

Festphasen-basierte Synthese sequenzdefinierter T-, i- und U-Form-Polymere für den pDNA- und siRNA-Transfer**

David Schaffert, Christina Troiber, Eveline E. Salcher, Thomas Fröhlich, Irene Martin, Naresh Badgujar, Christian Dohmen, Daniel Edinger, Raphaela Kläger, Gelja Maiwald, Katarina Farkasova, Silke Seeber, Kerstin Jahn-Hofmann, Philipp Hadwiger und Ernst Wagner*

Virale Proteine sind in ihrer Effektivität, Nukleinsäure in Zellen einzuschleusen, den derzeit verfügbaren synthetischen Polymeren für den Gentransfer weit überlegen. Um letztere als Vehikel für den intrazellulären Transport von DNA und siRNA zu verbessern, wurden funktionelle Domänen wie endosomolytische Agentien und Liganden zur zielgerichteten Aufnahme konjugiert. Derartig komplexen Polymerkonjugaten fehlt aber die molekulare Präzision sequenzdefinierter viraler Proteine, sowohl was die Kettenlänge als auch was die Position der Konjugationen betrifft. Der in der Praxis übliche Einsatz polydisperser Mischungen schränkt damit die Aussagekraft beobachteter Struktur-Wirkungs-Beziehungen ein. Es ist fraglich, ob polydisperse Makromoleküle je die Wirksamkeit viraler Proteine erreichen werden. Wir beschreiben hier die Festphasen-basierte Synthese sequenzdefinierter Polymere und deren Einsatz als pDNA- und siRNA-Transfersysteme.

Der Festphasen-basierte Aufbau von Makromolekülen^[1] wurde bereits für den DNA-Transfer beschrieben.^[2,3] Hartmann, Börner und Kollegen veröffentlichten eine Syntheseroute zu Polyamidoaminen, die auf der abwechselnden Kupplung von Bernsteinsäureanhydrid und Diamino-N-methyldipropylamin bzw. geschützter Spermin-Derivate beruht.^[4] Um die Vorteile der Peptidsynthese mit der breiten chemischen Diversität synthetischer Polymere zu kombinieren, entwickelten wir künstliche Fmoc/Boc-geschützte Aminosäuren, die definierte Diaminoethan-Einheiten enthalten.^[5] Dieses Motiv verfügt als „Protonenschwamm“ über die Fähigkeit zur Endosomen-Destabilisierung, welche für die Transfektionseffizienz von Polyethylenimin (PEI)^[6,7] und

weiteren kationischen Polymeren entscheidend ist.^[8] Die biologische Aktivität ist dadurch viel höher als bei Diaminopropan-Einheiten, die bereits bei neutralem pH vollständig protoniert sind.^[7d,8a]

Drei künstliche Aminosäuren (Stp, Gtp oder Gtt, Abbildung 1a) wurden gemeinsam mit Lysinen (Verzweigungs-

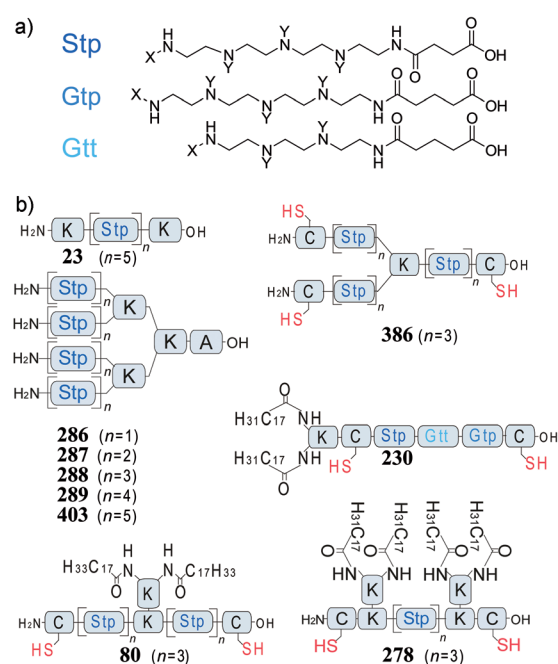


Abbildung 1. a) Oligo(ethylenamino)säuren ohne ($X=Y=H$) oder mit Schutzgruppen ($X=Fmoc$, $Y=Boc$). b) Polymere. Lineare Ketten (**23**), vierarmige Strukturen (**286–289** und **403**), Ketten mit Diacylierung im Zentrum (T-Form) und verbrückenden Cysteinen (**80**); dreiarmlige Strukturen mit drei vernetzenden Cysteinen (**386**); Ketten mit Diacylierung am N-Terminus (i-Form) und zwei vernetzenden Cysteinen (**230**), Ketten mit zwei Diacylierungsstellen und vernetzenden Cysteinen (U-Form, **278**). K = Lysin, C = Cystein.

domäne), Cysteinen (bioreversible Disulfidbrücken) und verschiedenen Fettsäuren (stabilisierende hydrophobe Domänen) zur Herstellung einer Bibliothek von über 300 definierten Strukturen eingesetzt. Lineare Polykationen mit oder ohne Modifikation im Zentrum (T-Form) oder am Ende der Kette (i-Form, U-Form) sowie verzweigte Strukturen wurden untersucht (Abbildung 1b), da die molekulare Topologie die Komplexbildungsfähigkeit und biologischen Eigenschaften von Transfektionssystemen beeinflussen können.^[6c,9]

[*] Dr. D. Schaffert,^[a] C. Troiber,^[a] E. E. Salcher, T. Fröhlich, I. Martin, Dr. N. Badgujar, C. Dohmen, D. Edinger, R. Kläger, Dr. G. Maiwald, K. Farkasova, Prof. E. Wagner
Pharmaceutical Biotechnology, Center for Nanoscience
Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)
E-Mail: ernst.wagner@cup.uni-muenchen.de

Dr. S. Seeber, Dr. K. Jahn-Hofmann, Dr. P. Hadwiger
Roche Kulmbach GmbH
Fritz Hornschuch-Straße 9, 95386 Kulmbach (Deutschland)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

[**] Die Arbeit wurde durch den Cluster „Nanosystems Initiative Munich“ und den Biotech-Cluster m⁴ T12 gefördert. I.M. war eine Gastdoktorandin vom IRB Barcelona.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201102165> zu finden.

Abbildung 2 zeigt die Luciferase-Gentransferaktivität ausgewählter Polymere, die mit pDNA bei den angegebenen molaren Verhältnissen von protonierbarem Stickstoff zu Phosphat (N/P) komplexiert wurden. Aufgrund ihrer unge-

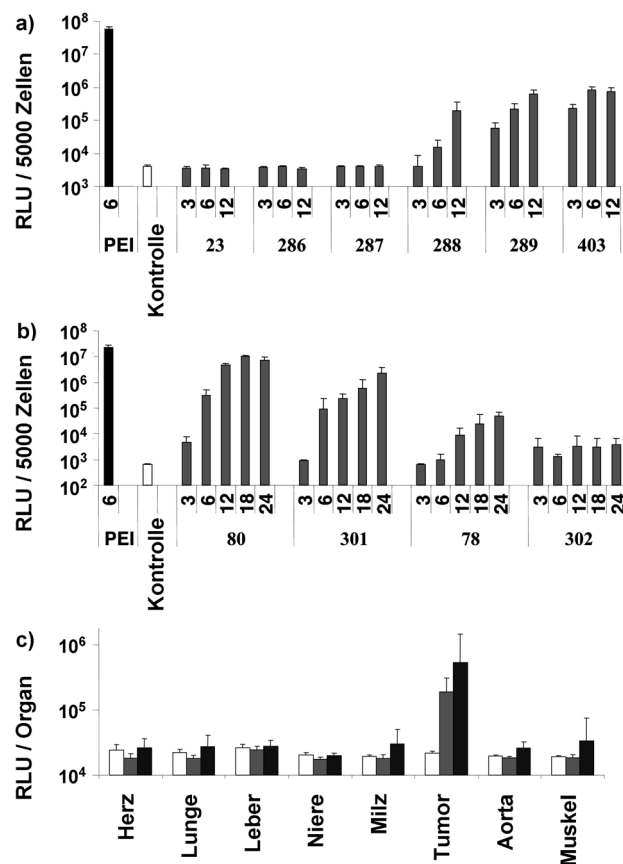


Abbildung 2. Transfektion von Neuro2A-Zellen mit pDNA-Polyplexen. a) Vierarmige Strukturen. b) T-Form **80** und seine Mutanten. LPEI als Positivkontrolle. c) Luciferase Genexpression in vivo nach systemischer Polyplexverabreichung in tumortragenden Mäusen. Weiß: **78**, grau: **80**, beide bei m/m 20, schwarz: G3-HD-OEI^[7d] als positive In-vivo-Kontrolle.

nügenden DNA-Bindungsfähigkeit (Abbildung S1A in den Hintergrundinformationen) transfizieren Polymere, wie die lineare Kette **23** oder die verzweigten Strukturen **286** und **287** mit weniger als 10 Stp-Einheiten (< 50 Stickstoffatomen), nicht, vergleichbar mit Oligoethylenimin mit 800 Da.^[7d] Die verzweigten Polymere **288**, **289** und **403** (mit 60, 80 oder 100 Stp-Stickstoffatomen) binden DNA effizient über elektrostatische Wechselwirkungen, wie im Agarosegel-Retardierungsassay gezeigt (Abbildung S1A) und bilden dabei 80–100 nm große Polyplexe (Tabelle S1). Diese zeigen eine Gentransferaktivität (Abbildung 2a), die in etwa 100-fach über dem gemessenen Hintergrundsignal nicht-transfizierter Zellen (ctrl) liegt, aber zwei Zehnerpotenzen unter dem Vergleichswert für lineares PEI mit 22 kDa.

Der praktische Vorteil von vierarmigen Polymeren ist, dass in wenigen Syntheseschritten relativ hochmolekulare verzweigte Polykationen aufgebaut werden können. Die Modifikation kleinerer Polymere mit einer hydrophoben

Domäne und zwei Cysteinen (**80**) verbessert den Gentransfer erheblich (Abbildung 2b). Die Cystein-haltigen Polymere **80** und **78** (Tabelle 1) zeigen beschleunigte Disulfidbildung in Gegenwart von DNA (SI Abbildung S3) und deutlich stär-

Tabelle 1: Ausgewählte Polymersequenzen mit Analoga.

Polymer	Sequenz [von N- nach C-Terminus] ^[a]
80	C-Stp-Stp-Stp-(OleA) ₂ K]K-Stp-Stp-Stp-C
301	A-Stp-Stp-Stp-(OleA) ₂ K]K-Stp-Stp-Stp-A
78	C-Stp-Stp-Stp-K]K-Stp-Stp-Stp-C
302	A-Stp-Stp-Stp-K]K-Stp-Stp-Stp-A
386	(C-Stp-Stp-Stp) ₂]K-Stp-Stp-Stp-C
387	(A-Stp-Stp-Stp) ₂]K-Stp-Stp-Stp-A
230	(LinA) ₂ K-C-Stp-Gtt-Gtp-C
377	K-C-Stp-Gtt-Gtp-C
378	K-Stp-Gtt-Gtp-A
379	(LinA) ₂ K-Stp-Gtt-Gtp-A
278	C-(LinA) ₂ K]K-Stp-Stp-Stp-(LinA) ₂ K]K-C
279	A-(LinA) ₂ K]K-Stp-Stp-Stp-(LinA) ₂ K]K-A

[a] „]K“ steht für ein Lysin mit Verzweigung an den α , ϵ -Aminogruppen.

kere DNA-Bindung als die Alanin-Analoga **301** und **302** (Abbildung S1). Hydrophobe Modifikation durch Einbau α , ϵ -diacylierter Lysine im Zentrum der Polymerkette („T-Form“) erhöhen die Polyplexstabilität (Abbildung S1). Es wurden vorab Mono- und Diacylierungen mit Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge (4–20 Kohlenstoffatome) untersucht. Daraus hat sich die Lysindiacylierung mit C₁₄- bis C₁₈-Fettsäuren als effektivste Modifikation ergeben. Polymer **80** mit Cysteinen und zweifacher Ölsäuremodifikation vermittelt bessere Transfektion (Abbildung 2b) und viel höhere Genexpression (bei N/P 12: 30-, 500- und > 1000-fach) als die Analoga ohne Cysteine (**301**), Ölsäuren (**78**) oder ohne jegliche Modifikation (**302**). Zytotoxizität wurde in keinem Fall beobachtet (siehe Abbildung S4).

Auf diesen ermutigenden Ergebnissen aufbauend, wurden In-vivo-Studien in A/J-Mäusen mit subkutan wachsendem Neuro2A-Neuroblastom durchgeführt. Polyplexe aus **80** und pDNA bei einer DNA-Konzentration von 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ waren in Serum stabil und hatten eine einheitliche Größe von ca. 155 nm (Abbildung S2 und Tabelle S1). Nach intravenöser Verabreichung konnte eine Luciferase-Genexpression ausschließlich im Tumor beobachtet werden (Abbildung 2c), übereinstimmend mit dem Expressionsprofil der Positivkontrolle, Polymer G3-HD-OEI^[7d]. Dagegen zeigte das Analogon **78** ohne Ölsäure keine Genexpression.

DNA-Stabilisierung ist nicht der einzige Grund für den positiven Effekt der Diacylierung mit Ölsäure (vergleiche **80** und **78**) bei Cystein-stabilisierten Polyplexen. In der Tat vermittelte die weniger stabile Polyplexformulierung mit dem Cystein-freien Polymer **301** einen höheren Gentransfer als **78** (Abbildung 2b). Ein weiterer entscheidender Vorteil der hydrophoben Gruppe ist die endosomale pH-abhängige lytische Aktivität nach Aufnahme in die Zelle, welche die Freisetzung von Polyplexen in das Zytosol begünstigt. Daher wurden Polymere in einem Erythrozytenlyse-Assay^[10] untersucht, um strukturelle Voraussetzungen für eine pH-abhängige Lyse zu identifizieren (Abbildung 3). Lytische Aktivität

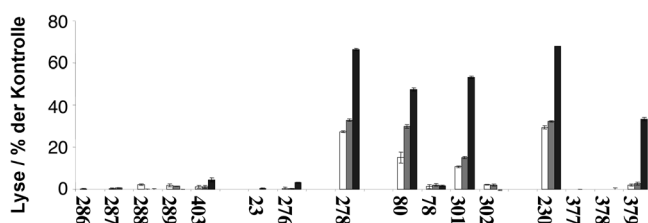


Abbildung 3. Erythrozytenlyse-Assay bei verschiedenen pH-Werten. Erythrozyten wurden mit 2.5 μM Polymerlösungen bei 37°C und dem angegebenen pH-Wert inkubiert. Hämoglobin-Freisetzung wurde nach 1 h gemessen. Weiß: pH 7.4, grau: pH 6.5, schwarz: pH 5.5.

bei niedrigerem pH ist erwünscht, da sie die endosomale Freisetzung begünstigt. Dagegen würde eine unspezifische Lyse im neutralen pH-Bereich Zellmembranen zerstören und somit Toxizität hervorrufen.

Die eher hydrophilen Polymere ohne hydrophobe Modifikation sind im Lyse-Assay inaktiv. Mit Ölsäure (**80**, **301**) oder Linolsäure (**278**, **230**, **379**) diacylierte Polymere zeigten eine pH-spezifische Lyse, die bei pH 5.5 am stärksten ausgeprägt war. Die pH-abhängige Protonierung von Oligoaminen verstärkt über den kationischen Charakter die Membranbindung, die Diacylketten vermitteln amphipathischen Charakter. Beides scheint, in Übereinstimmung mit der Literatur, für eine lytische Aktivität notwendig zu sein.^[3b] Zytotoxische Polymere resultierten aus der Diacylierung mit Myristinsäure, welche die stärkste, allerdings weniger pH-spezifische lytische Aktivität hatten. Aufgrund der pH-Abhängigkeit der Lyse zeigten Polymere **80**, **301**, **278** keine detektierbare Zytotoxizität im getesteten Konzentrationsbereich (bis 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, siehe Abbildung S5). Einzig das Linolsäure-modifizierte Polymer **230** zeigte moderate Zytotoxizität, die aber im Vergleich zu LPEI immer noch zehnfach niedriger war.

Die neue Plattform wurde auch zur Entwicklung neuer siRNA Transportsysteme angewendet. Aufgrund der geringeren Größe von siRNA ist die Polyplexstabilisierung über Cystein-Disulfidbrücken oder hydrophobe Modifikation noch wichtiger als bei pDNA. Alle Polymere, die einen DNA-Transfer effizient vermitteln (Abbildung 2), ausgenommen Polymer **80**, waren im siRNA-Transport inaktiv. Abbildung 4 und Abbildung S6 beschreiben Beispiele aus drei Polymerklassen, die im siRNA-Transfer hochaktiv sind.

Dreiarmlige Stp-basierte Polymere wie **386** enthalten drei Cysteine zur Vernetzung. Sie zeigen Gensequenz-spezifisches „Silencing“ über einen weiten Bereich von Polymer/siRNA-N/P-Verhältnissen, wie in eGFP-Luciferase exprimierenden Neuro2A-Zellen demonstriert wird (Abbildung 4a). Der Austausch der Cysteine gegen Alanine führt zu dem inaktiven Polymer **387** mit sehr niedriger siRNA-Bindungsaktivität (Abbildung S1B).

Die zweite Polymerklasse enthält zwei Cysteine sowie eine hydrophobe Domäne am N-Terminus („i-Form“). Abbildung 4b zeigt „Silencing“ durch Polymer **230**, basierend auf der Sequenz Cys-Stp-Gtt-Gtp-Cys und einem terminalen Di(linolsäure)lysin. Polymere ohne hydrophobe Domäne (**377**), Cysteine (**379**) oder beides (**378**) führen zum Verlust des „Silencing“, der siRNA-Bindungs-fähigkeit (**377**, **378**, Abbildung S1B) bzw. der Partikelstabilität (**379**, Tabelle S2).

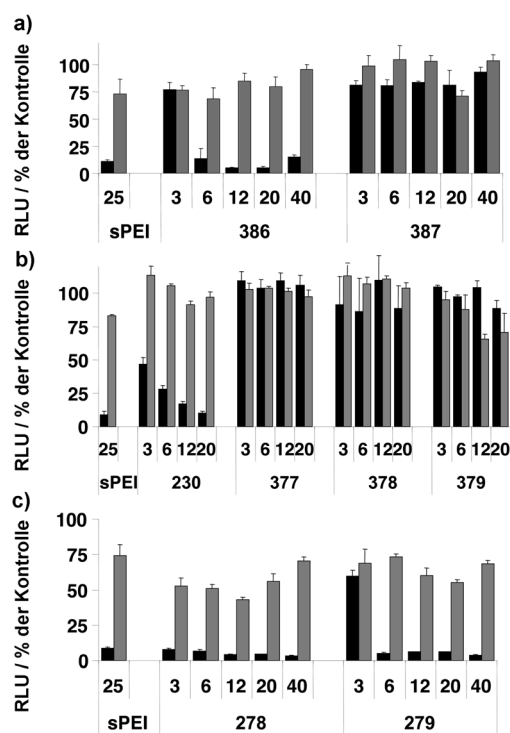


Abbildung 4. siRNA-Polyplexe (a: dreiarmlige Form, b: i-Form, c: U-Form) für das Gen-„Silencing“ in Neuro2A-eGFP-Luc-Zellen. eGFP-siRNA (schwarz) oder Kontroll-siRNA (grau) wurde getestet. Positivkontrolle: succinyliertes PEI (sPEI).^[11]

In Zellaufnahmestudien unter Einsatz von Cy5-markierter siRNA (Abbildung S7) zeigt **230** die am stärksten ausgeprägte siRNA-Aufnahme in alle Zellen, **379** eine moderate Aufnahme, **377** und **378** keine Aufnahme. Eine Änderung der Abfolge der künstlichen Aminosäuren kann auch die Aktivität verändern.

Die dritte Klasse von Polymeren ist sowohl am C- als auch N-Terminus mit diacylierten hydrophoben Domänen modifiziert („U-Form“). Optional enthalten Polymere auch zwei Cysteine zur Stabilisierung. Wie in Abbildung 4c gezeigt, vermitteln sowohl das Polymer **278** (mit Cysteinen) als auch sein Alanin-Analogon **279** ein siRNA-spezifisches „Silencing“. Anscheinend kann die hydrophobe Stabilisierung über vier Linolsäurereste das Fehlen kovalenter Disulfidbindungen kompensieren.

Wir präsentieren somit den Einsatz neuer geschützter künstlicher Oligoaminosäuren für die Festphasen-basierte Synthese sequenzdefinierter Polymere mit präzisen Modifikationen und Topologien. Unsere ersten Beispiele zeigen bereits das große Potenzial solcher Polymere für den Nukleinsäuretransfer. Zusätzlich ist die grundlegende Chemie auch zum Einbau zielgerichteter Liganden (wie Peptide oder kleine Moleküle) und abschirmender Hüllpolymere (wie Polyethylenglycol) geeignet. Berichte über diese Ergebnisse sowie über eine detaillierte Analyse des Einflusses von Polymersequenzen auf die Transfereffizienz werden folgen.

Eingegangen am 28. März 2011,
veränderte Fassung am 20. Mai 2011
Online veröffentlicht am 11. August 2011

-
- [1] L. E. Canne, P. Botti, R. J. Simon, Y. Chen, E. A. Dennis, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8720.
- [2] a) D. L. McKenzie, E. Smiley, K. Y. Kwok, K. G. Rice, *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 901–909; b) M. L. Read, K. H. Bremner, D. Oupicky, N. K. Green, P. F. Searle, L. W. Seymour, *J. Gene Med.* **2003**, *5*, 232–245; c) C. P. Chen, J. S. Kim, E. Steenblock, D. Liu, K. G. Rice, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 1057–1062.
- [3] a) Q. Leng, P. Scaria, J. Zhu, N. Ambulos, P. Campbell, A. J. Mixson, *J. Gene Med.* **2005**, *7*, 977–986; b) X. L. Wang, T. Nguyen, D. Gillespie, R. Jensen, Z. R. Lu, *Biomaterials* **2008**, *29*, 15–22; c) X. L. Wang, R. Xu, X. Wu, D. Gillespie, R. Jensen, Z. R. Lu, *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 738–746.
- [4] a) L. Hartmann, E. Krause, M. Antonietti, H. G. Börner, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 1239–1244; b) L. Hartmann, S. Häfele, R. Peschka-Süss, M. Antonietti, H. G. Börner, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2025–2033; c) L. Hartmann, H. G. Börner, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 3425–3431; d) L. Hartmann, *Macromol. Chem. Phys.* **2011**, *212*, 8–13.
- [5] D. Schaffert, N. Badgajar, E. Wagner, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1586–1589.
- [6] a) O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J. P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7297–7301; b) J. L. Coll, P. Chollet, E. Brambilla, D. Desplanques, J. P. Behr, M. Favrot, *Hum. Gene Ther.* **1999**, *10*, 1659–1666; c) L. Wightman, R. Kircheis, V. Rossler, S. Carotta, R. Ruzicka, M. Kurs, E. Wagner, *J. Gene Med.* **2001**, *3*, 362–372; d) A. Aigner, D. Fischer, T. Merdan, C. Brus, T. Kissel, F. Czubayko, *Gene Ther.* **2002**, *9*, 1700–1707; e) M. Neu, O. Gersmshaus, M. Behe, T. Kissel, *J. Controlled Release* **2007**, *124*, 69–80.
- [7] a) M. L. Forrest, J. T. Koerber, D. W. Pack, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 934–940; b) L. E. Prevette, T. E. Kodger, T. M. Reineke, M. L. Lynch, *Langmuir* **2007**, *23*, 9773–9784; c) C. C. Lee, Y. Liu, T. M. Reineke, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 428–440; d) V. Russ, M. Gunther, A. Halama, M. Ogris, E. Wagner, *J. Controlled Release* **2008**, *132*, 131–140; e) V. Russ, T. Fröhlich, Y. Li, A. Halama, M. Ogris, E. Wagner, *J. Gene Med.* **2010**, *12*, 180–193.
- [8] a) K. Miyata, M. Oba, M. Nakanishi, S. Fukushima, Y. Yamasaki, H. Koyama, N. Nishiyama, K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16287–16294; b) S. Takae, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Itaka, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6001–6009; c) A. Akinc et al., *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 561–569; d) K. T. Love et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1864–1869.
- [9] E. R. Lee et al., *Hum. Gene Ther.* **1996**, *7*, 1701–1717.
- [10] C. Plank, B. Oberhauser, K. Mechtler, C. Koch, E. Wagner, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 12918–12924.
- [11] A. Zintchenko, A. Philipp, A. Dehshahri, E. Wagner, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1448–1455.
-