
4 Untersuchung und Optimierung der Gentransfereffizienz verschiedener nicht-viraler Vektoren in der Mauslunge

Nicht replizierende Adenoviren und kationische Lipide sind in vergangener Zeit häufig für den Gentransfer in die Lunge *in vivo* verwendet worden. Kationische Polymere, wie verzweigtes 25 kDa Polyethylenimin (PEI) und abgebaute Polyamidoamin Dendrimere wurden für den Gentransfer in die Lunge zu Beginn der Dissertation noch nicht untersucht. Es war bekannt, dass Surfactant-Zubereitungen den durch Adenoviren und nackte Plasmid-DNA vermittelten Gentransfer *in vivo* in die Lunge beeinflussen (Katkin *et al.*, 1997; Raczka *et al.*, 1998). Es sollte daher die Gentransfereffizienz von verzweigtem 25 kDa PEI und abgebauten PAMAM-Dendrimern, sowie der Einfluss einer Surfactant-Zubereitung auf den durch 25 kDa PEI vermittelten Gentransfer *in vivo* untersucht. PEI/DNA Komplexe wurden in 25 mM HEPES Puffer (pH=7,4) oder destillierten Wasser (Ampuwa[®]) generiert und anschließend über einen Venenverweilkatheter in die Lunge von BALB/c Mäusen appliziert. Die Trachea, linke und rechte Lunge, Herz, Leber und Ösophagus wurden auf Luziferase-Aktivität untersucht.

4.1 Gentransfereffizienz von Polyethylenimin (PEI) 25 kDa/DNA Polyplexen nach intratrachealer Applikation

4.1.1 Gentransfereffizienz von PEI 25 kDa/DNA Komplexen generiert in 25 mM HEPES

Das Verhältnis von kationischem Polymer zu Plasmid-DNA beeinflusst die Transfektionseffizienz in der Mauslunge. Komplexe mit variierenden Stoffmengen an Stickstoff (N) des PEI und Phosphat (P) der Plasmid-DNA wurden in 25 mM HEPES-Puffer, pH=7,4, hergestellt, gut gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 50 µl der resultierenden Lösung, 20 µg Plasmid-DNA (pCMVLuc) enthaltend, direkt über einen Venenverweilkatheter intratracheal unter Sichtkontrolle eines Otoskops in die Mauslunge intubiert. Nach der getrennten Entnahme der rechten Lunge, bestehend aus vier Lungenlappen und der linken Lunge, bestehend aus einem Lungenlappen, sowie der Trachea, Leber und Herz 24 Stunden

nach der Intubation und dessen Homogenisieren, wurde die Luziferaseaktivität in dem Gewebeüberstand vermessen.

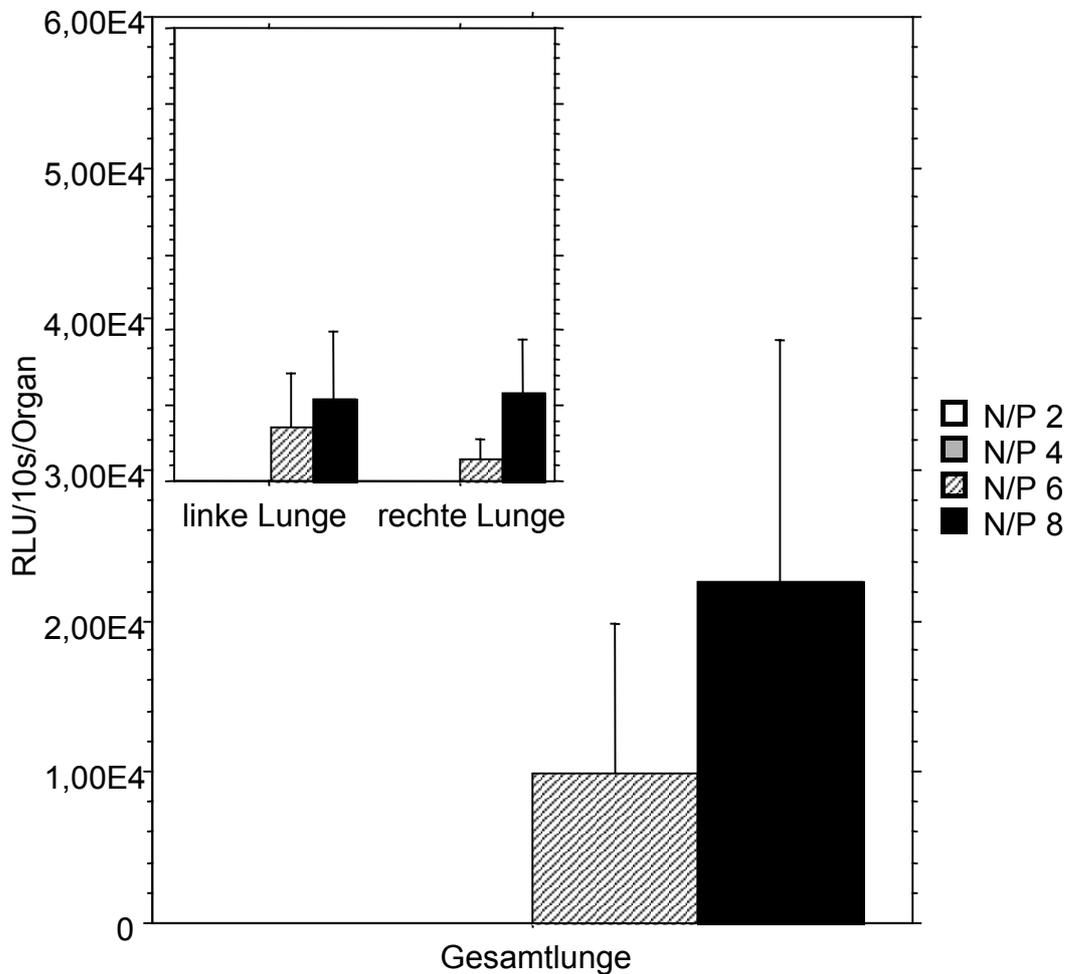


Abb. 46 Gentransfereffizienz von PEI 25 kDa/DNA Komplexen generiert in 25 mM HEPES

Die Transgenexpression steigt mit zunehmendem N/P-Verhältnis an. Bei den N/P-Verhältnissen N/P=2 und 4 wurde keine Luziferaseexpression gemessen. Es gibt keinen signifikanten Unterschied der Luziferase-Aktivität zwischen den beiden Lungenhälften (n=6, \pm S.E.M.)

Die mit PEI/DNA Komplexen intubierten Mäuse zeigten einen Anstieg der Transgenexpression mit zunehmendem N/P-Verhältnis und maximaler Luziferaseexpression bei N/P=8. Es konnte keine Luziferase-Aktivität in der Trachea, Leber oder Herz detektiert werden. Die Intubation nackter Plasmid-DNA zeigte ebenfalls keine Transgenexpression (nicht gezeigt).

4.1.2 Gentransfereffizienz von PEI 25 kDa/DNA Komplexen generiert in dest. Wasser

Das Solvens, in dem die Polyplexe (Komplexe aus kationischem Polymer und DNA) hergestellt wurden, beeinflusste den Gentransfer in die Mauslunge. Wurden die Polyplexe unter Verwendung von PEI unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben in destilliertem Wasser generiert, so erhöht sich die Transgenexpression bei N/P=8 um das 4-fache und erreicht sein Optimum bei N/P=10, an dem die Transgenexpression 20-fach höher war als bei N/P=8 in HEPES-Puffer ($P < 0,05$). Bei einem N/P-Verhältnis von N/P=12 sank die Transgenexpression wieder ab. Ebenfalls konnte keine Transgenexpression bei Intubation nackter Plasmid-DNA gemessen werden. Unterschiede zwischen der rechten und der linken Lunge waren statistisch nicht signifikant.

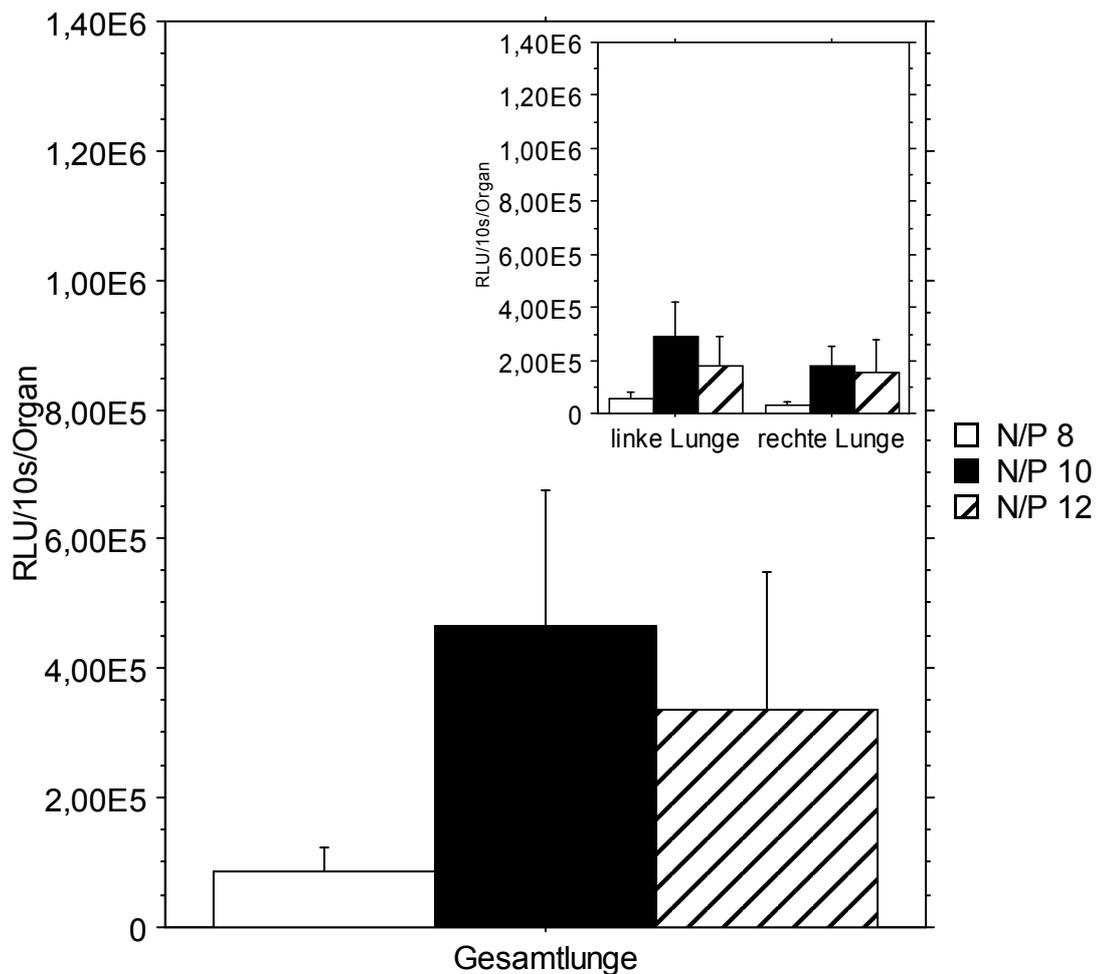


Abb. 47 Gentransfereffizienz von PEI 25 kDa/DNA Komplexen generiert in dest. Wasser

Die Luziferaseexpression zeigt bei N/P=10 ein Maximum. Es gibt keinen signifikanten Unterschied der Luziferase-Aktivität zwischen den beiden Lungenhälften ($n=6, \pm S.E.M.$).

4.1.3 Der Einfluss von Surfactant auf die Gentransfereffizienz von PEI/DNA Komplexen

Es war bekannt, dass Phospholipidgemische, wie der Lungensurfactant, aufgrund der oberflächenspannungs-reduzierenden Eigenschaft, sehr gute Spreitungseigenschaften besitzen, d.h. Flüssigkeiten sehr gut als dünnen Film über Oberflächen verteilt. Diese Spreitungseigenschaften sollten, bei Zusatz von Surfactant-Zubereitungen zu den intubierten Polyplex-Lösungen, deren schnelle und homogene Verteilung über das Lungenepithel bewirken und dadurch die Transgenexpression steigern. 10 µl einer natürlichen Surfactant-Zubereitung, Alveofact, wurden nach Inkubation der PEI Polyplexe (N/P=10), direkt vor der Intubation der Mäuse, den Polyplex-Lösungen zugesetzt, und die Transgenexpression nach 24 Stunden, wie oben beschrieben, vermessen. Die Transgenexpression war um 35% gegenüber PEI Polyplexen ohne Surfactant-Zusatz reduziert, jedoch war die Reduktion nicht statistisch signifikant. Der Surfactant-Zusatz scheint einen Vorteil bezüglich der Verträglichkeit der Applikationsmethode aufzuweisen. So zeigten die Mäuse nach Surfactant-Zusatz zu den Polyplex-Lösungen weniger Husten und Atemnot als die Mäuse ohne Surfactant-Zusatz und tolerierten folglich das applizierte Flüssigkeitsvolumen besser.

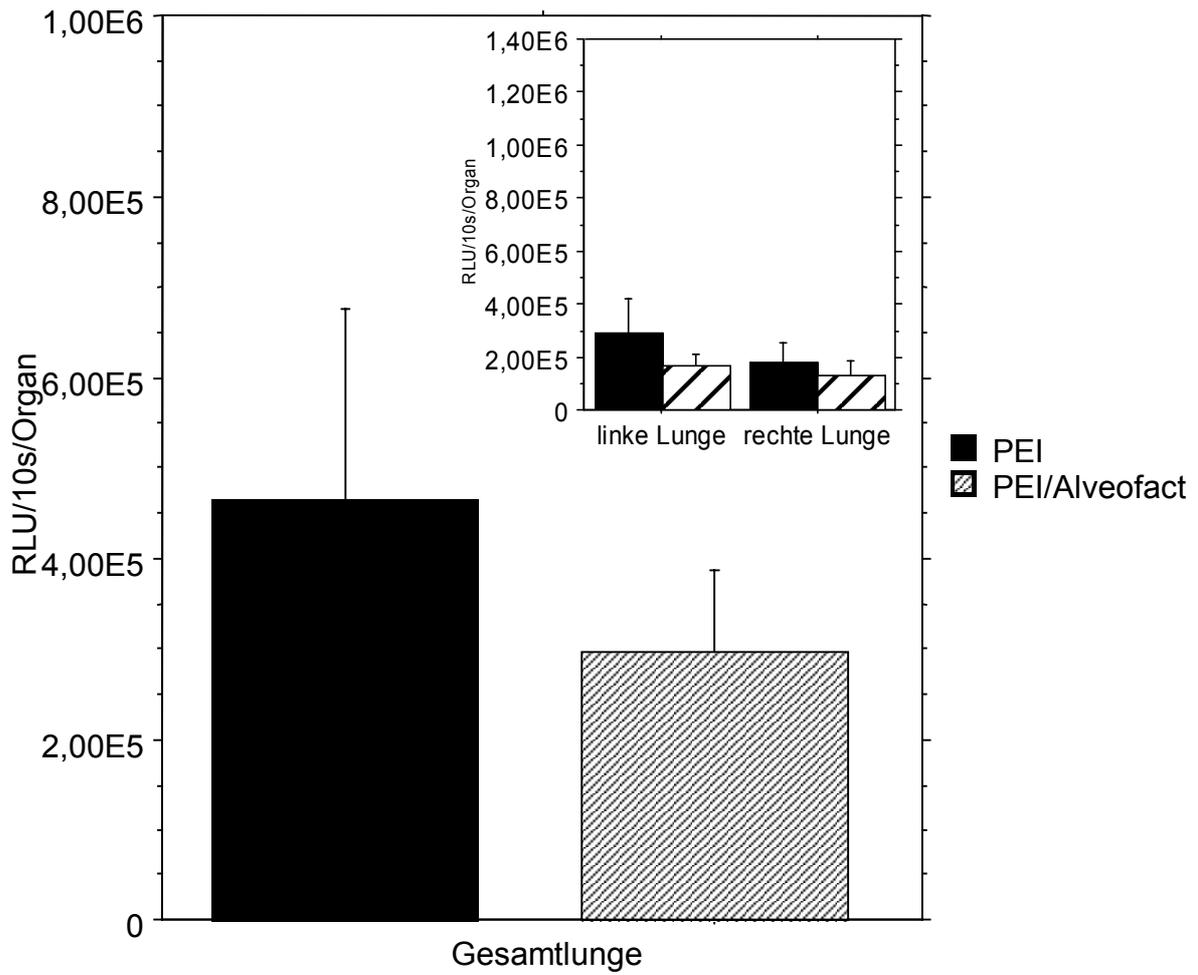


Abb. 48 Der Einfluss von Surfactant auf die Gentransfereffizienz von PEI/DNA Komplexen

Die Luziferaseexpression ist in der Anwesenheit von Surfactant leicht reduziert. Es gibt keinen signifikanten Unterschied der Luziferase-Aktivität zwischen den beiden Lungenhälften (n=7, \pm S.E.M.)

4.1.3.1 Der zeitliche Verlauf der Transgenexpression vermittelt durch PEI/DNA Komplexe

Für die Behandlung von Erbkrankheiten, wie die Zystische Fibrose, ist eine dauerhafte Expression des zugeführten Transgens wünschenswert. Mäuse wurden wie oben beschrieben mit PEI/DNA Komplexen N/P=10, generiert in dest. Wasser, intubiert und die Luziferase-Aktivität nach 24, 48, 72 und 168 Stunden vermessen. Die Transgenexpression 2, 3 und 7 Tage nach Polyplex Intubation fiel auf 80, 37 und 3% der Transgenexpression, die 24 Stunden nach Intubation gemessen wurde. Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass die durch PEI vermittelte Transgenexpression in der Mauslunge nur transienten Charakters war und eine Halbwertszeit von ca. 24 Stunden aufwies. Eine Woche nach Intubation der Mäuse war die Transgenexpression nahezu erloschen.

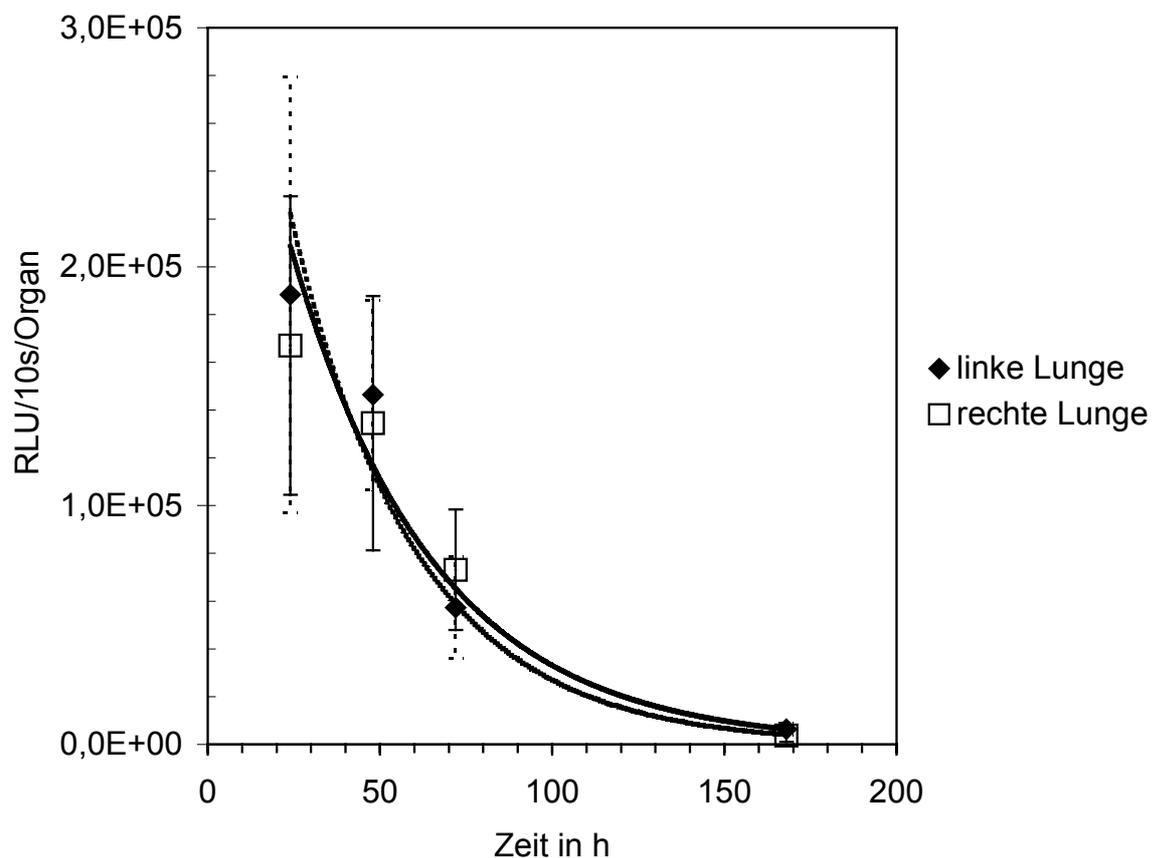


Abb. 49 Der zeitliche Verlauf der Transgenexpression vermittelt durch PEI/DNA Komplexe

Die Transgenexpression 2, 3 und 7 Tage nach Polyplex Intubation fiel auf 80, 37 und 3% der Transgenexpression, die 24 Stunden nach Intubation gemessen wurde (n=7, \pm S.D.)

4.1.4 Vergleich der Gentransfereffizienz von PEI/DNA Polyplexen mit GL-67/DNA Lipoplexen

Um die von PEI 25 kDa vermittelte Gentransfereffizienz besser einschätzen zu können, wurde dessen Gentransfereffizienz mit der des kationischen Lipids GL67:DOPE:DMPE-PEG(5000) (kurz GL-67, Genzyme) verglichen. Dieses kationische Lipid ist in der Literatur als sehr effizient beschrieben (Lee *et al.*, 1996) und wurde bereits in einer plazebo-kontrollierten klinische Phase I Doppelblindstudie bei Zystischer Fibrose mit relativem Erfolg eingesetzt. Die pathologische Potentialdifferenz in den Atemwegen konnte transient um 25% in Richtung physiologische Normalwerte korrigiert werden (Alton *et al.*, 1999).

Die durch das kationische Lipid GL-67 vermittelte Gentransfereffizienz war 20-fach niedriger verglichen mit der von PEI 25 kDa. Dieses Ergebnis zeigte, dass PEI 25 kDa effizient Gentransfer *in vivo* nach intratrachealer Applikation vermittelte.

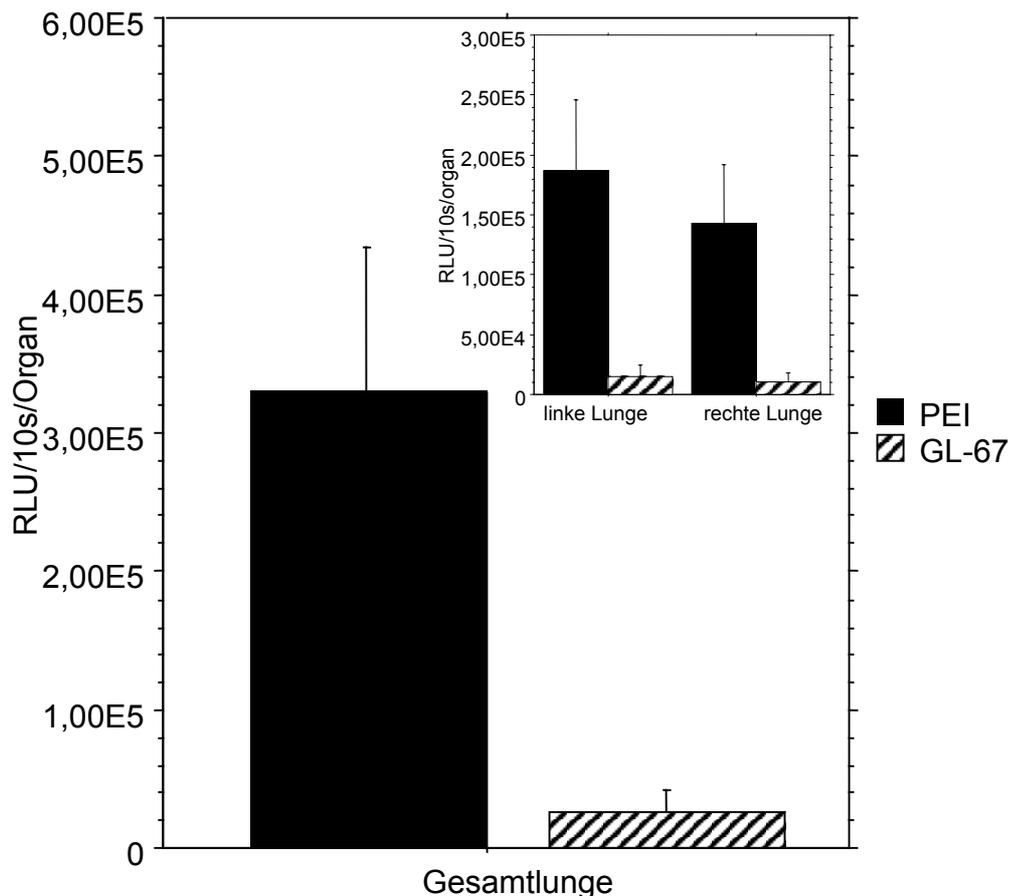


Abb. 50 Vergleich der Gentransfereffizienz von PEI/DNA Polyplexen mit GL-67/DNA Lipoplexen

Die durch das kationische Lipid GL-67 vermittelte Gentransfereffizienz ist 20-fach niedriger verglichen mit der von PEI 25 kDa ($n=7$, \pm S.E.M., $p=0,05$). Es gibt keinen signifikanten Unterschied der Luziferase-Aktivität zwischen den beiden Lungenhälften.

4.1.5 Analyse der inflammatorischen Antwort in der Mauslunge mittels Histologie

Das Vorkommen von Entzündungserscheinungen nach Intubation der Mäuse mit PEI/DNA-Komplexen, DNA alleine, PEI alleine und nicht behandelten Mäuse wurde untersucht.

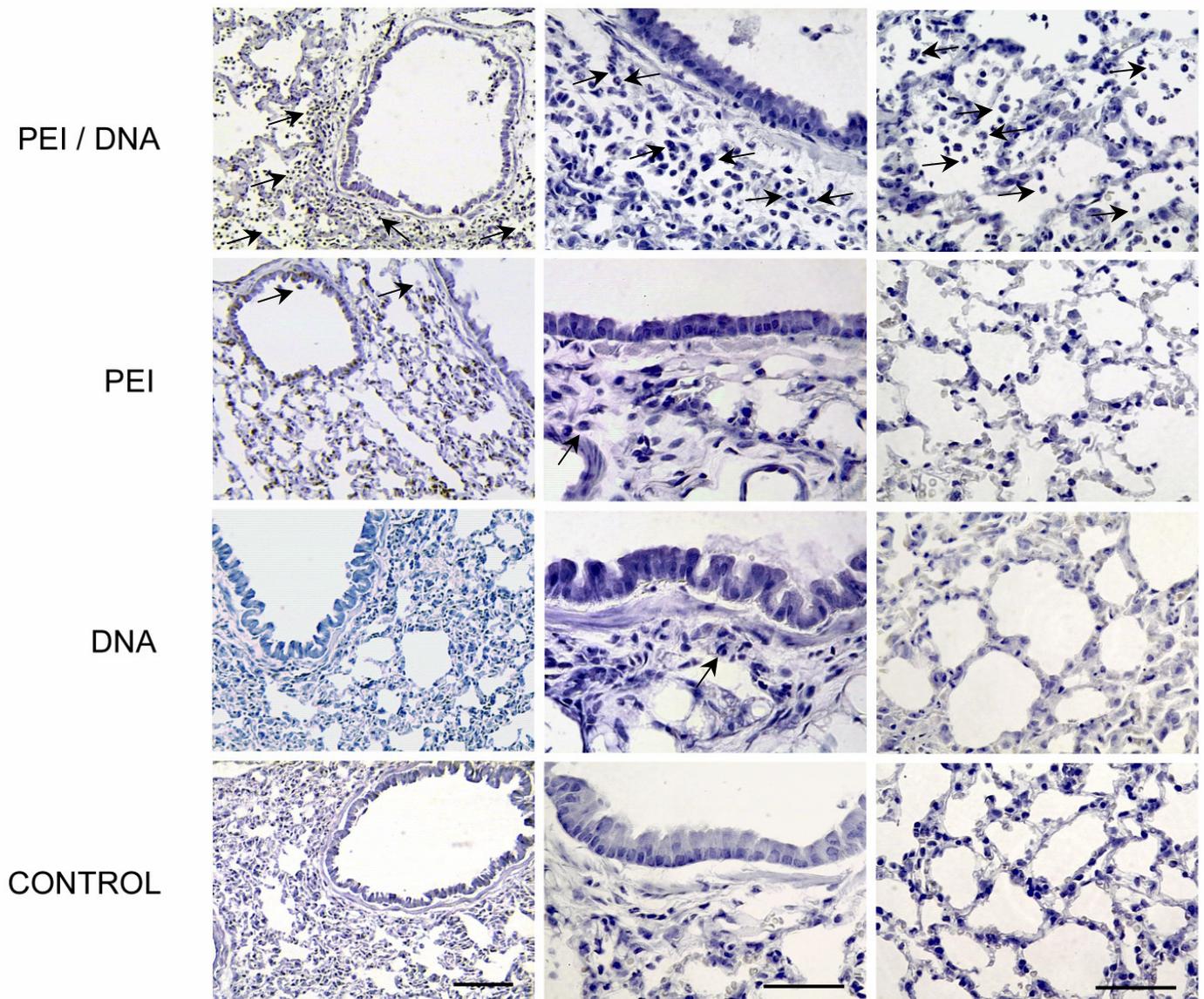


Abb. 51 Analyse der inflammatorischen Antwort in der Mauslunge mittels Histologie

Niedrige Vergrößerung, Bronchiolen und Alveolarregion der Versuchstiere. Hämatoxylin gefärbte Lungenschnitte (5µm) unter folgenden Bedingungen: (obere Reihe) Tiere denen PEI/DNA Polyplexe generiert in dest. Wasser (N/P=10) appliziert wurde (20µg DNA/26,1 µg PEI), (zweite Reihe) Tiere denen PEI alleine appliziert wurde (26,1 µg PEI in dest. Wasser), (dritte Reihe) Tiere denen DNA alleine appliziert wurde (20,0 µg DNA in dest. Wasser) und unbehandelte Tiere (vierte Reihe). Balken, niedrige Vergrößerung=100 µm (linke Spalte); große Vergrößerung Bronchioli, Alveolargebiet=50 µm (mittlere und rechte Spalte) (Pfeile zeigen Neutrophilen)

Schwere Infiltration von Immunzellen, die von Neutrophilen dominiert war, begleitet von Ödemen, die hauptsächlich in der Alveolarregion vorkamen, wurde multifokal über das gesamte Gewebe der Mauslunge beobachtet, wenn die Mäuse mit PEI/DNA-Komplexen (N/P=10) intubiert wurden. Mäuse, die nur mit PEI behandelt wurden, zeigten weniger Inflammation und nur wenig Neutrophileninfiltration in der Nähe der Bronchi. Ebenso zeigten die nur mit nackter Plasmid-DNA intubierten Mäuse deutlich weniger Neutrophileninfiltration in der Umgebung der Bronchi und in der Alveolarregion verglichen mit den PEI/DNA behandelten Tieren.

4.2 Gentransfereffizienz von abgebauten Polyamidoamin-Dendrimer/DNA Polyplexen generiert in 25 mM HEPES

Abgebaute Dendrimere könnten nach *in vitro* Daten (Ernst *et al.*, 1999) eine potentielle Alternative zu herkömmlichen synthetischen Vektoren für den Gentransfer *in vivo* darstellen. Dendrimer/ DNA Polyplexe wurden bei N/P=4,7 und N/P=6 in dest. Wasser generiert und unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben Mäusen intubiert. Die gemessene Luziferase-Aktivität der Polyplexe bei N/P=4,7 war 130-fach niedriger als die gemessene Aktivität der PEI Polyplexe bei N/P=10, generiert in dest. Wasser. Die Transgenexpression der Dendrimer Polyplexe bei N/P=6 war sogar um das ca. 15000-fache gegenüber den PEI Polyplexen in dest. Wasser bei N/P=10 reduziert ($p < 0,01$). Auch zeigte nackte Plasmid DNA keine Genexpression. Der Versuch der Generierung von Dendrimer/DNA Polyplexen bei höheren N/P-Verhältnissen, wie bei den PEI Polyplexen, schlug aufgrund von Löslichkeitsproblemen, d.h. Präzipitation der Polyplexe, fehl.

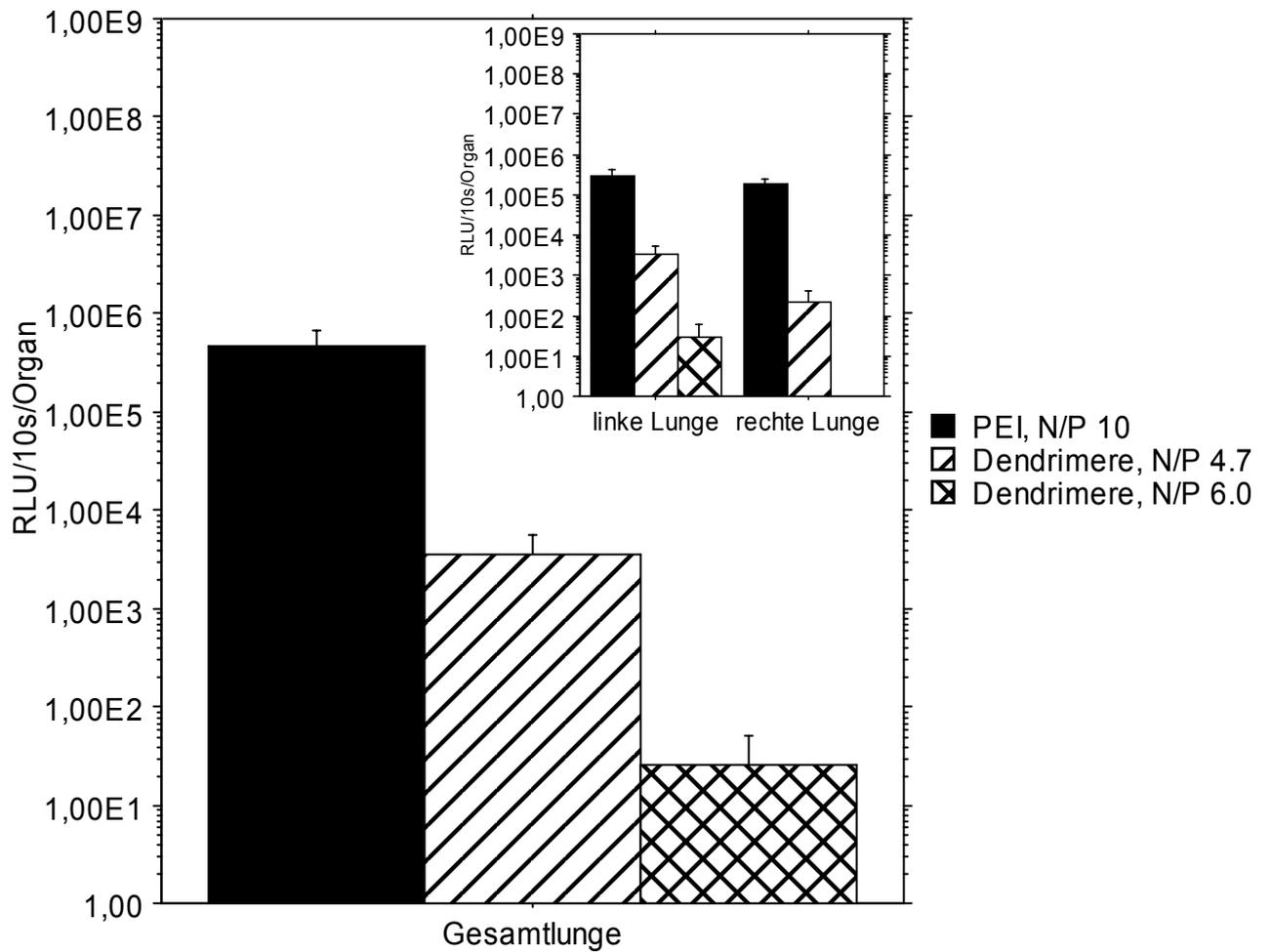


Abb. 52 **Gentransfereffizienz von abgebauten Polyamidoamin-Dendrimer/DNA Komplexen generiert in 25 mM HEPES im Vergleich zu PEI/DNA Komplexen (dest. Wasser)**

Die gemessene Luziferase-Aktivität der Dendrimer/DNA Komplexe bei N/P=4,7 war 130-fach und bei N/P=6 15000-fach niedriger als die gemessene Aktivität der PEI Polyplexe bei N/P=10, generiert in dest. Wasser (n=6 für N/P=4,7 und n=5 für N/P=6, \pm S.E.M., $p < 0,01$).

4.3 Gentransfereffizienz von PEI/DNA Polyplexen umhüllt von protektiven PEG-basierten Hüllpolymeren

Ein großes Problem bei der Verwendung nicht-viraler Genvektoren ist deren Interaktion mit Blutbestandteilen (Dash *et al.*, 1999; Finsinger *et al.*, 2000; Ogris *et al.*, 1999; Plank *et al.*, 1996), bzw. Bestandteilen des Bronchialsekretes, das das Bronchialepithel bedeckt. Um zu überprüfen, ob ein Schutz mittels protektiver Kopolymere auf Basis von Polyethylenglykol (PEG) möglich war, wurden PEI/DNA Komplexe und PEGylierte PEI/DNA Komplexe mit Bronchoalveolärer Lavage Fluid (BALF) inkubiert und anschließend die auf den Genvektoren adsorbierten Glykoproteinbestandteile, wie z.B. Mucine mit Hilfe von Filtration durch 220 nm Filterröhrchen aufgeschlossen und analysiert. Die protektiven Kopolymere bestanden aus über Glutaminsäuren kopolymerisierten PEG-Einheiten unterschiedlichen Molekulargewichts (3400 und 6000 Da) und wurden von Herrn Dr. Plank synthetisiert und zur Verfügung gestellt (Finsinger *et al.*, 2000). Die negativ geladenen protektiven Kopolymere wurden nach der PEI/DNA Komplexbildung den Komplexen zugesetzt und banden über elektrostatische Kräfte an den vorgeformten positiv geladenen Genvektorkomplex, reduzierten deren Oberflächenladung und bewirkten sterische Stabilisierung, d.h. verhinderten Komplexaggregation (Finsinger *et al.*, 2000).

BALF wird durch Bronchoskopie gewonnen und beinhaltet alle Bestandteile, die im Bronchialsekret vorkommen (Widdicombe). In Abb. 54 repräsentiert das Filtrat (F) die Fraktion der BALF Bestandteile, die nicht auf den Genvektoren adsorbierten (als Filtrat wird die Fraktion bezeichnet, die nach der Zentrifugation der inkubierten Genvektoren durch den Filter gegangen ist) und Eluat (E) die Fraktion der BALF Bestandteile, die auf den Genvektoren adsorbierten (als Eluat wird die Fraktion bezeichnet, die mittels SDS, die auf dem Filter zurückgebliebenen Bestandteile eluiert). Es war zu erkennen, dass bei den Kopolymer geschützten Genvektoren, wie bei der Kontrolle, BALF Bestandteile nur in der Filtrat Fraktion nicht aber in der Eluat Fraktion zu finden waren. Im Gegensatz dazu, war ein merklicher Spot in der Eluat Fraktion der ungeschützten PEI/DNA Komplexe zu sehen. Dieses ließ darauf schließen, dass durch die Kopolymere ein effektiver Schutz der Genvektoren vor Interaktion mit BALF Bestandteilen induziert wurde. Analoge Ergebnisse wurden von Frau Dr. Gessner beobachtet, wenn die geschützten und nicht geschützten Genvektoren jeweils mit heparinisiertem Plasma inkubiert wurden und anschließend in dem selben Filtrationsprozess aufgeschlossen wurden und per 2 DE-Gelelektrophorese analysiert wurden (Gessner, 2001). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Kopolymer umhüllten PEI/DNA Komplexe vor der Interaktion mit Bestandteilen des Bronchialsekretes geschützt waren.

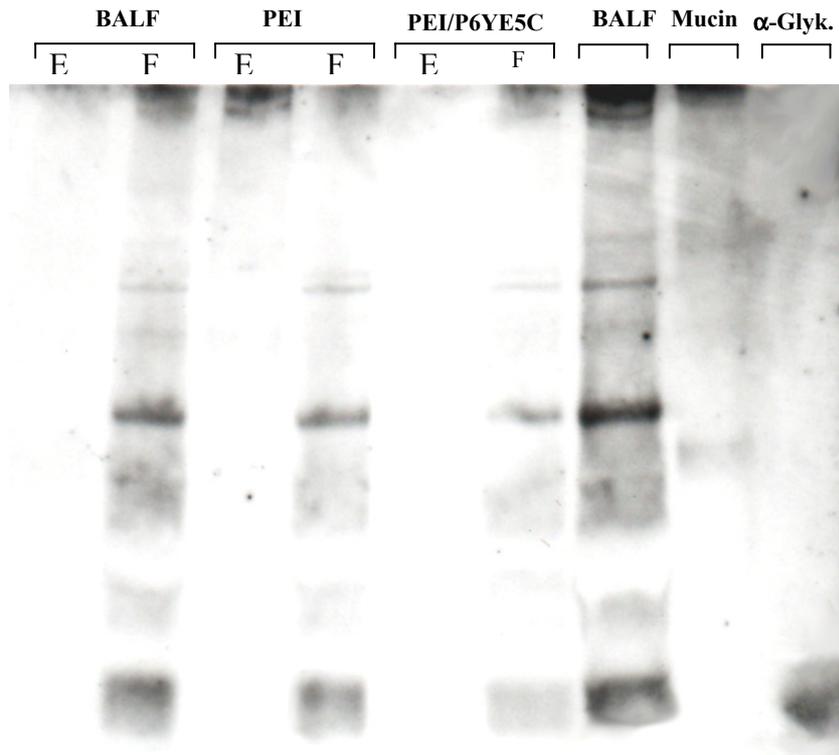


Abb. 53 **Untersuchung der adsorbierenden Glykoproteinbestandteile der BALF auf geschützten und nicht geschützten Genvektoren**

Bei den Kopolymer geschützten Genvektoren (PEI/P6YE5C), sowie bei der Kontrolle (BALF) ist kein Glykoprotein in der Eluat Fraktion zu finden. Im Gegensatz dazu, ist ein merklicher Spot in der Eluat Fraktion der ungeschützten PEI/DNA Komplexe zu sehen. Dieses zeigt, dass durch die Kopolymere ein effektiver Schutz der Genvektoren vor Interaktion mit BALF Bestandteilen induziert wird. Ebenfalls, als Vergleich, sind BALF ohne Filtrationsprozess, sowie Mucin (als Bestandteil der BALF) und α -Glykoprotein (als seröser Bestandteil der BALF) aufgetragen. Es ist zuerkennen, dass hauptsächlich Mucine auf den Komplexen adsorbieren.

Die Kopolymer geschützten PEI/DNA Polyplexe wurden Mäusen intratracheal appliziert, um den Einfluss der PEG-Hülle auf die Gentransfereffizienz *in vivo* zu untersuchen. Die Gentransfereffizienz der Kopolymer geschützten PEI/DNA Polyplexe nahm mit Zunahme des Molekulargewichts der PEG-Untereinheiten ab. Die mit dem 3400-PEG geschützten Genvektoren vermittelten 15-fach und die mit dem 6000-PEG geschützten Genvektoren 70-fach niedrigere Transgenexpression verglichen mit der von PEI/DNA Komplexen. Die beobachtete Reduktion der Gentransfereffizienz könnte auf die beschriebene Reduktion des Zetapotenzials der Kopolymer geschützten PEI/DNA Komplexe zurückzuführen sein. Zwar führte dieser Effekt einerseits zu einer erwünschten verminderten Interaktion der Kopolymer

geschützten PEI/DNA Komplexe mit BALF Bestandteilen andererseits war es anzunehmen, dass die Reduktion des Zetapotenzials auch zu einer verminderten Interaktion mit der Zelloberfläche führte. Diese verringerte Interaktion mit der Zelloberfläche implizierte eine verminderte Endozytoserate der Genvektoren, gefolgt von verminderter Gentransfereffizienz. Um dieses Problem zu umgehen, wurde als nächstes versucht, den Gentransfer in die Lunge über rezeptor-vermittelte Endozytose zu optimieren.

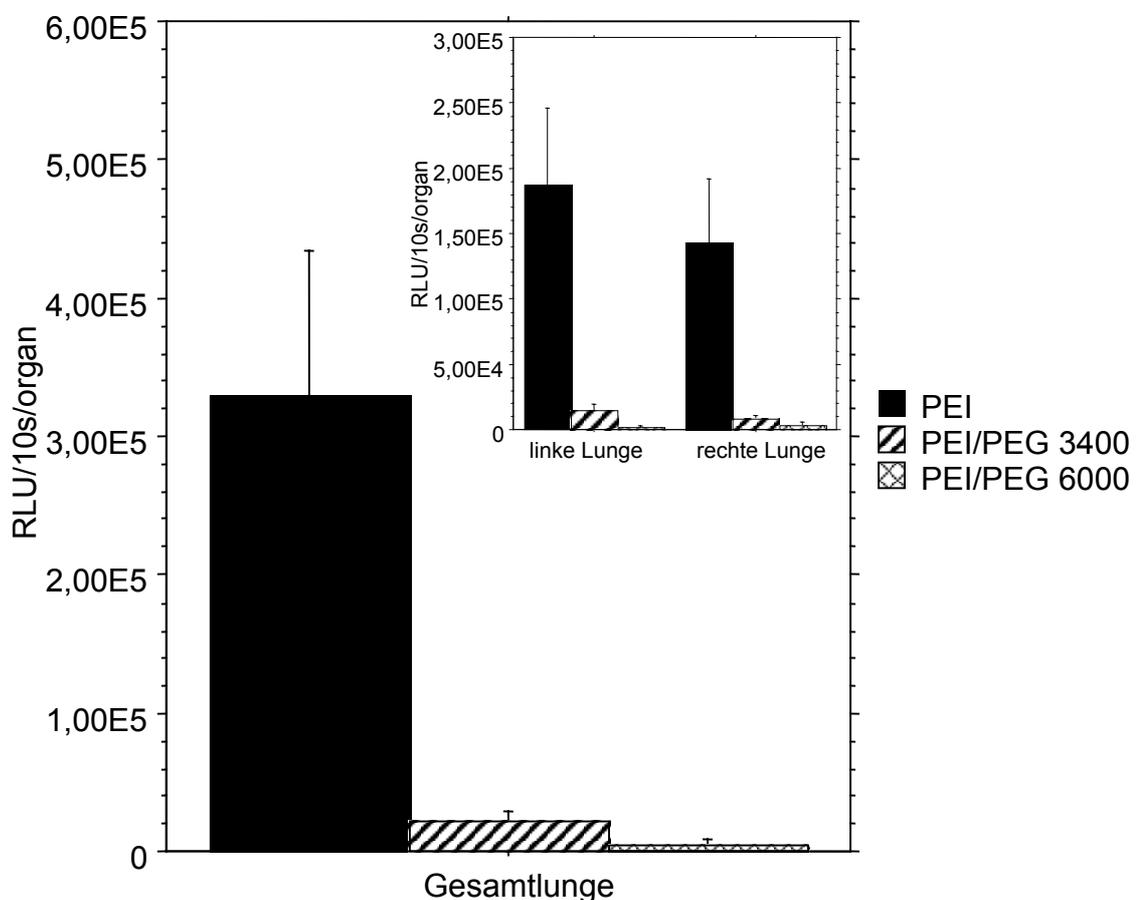


Abb. 54 Gentransfereffizienz von PEI/DNA Polyplexen umhüllt von protektiven PEG-basierten Hüllpolymeren

Die mit dem 3400-PEG geschützten Genvektoren vermittelten 15-fach und die mit dem 6000-PEG geschützten Genvektoren 70-fach niedrigere Transgenexpression verglichen mit der von PEI/DNA Komplexen (n=7, \pm S.E.M.)

4.4 Gentransfereffizienz von Transferrin-PEI/DNA Polyplexen für den zielgerichteten, rezeptorvermittelten Gentransfer

In der Literatur ist beschrieben, dass die Kombination von Genvektoren mit Liganden, die gezielt rezeptor-vermittelte Endozytose ermöglichen, die Gentransfereffizienz stark gesteigert werden konnte (Erbacher *et al.*, 1999b; Kircheis *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2000). Insbesondere wurde von der Gruppe Wagner gezeigt, dass die chemische Konjugation von Transferrin an PEI 25 kDa den gezielten Gentransfer in Transferrin-Rezeptor überexprimierende subkutan implantierte Neuro2a Tumoren in einem Mausmodell nach i.v. Applikation zuließ (Kircheis *et al.*, 2001). Die Transgenexpression in den Tumoren war 100-500-fach höher als in den Hauptorganen, wie z.B. der Lunge, die im Allgemeinen die höchste Transgenexpression nach i.v. Injektion von Genvektoren zeigt, da sie das erste Kapillarbett darstellt, das von den Genvektoren nach i.v. Applikation in die Schwanzvene passiert wird (Zou *et al.*, 2000). Darüber hinaus wurde Transferrin modifiziertes Poly-L-Lysin und kationische Lipide erfolgreich verwendet, primäres Atemwegsepithel *in vitro* zu transfizieren (Harris *et al.*, 1993). Diese Ergebnisse ließen die Frage aufkommen, ob durch Transferrin modifiziertes PEI (Tf-PEI) die Gentransfereffizienz in der Lunge gesteigert werden könnte. Aus diesem Grund wurde Transferrin-modifiziertes PEI als Genvektor intratracheal Mäusen appliziert. Das Transferrin-PEI Konjugat wurde von Herrn Dr. Plank synthetisiert und zur Verfügung gestellt (nach Methode von Kircheis 2001). Durchschnittlich zwei Transferrin Moleküle waren pro PEI Molekül konjugiert. Die Gentransfereffizienz der Transferrin modifizierten PEI Genvektoren war 10-fach niedriger als die Gentransfereffizienz unmodifizierter PEI Genvektoren. Die zusätzliche Kombination mit PEG-basierten Kopolymeren reduzierte die Gentransfereffizienz um das 18-fache verglichen mit unmodifiziertem PEI.

Ein möglicher Grund für die unerwartete Reduktion der Gentransfereffizienz der Transferrin modifizierten PEI Genvektoren könnte an der Anzahl und Verteilung der Transferrin-Rezeptoren in der Lunge zu suchen sein. Auf dem Atemwegsepithel ist der Transferrin-Rezeptor nur in relativ geringerem Maße exprimiert, während starke Expression des Transferrin-Rezeptors auf Alveolar Typ II Zellen und Lungenmakrophagen beschränkt ist (Hirata *et al.*, 1986; McGowan *et al.*, 1984; Widera *et al.*, 2001; Wyllie, 1977). Gerade aber diese Zellen sind, von der Anzahl her, seltener in der Lunge vertreten als Atemwegsepithelzellen. Als Folge dessen, könnten gezielt Alveolar Typ II Zellen und Lungenmakrophagen transfiziert worden sein, da aber ihre Anzahl niedrig ist, war das Gesamtniveau der Transgenexpression gegenüber unmodifizierten PEI Genvektoren niedriger. Die Gentransfereffizienz der PEG umhüllten Transferrin-PEI Komplexe war 8-fach niedriger als der nicht umhüllten Transferrin-PEI Komplexe. Dieses könnte auf die PEG-Hülle zurück zu führen sein,

die das Transferrin des Komplexes maskierte und folglich die Gentransfereffizienz inhibierte.

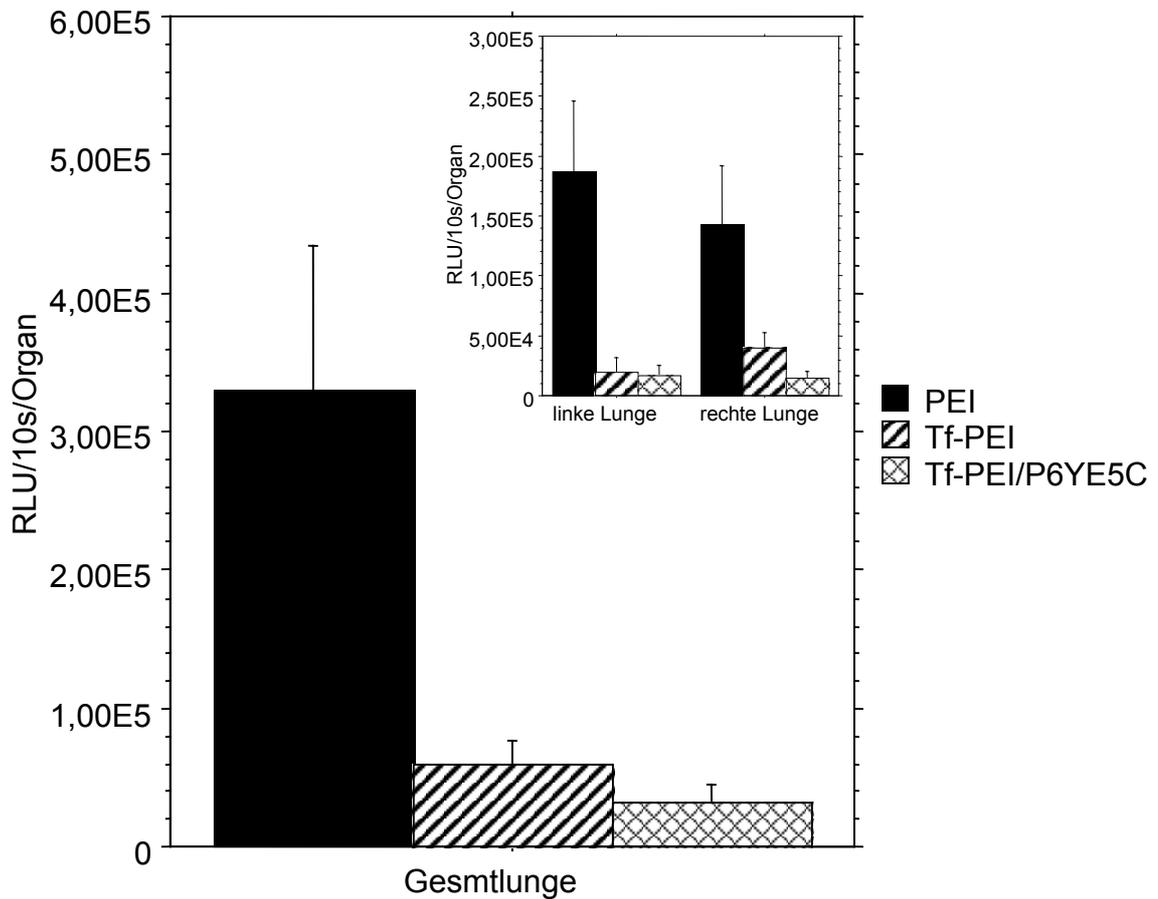


Abb. 55 Gentransfereffizienz von Transferrin-PEI/DNA Polyplexen für den zielgerichteten, rezeptorvermittelten Gentransfer

Die Gentransfereffizienz der Transferrin modifizierten PEI Genvektoren war 10-fach und die der PEG-Transferrin-PEI Genvektoren 18-fach niedriger als die Gentransfer unmodifizierter PEI Genvektoren (n=7, \pm S.E.M.)

4.5 Gentransfereffizienz von ternären TAT₂/DNA/PEI Polyplexen unter verschiedenen Bedingungen nach intratrachealer Applikation

In Abschnitt 3.9 wurde gezeigt, dass die TAT-Oligomere und insbesondere das dimere TAT-Peptid die Gentransfereffizienz von herkömmlichen nicht-viralen Genvektoren *in vitro* stark verbessern konnten (800-fach). Darüber hinaus wurde in den Abschnitten 4.1-3 gezeigt, dass PEI 25 kDa der effizienteste verschiedener kationischer Genvektoren für die intratracheale Applikation in die Mauslunge war. Um die Gentransfereffizienz weiter zu optimieren, sollten die Ergebnisse aus diesen beiden Abschnitten zusammengeführt werden und die Gentransfereffizienz *in vivo* ternärer Gentransferkomplexe bestehend aus TAT₂, Plasmid-DNA und PEI nach intratrachealer Applikation in die Mauslunge untersucht werden. Die intratracheale Applikation von PEI/DNA Polyplexen, die in dest. Wasser generiert wurden, zeigten das größte Potential Gentransfer in die Mauslunge zu vermitteln. Es wurden deshalb die ternären Komplexe in dest. Wasser generiert. DNA wurde mit TAT₂ bei N/P=1 komplexiert und nach 10 min. Inkubation PEI entsprechend N/P=10 hinzu gegeben. Die Formulierung blieb klar und keine Trübung wurde beobachtet.

Die Kombination der PEI/DNA Polyplexe mit dem TAT₂-Oligomer zeigten keinen Effekt auf die Gentransfereffizienz. Das Niveau der Genexpression war mit dem von PEI/DNA Polyplexen ohne TAT₂-Oligomer vergleichbar (Abb. 56). Dieselben Ergebnisse wurden für die Kombination aus pLA, DNA und PEI beobachtet (Abb. 56). Für die Beurteilung dieses Ergebnisses ist anzumerken, dass zu diesem Zeitpunkt die Ergebnisse zu den Zetapotenzialen der TAT-Oligomer/DNA Komplexe bei den entsprechenden N/P-Verhältnissen aus Abschnitt 3.3.3 noch nicht bekannt waren, die gezeigt haben, dass bei N/P=1 mit dem verwendeten dest. Wasser die TAT-Oligomer/DNA Komplexe im Gegensatz zu HBS bereits positiv geladen waren. Zu diesem Zeitpunkt wurde vielmehr angenommen, dass die Abwesenheit von Salz eine Aggregation der Komplexe gefolgt von dem Einschluss der TAT-Oligomere in die aggregierenden Komplexe verhinderte, und deshalb kein Effekt *in vivo* beobachtbar war. In einem neuen Versuchssetting sollten daher die ternären Komplexe, wie bei den erfolgreichen *in vitro* Versuchen, in HBS generiert werden mit dem vermeintlichen Risiko, dass größere Komplexe verminderte Effizienz zeigen könnten. Die Formulierung der ternären Komplexe in HBS stellte sich jedoch als großes Problem heraus. Bei der Zugabe der DNA-Lösung zu der TAT₂-Lösung kam es zur sofortigen Präzipitation der Komplexlösung und Verstopfen der Pipettenspitze. Das Generieren der ternären Komplexe in dem für die *in vivo* Applikation geforderten Konzentrationen war folglich aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht möglich. Um trotzdem Aggregation zu induzieren, die jedoch nicht von Präzipitation begleitet war, wurden die TAT₂/DNA Komplexe in dest. Wasser generiert, aber die PEI Lösung in HBS

hinzu pipettiert. Unter diesen Bedingungen, wurde keine Trübung weder Präzipitation beobachtet. Die Komplexe zeigten unter diesen Bedingungen eine Größe von ca. 250 nm, d.h. waren folglich größer als in dest. Wasser.

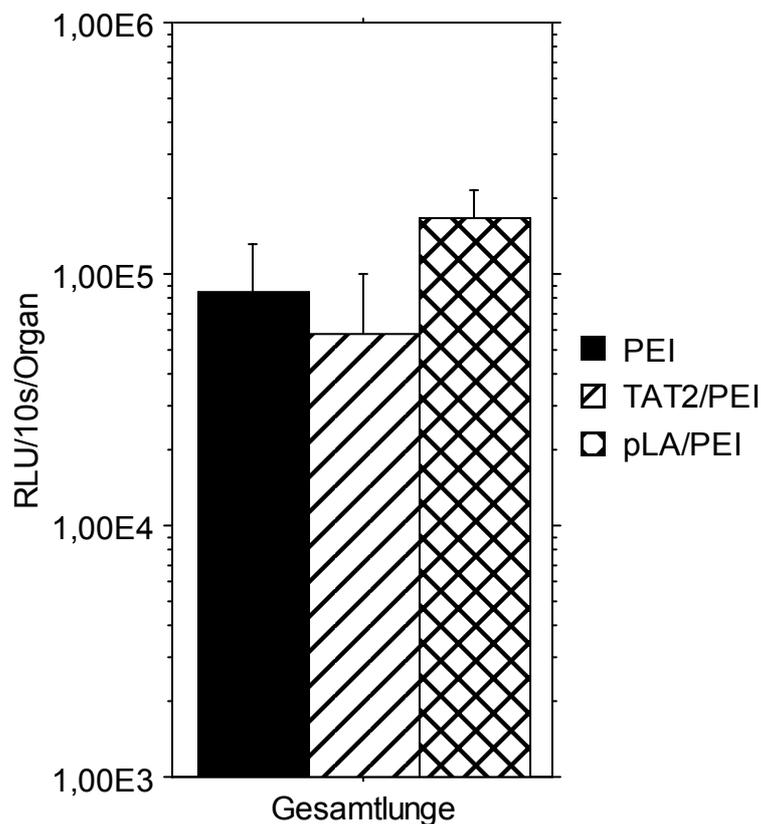


Abb. 56 Gentransfereffizienz ternärer Komplexe generiert in dest. Wasser in der Mauslunge

Die Kombination von PEI/DNA Polyplexen mit dem TAT₂-Oligomer zeigten keinen Effekt auf die Gentransfereffizienz. Das Niveau der Genexpression der ternären Komplexe war mit dem von PEI/DNA Polyplexen ohne TAT₂-Oligomer vergleichbar. Die selben Ergebnisse wurden für die Kombination aus pLA, DNA und PEI beobachtet (n=5, ±S.E.M.)

Unter diesen Bedingungen steigerte TAT₂ die Gentransfereffizienz um das 4-fache verglichen mit PEI (in dest. Wasser), während pLA die Gentransfereffizienz nur um das 2-fache steigerte. Die veränderte Formulierung zeigte folglich einen Erfolg und die prinzipielle Möglichkeit durch Kombination von PEI/DNA Komplexen mit dem TAT₂-Oligomer den Gentransfer *in vivo* zu steigern.

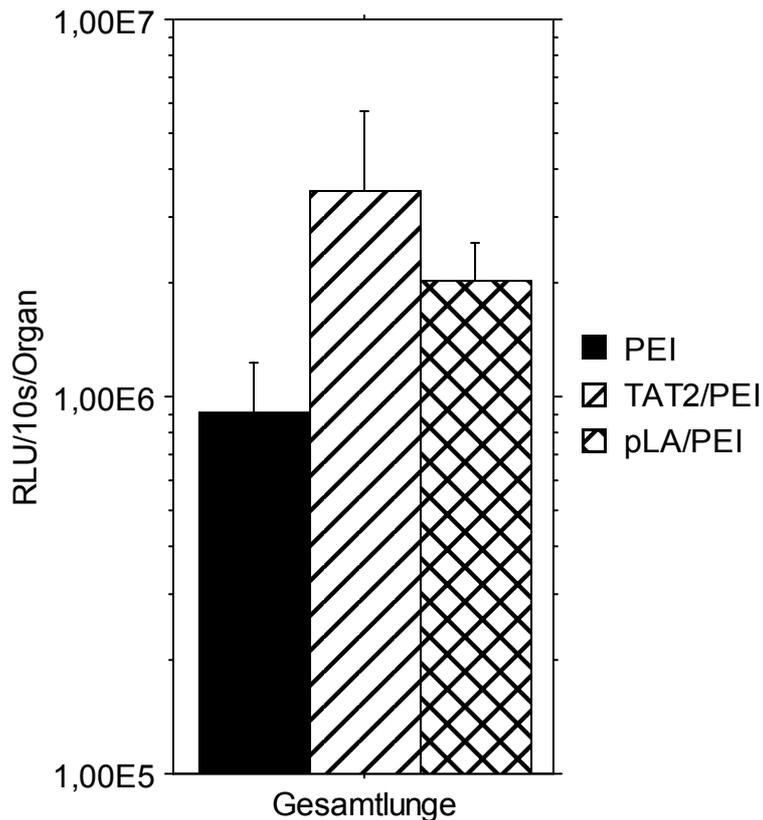


Abb. 57 Gentransfereffizienz ternärer Komplexe in der Mauslunge: TAT₂/DNA generiert in dest. Wasser und Zugabe von PEI in HBS

DNA wurde in dem ersten Schritt durch TAT₂ bzw. pLA in dest. Wasser komplexiert und anschließend PEI in HBS hinzu gegeben. TAT₂ verbesserte die Gentransfereffizienz von PEI/DNA Polyplexen um das 4-fache, während pLA die Gentransfereffizienz nur um das 2-fache steigerte (n=5, ±S.E.M.).

In einem weiteren Versuchsansatz sollte versucht werden, ternäre Komplexe zu generieren, die in salzfreiem Medium nach dem ersten Komplexierungsschritt ein negatives Zetapotenzial aufzeigten, aber bei höheren Konzentrationen nicht ausfallen. In Abschnitt 3.3.3 wurde gezeigt, dass das zuvor verwendete dest. Wasser einen pH-Wert von pH=5,5 aufwies und das folglich die Komplexe bereits bei N/P=1 positiv geladen waren. Messungen unter den selben Bedingungen, mit dest. Wasser pH=6,8 zeigten dass die Komplexe auch in dest. Wasser mit einem negativen Zetapotenzial formuliert werden konnten (c(DNA)=10µg/ml). Der Versuch bei höheren Konzentrationen (c(DNA)=25µg/ml) mit dest. Wasser unterschiedlichen pH-Wertes die Komplexe auf ein negatives Zetapotenzial einzustellen erwies sich jedoch als nicht möglich (Dieses war vermutlich auf die höhere Konzentration der DNA und des Peptids zurückzuführen). Diese Tatsache erforderte den Zusatz eines Puffers. Um jedoch Aggregation zu unterbinden sollte dessen Konzentration möglichst niedrig

gehalten werden. Die Verwendung eines 2 mM HEPES Puffers pH=8,5 ermöglichte unter diesen Bedingungen die Einstellung eines negativen Zetapotenzials, wie dieses die Komplexe in HBS zeigten ohne zeitabhängige Aggregation (TAT₂/DNA N/P=1 - 27,8±2,6 mV (320±104nm); pLA/DNA N/P=1 -30,9±7,6 mV (260±72nm)). Die Zugabe von der entsprechenden Stoffmenge PEI führte zu der erwarteten Umkehr des Zetapotenzial ins Positive (TAT₂/DNA/PEI 32,7±0,3 mV (208±9nm); pLA/DNA/PEI 32,3±0,2 mV (246±22nm)). Eine Abnahme der Partikelgröße nach Zugabe von PEI ließ eine weitere Verdichtung des Kernkomplexes und folglich die Bindung von PEI and den TAT₂/DNA Kernkomplex vermuten. Die Gentransferkomplexe wurden für den Tierversuch unter diesen Bedingungen generiert, jedoch wurde eine leichte Trübung der Formulierung beobachtet. Dieses deutete wiederum auf große Komplexe mit Aggregation hin.

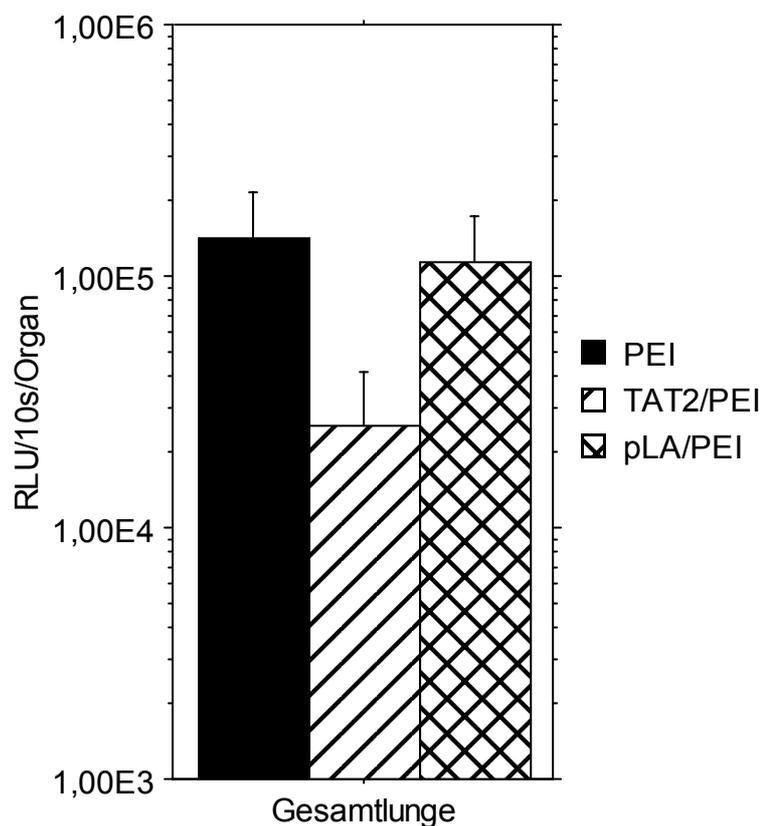


Abb. 58 Gentransfereffizienz ternärer Komplexe generiert in 2 mM HEPES pH=8,5 in der Mauslunge

Die Gentransfereffizienz der ternären TAT₂/DNA/PEI Komplexe war um das 5-fache gegenüber PEI/DNA Komplexe (dest. Wasser) reduziert, während die Gentransfereffizienz der ternären pLA/DNA/PEI Komplexe nicht reduziert war (n=5, ±S.E.M.)

Die Gentransfereffizienz der ternären TAT₂/DNA/PEI Komplexe war um das 5-fache gegenüber PEI/DNA Komplexe (dest. Wasser) reduziert, während die Gentransfereffizienz der ternären pLA/DNA/PEI Komplexe nicht reduziert war. Die hohe unumgängliche DNA-Konzentration (333µg/ml), die einerseits durch die Mindestmenge DNA (20µg) vorgegeben wurde, um Transgenexpression in der Lunge messen zu können und andererseits durch das beschränkte Flüssigkeitsvolumen (60µl) das einer Maus intratracheal appliziert werden konnte, stellte eine drastische Limitation für den Gentransfer in die Lunge *in vivo* dar. Unter diesen Bedingungen war es nicht möglich stabile ternäre Komplexlösungen zu formulieren, die nicht zu Präzipitation führten.

4.6 Zusammenfassende Betrachtung der Gentransfereffizienz verschiedener Vektoren in die Mauslunge *in vivo*

Eine wichtige Erkenntnis der *in vivo* Untersuchungen war, dass prinzipiell der Gentransfer mit nicht-viralen Gentransfervektoren in die Mauslunge möglich war. Jedoch zeigten die Ergebnisse, dass das Niveau der Transgenexpression von verschiedenen Faktoren abhing. Zu diesen Faktoren gehörten einerseits der Genvektor selbst und andererseits Parameter, die die Eigenschaften der Genvektorkomplexe beeinflussten, wie z.B. das Verhältnis von Vektor zu DNA, aber auch das Solvens, das für die Generierung der Genvektorkomplexe verwendet wurde. So wurde gezeigt, dass PEI/DNA Komplexe um zwei bis drei Größenordnungen effizienter Gentransfer in die Mauslunge vermittelten als abgebaute Dendrimere. Ein N/P=10 und die Formulierung der Gentransferkomplexe in dest. Wasser wurden als optimale Bedingungen für den Gentransfer in die Lunge mit PEI 25 kDa gefunden. PEI zeigte sich im Vergleich mit kationischen Lipiden, die bereits in klinischen Studien eingesetzt wurden (Alton et al) als wesentlich effizienter (20-fach) und verdeutlichte damit das Potenzial von PEI für den Gentransfer in die Lunge *in vivo*. Allerdings war der transiente Charakter der Transgenexpression für die eventuelle Anwendung bei Erbkrankheiten und vor allem die beobachteten Entzündungserscheinungen in der Mauslunge nach PEI Polyplex Applikation als nachteilig zu bewerten. Die Kombination von PEI Polyplexen mit einer Surfactant-Zubereitung (Alveofact®) führte zwar zu einer Reduktion der Gentransfereffizienz (nicht signifikant), jedoch verbesserte dieses die Verträglichkeit des applizierten Flüssigkeitsvolumen bei den Versuchstieren. Wurden PEI Polyplexe mit protektiven Kopolymeren kombiniert, so konnte zwar auf der einen Seite eine nahezu vollständige Unterbindung der Interaktion der Komplexe mit physiologisch vorkommenden Bestandteilen des Flüssigkeitsfilms,

der das Atemwegsepithel bedeckt, beobachtet werden, auf der anderen Seite führte dieses „Shielding“ der Komplexe auch zu reduzierter Gentransfereffizienz. Um diesem Dilemma aus dem Wege zu gehen, sollte das Targeting von Transferrin-Rezeptoren auf dem Atemwegsepithel mittels Transferrin modifizierten PEI ausgenutzt werden. Die Versuche brachten jedoch nicht die erhoffte Steigerung der Gentransfereffizienz, vielmehr war die Effizienz im Vergleich zu unmodifiziertem PEI erniedrigt. Dieser Effekt war vermutlich auf die limitierte Expression des Transferrin-Rezeptors in der Lunge zurück zu führen. Die Kombination der TAT-Oligomere mit PEI *in vitro* zeigte dramatische Steigerung der Gentransfereffizienz. Bei der *in vivo* Applikation konnte zwar eine 4-fach Steigerung der von PEI vermittelten Gentransfereffizienz erreicht werden, jedoch war diese wesentlich geringer als die Steigerung *in vitro*. In diesem Kontext sollte auf die Probleme hingewiesen werden, stabile Formulierungen für die intratracheale Applikation zu generieren. Das geringe Flüssigkeitsvolumen, das einer Maus intratracheal appliziert werden konnte, erforderte sehr hohe Konzentrationen der Genvektorkomplexe, welches zu Partikelaggregation und –präzipitation führen konnte. Aber genau diese Begleiterscheinungen wirkten sich negativ auf die Gentransfereffizienz aus. Es sollte daher betont werden, dass die Stabilität der zu applizierenden Genvektorkomplexe einer der am meisten limitierenden Faktoren für die direkte intratracheale Applikation war. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, bestünde in der Verneblung von Genvektoren. In diesem Fall könnten die Genvektoren in großen Volumina generiert werden, die die Partikelaggregation und –präzipitation ausschließen könnten. Ein solcher Ansatz wurde in dem nächsten Abschnitt für die *in vitro* Applikation untersucht.