wurden die Peptide mit Trifluoressigsäure (TFA) in Dichlormethan (1 %, v/v) vom Harz abgespalten und anschließend mit Pyridin (2.5 Äquiv.) in Methanol behandelt. Entsalzt wurde über eine P2-Biogel-Säule (2 × 28 cm; Bio-Rad Laboratories, Herts., Großbritannien), die an ein FPLC-System (Amersham Pharmacia Biotech Großbritannien, Bucks., Großbritannien) angeschlossen war, mit 0.1proz. wäßriger TFA (0.75 mL min<sup>-1</sup>; Detektion bei 214 und 280 nm) als Elutionsmittel. Die Reinigung durch Umkehrphasen-HPLC erfolgte normalerweise mit einer Vydac-Säule (C18, 2 × 25 cm; Hichrom Ltd, Berks., Großbritannien), die an eine Gilson-HPLC-Anlage (Anachem, Beds., Großbritannien) angeschlossen war. Die Peptide wurden mit einem Acetonitril-Gradienten in 0.1proz. wäßriger TFA (5 mL min<sup>-1</sup>; Detektion bei 220–230 nm) eluiert. Die Matrix-unterstützte-Laser-Desorption/Ionisations-Flugzeit(MALDI-TOF)-Massenspektrometrie wurde mit einem LaserMat-2000-Spektrometer (Thermobioanalysis Ltd, Herts., Großbritannien) mit einer Matrix aus  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure ( $\alpha$ -CMC) (33 nm) in Acetonitril/Methanol (Hewlett-Packard, Cheshire, Großbritannien) durchgeführt.

Das Peptid **3** wurde wie oben beschrieben synthetisiert (Schema 1). Nach Entsalzung, HPLC-Reinigung (Elution mit 53.5proz. Acetonitril, v/v) und Lyophilisierung erhielt man **3** als farbloses Pulver. Gesamtausbeute: 8 mg (2.6  $\mu$ mol, 3 %); MS (MALDI-TOF): *m/z*: ber. für C<sub>136</sub>H<sub>255</sub>N<sub>46</sub>O<sub>30</sub>S<sub>2</sub>: 3078.9 [*M* + H]<sup>+</sup>, gef.: 3078.1. Die Sequenz wurde außerdem über Aminosäureanalyse und Sequenzierung bestätigt. Die Homogenität wurde durch HPLC-Analyse auf über 95 % geschätzt.

Das Peptid **4** wurde wie oben beschrieben synthetisiert (Schema 2). Nach HPLC-Reinigung (Elution mit 96.5proz. Acetonitril, v/v) und Lyophilisierung erhielt man **4** als farbloses Pulver. Gesamtausbeute: 12 mg (2.7  $\mu$ mol, 3 %); MS (MALDI-TOF): *m/z*: ber. für C<sub>206</sub>H<sub>366</sub>N<sub>53</sub>O<sub>48</sub>: 4353.5 [*M* + H]<sup>+</sup>, gef.: 4353.8. Die Sequenz wurde über Aminosäureanalyse und Sequenzierung bestätigt. Die Homogenität wurde durch HPLC-Analyse auf über 95 % geschätzt.

Die Peptide **3** und **4** (100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) wurden in einem Gemisch aus 10 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure (HEPES), pH 7.3, und 150 mM NaCl gelöst. Die Lösung von **3** wurde dann 16 h bei Raumtemperatur gerührt, um eine intramolekulare Disulfidbrücke zu bilden. Die Bindungsknüpfung wurde mit dem Ellman-Test<sup>[15]</sup> nachgewiesen. Schließlich wurde für oxidiertes **3** und/oder **4**, wie zuvor beschrieben, die Effizienz des Gentransportes getestet.<sup>[6]</sup>

Eingegangen am 22. September 1998 [Z12443]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1949–1952

**Schlagwörter:** Kationen • Gentechnik • Liposomen • Peptide • Wirkstoff-Forschung

- [1] a) A. D. Miller, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 1862–1880; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1768–1785; b) A. D. Miller, *Curr. Res. Mol. Ther.* **1998**, 1, 494–503.
- [2] R. G. Cooper, C. J. Etheridge, L. Stewart, J. Marshall, S. Rudginsky, S. H. Cheng, A. D. Miller, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 137–151.
- [3] S. L. Hart, R. P. Harbottle, R. Cooper, A. Miller, R. Williamson, C. Coutelle, *Gene Ther.* **1995**, 2, 552–554.
- [4] a) S. L. Hart, A. M. Knight, R. P. Harbottle, A. Mistry, H.-D. Hunger, D. F. Cutler, R. Williamson, C. Coutelle, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 12468–12474; b) K. T. O'Neil, R. H. Hoess, S. A. Jackson, N. S. Ramachandran, S. A. Mousa, W. F. DeGrado, *Proteins* **1992**, 14, 509–515.

- [5] R. O. Hynes, *Cell* **1992**, 69, 11–25.
- [6] a) R. O. Hynes, *Cell* **1987**, 48, 549–554; b) S. E. DeSouza, M. H. Ginsberg, E. F. Plow, *Trends Biochem. Sci.* **1991**, 16, 246–250.
- [7] T. J. Wickham, P. Mathias, D. A. Cheres, G. R. Nemerow, *Cell* **1993**, 73, 309–319.
- [8] R. P. Harbottle, R. G. Cooper, S. L. Hart, A. Ladhoff, T. McKay, A. M. Knight, E. Wagner, A. D. Miller, C. Coutelle, *Human Gene Ther.* **1998**, 9, 1037–1047.
- [9] a) L. R. Cameron, J. L. Holder, M. Meldal, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1988**, 2895–2901; b) D. Hudson, *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 617–624; c) G. Barany, N. Kneib-Cordonier, D. G. Mullen, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1987**, 30, 705–739.
- [10] S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, 57, 959–989; b) S. B. H. Kent, I. Clark-Lewis in *Synthetic Peptides in Biology and Medicine* (Hrsg.: K. Alitalo, P. Partanen, A. Vaheri), Elsevier, Amsterdam, **1985**, S. 29–57.
- [11] R. C. de L. Milton, S. C. F. Milton, P. A. Adams, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 6039–6046.
- [12] S. Gottschalk, J. T. Sparrow, J. Hauer, M. P. Mims, F. E. Leland, S. L. C. Woo, L. C. Smith, *Gene Ther.* **1996**, 3, 448–457.
- [13] J. Coste, D. Le Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 205–208.
- [14] M. Colin, R. P. Harbottle, A. Knight, M. Kornprobst, R. G. Cooper, A. D. Miller, G. Trugnan, J. Capeau, C. Coutelle, M. C. Brahimi-Horn, *Gene Ther.* **1998**, 5, 1488–1498.
- [15] G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, 82, 70–77.

## Oberflächenmodifikation von porösem Silicium durch elektrochemische Reduktion organischer Halogenide\*\*

Christian Gurtner, Aetna W. Wun und Michael J. Sailor\*

Poröses Silicium gehört zu den Werkstoffen mit großer Oberfläche und nanometergroßen bis makroskopischen Poren. Es kann aus n- oder p-Typ-Silicium durch chemisches oder elektrochemisches Ätzen mit Flußsäure hergestellt werden. Erste Untersuchungen an diesem Werkstoff wurden wegen seiner Verwendung als Isoliermaterial in der Mikroelektronik durchgeführt.<sup>[1]</sup> Später entdeckte man, daß viele Formen porösen Siliciums nach UV-Anregung eine intensive Photolumineszenz zeigen,<sup>[2]</sup> was Anwendungsmöglichkeiten in der Optoelektronik, der Display-Technologie<sup>[3]</sup> und der chemischen Sensorik<sup>[4]</sup> eröffnete. In jüngster Zeit wurden die passiven optischen Eigenschaften für antireflektierende Beschichtungen,<sup>[5]</sup> Wellenleiter,<sup>[6]</sup> Interferenzfilter<sup>[7]</sup> und Biosensoren<sup>[8]</sup> genutzt.

Frisch hergestelltes poröses Silicium hat eine Oberfläche mit Hydridenden, die leicht oxidiert wird oder korrodiert. Bei

[\*] Prof. M. J. Sailor, C. Gurtner, A. W. Wun  
Department of Chemistry and Biochemistry  
University of California, San Diego  
La Jolla, California 92093-0358 (USA)  
Fax: (+1) 619-534-5383  
E-mail: mjs@chem.ucsd.edu

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der National Science Foundation (Grant DMR 97-00202) gefördert. Die Autoren danken Dr. Douglas P. Greiner für hilfreiche Diskussionen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.wiley-vch.de/home/angewandte/> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.