

## 4 SLN als Gentransfervehikel

### 4.1 Einleitung

#### 4.1.1 Prinzip der Transfektion

**Transfektion** ist eine Bezeichnung für Verfahren zum Einschleusen fremder DNA in eukaryotische Zellen. Dazu muß fremde DNA in die Zelle aufgenommen werden und in den Kern gelangen, wo sie zu mRNA transkribiert wird. Diese mRNA wird anschließend, wie die mRNA zelleigener Gene auch, an den Ribosomen im Zytosol translatiert. Die Expression der fremden DNA kann transient (d.h. vorübergehend) oder stabil sein. Die Aufnahme und Expression nackter DNA ist möglich [Wolff et al. 1990], doch zeigt dieses Verfahren in vitro kaum Aktivität und in vivo nur nach intramuskulärer Gabe und nicht nach intravenöser oder intratrachealer Applikation [Li und Huang 2000]. Zur Steigerung der Transfektionseffizienz sind verschiedene Vektoren entwickelt worden. Man kann die **Transfektionsvektoren** in die zwei großen Gruppen der viralen und der nichtviralen Systeme unterteilen. Der ideale Vektor, der sicher, untoxisch, hocheffizient und selektiv ist, ist bisher aber noch nicht entwickelt worden.

#### 4.1.2 Virale Transfektion

Die Eigenschaft von Viren, ihre genetische Information auf Wirtszellen zu übertragen, macht man sich bei der viralen Transfektion zunutze. Hierbei werden **Retroviren, Adenoviren, Herpesviren** oder **adenoassoziierte Viren (AAV)** eingesetzt. Virale Vektoren sind wesentlich effektiver als nichtvirale Systeme. In Hinblick auf eine Gentherapie bergen sie aber hohe Risiken wie z. B. die Rückmutation des apathogenen und replikationsdefizienten Vektors zum Wildtyp (Retroviren, Adenoviren) [Martinez und Dornburg 1996], eine Immunogenität, die eine wiederholte Anwendung verbietet (Adenoviren) [Yang et al. 1995, Christ et al. 1997], die Aktivierung von Onkogenen oder Deaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch die Integration der Virus-DNA in das Genom (Insertionsmutagenese, Retroviren) [Robbins et al. 1998] und die Limitation der Größe der zu transfezierenden

den DNA (AAV ca. 4000 Basenpaare, Retroviren ca. 10000 Basenpaare) [Kotin 1994]. Überdies ist die Herstellung und Aufreinigung im industriellen Maßstab problematisch und teuer [Escriou et al. 1998a]. Nach dem Tod eines 18-jährigen Patienten bei einer klinischen Studie zur Gentherapie [Marshall 2000] sind die Sicherheitsbedenken bei viralen Vektoren verstärkt in den Vordergrund gerückt.

### 4.1.3 Nichtvirale Transfektion

Nichtvirale Vektoren haben gegenüber den viralen den großen Vorteil, ein höheres Maß an Sicherheit zu zeigen [Brown et al. 2001], keine spezifische Immunantwort zu induzieren [Li und Huang 2000], auch größere Nukleinsäuresequenzen transfezieren zu können [Carrier und Reszka 2002] und einfacher produzierbar zu sein. Ihr Nachteil liegt in der wesentlich geringeren Transfektionseffizienz [Anderson 1998]. In vivo läßt sich das besonders auf die schlechte Erreichbarkeit nicht-mitotischer Zellen und auf die Effizienzminderung durch Anwesenheit von Serum zurückführen [Escriou et al. 1998a]. Aufgrund der Sicherheitsbedenken gegen virale Vektoren sind nichtvirale Alternativen dennoch verstärkt in den Vordergrund getreten. Die einfachste Form des nichtviralen Gentransfers ist die Transfektion mit nackter DNA [Wolff et al. 1990], deren Effizienz durch das Verfahren der Elektroporation [Rols et al. 1998] und dem Einsatz der „gene gun“ [Yang et al. 1990] gesteigert werden kann. Nackte DNA zeigt in vitro allerdings fast keine Aktivität und in vivo findet man nennenswerte Transfektionsraten nur nach intramuskulärer Applikation [Li and Huang 2000], direkter Injektion in die Haut [Yu et al. 1999] oder in einen soliden Tumor [Yang und Huang 1996]. Die intravenöse Gabe nackter DNA führt in allen Organen nur zu sehr geringen Expressionsraten [Liu et al. 1997]. Für die intravenöse, die intratracheale und die transcutane Verabreichung und die in-vitro-Transfektion benötigt man Gentransfervehikel.

Die zur nicht viralen Transfektion eingesetzten Agenzien zeigen alle eine Gemeinsamkeit: Sie komplexieren die negativ geladene DNA aufgrund von kationischen Strukturen. Systeme, die auf kationischen Lipiden oder Polymeren basieren, sind bisher umfangreich charakterisiert worden. Seit der Einführung der **Lipofektion** [Felgner et al. 1987], d. h. der Transfektion mit **kationischen Liposomen**, wurde eine Vielzahl von kationischen Lipiden entwickelt. Eine gute Übersicht bietet der Artikel von Chesnoy [Chesnoy und Huang 2000]. Zum Gentransfer mit kationischen Emulsionen [Yi et al. 2000] werden die gleichen

kationischen Lipide eingesetzt. Die Transfektion mit kationischen Liposomen bietet den Vorteil einer für nichtvirale Systeme relativ hohen Effizienz [Sorgi et al. 1997] und geringen Toxizität. Nachteilig ist die in der Regel relativ geringe Serumstabilität [Felgner et al. 1987, Zelphati et al. 1998], die nicht so gute Lagerstabilität [Zelphati et al. 1998, Molina et al. 2001] und der hohe Preis der kationischen Lipide. Die Tabelle 4.1 gibt eine Übersicht über kommerziell erhältliche liposomale Transfektionsagenzien. Kationische Emulsionen zeigten eine etwas geringere Transfektionseffizienz als Liposomen, in Anwesenheit von Serum wurden sie aber nicht so stark inaktiviert [Yi et al. 2000].

Tabelle 4.1: Übersicht über kommerziell erhältliche liposomale in-vitro-Transfektionsagenzien

Name	Zusammensetzung	Hersteller
CellFECTIN <sup>®</sup>	Kationisches Lipid + DOPE (1:1,5)	Invitrogen
Cytofectene	Kationische Lipide + DOPE	Bio-Rad
DMRIE-C Reagent	DMRIE + Cholesterol (1:1)	Invitrogen
DOSPER Liposomal Transfection Reagent	DOSPER	Roche
DOTAP Liposomal Transfection Reagent	DOTAP	Roche
Escort <sup>™</sup>	DOTAP + DOPE (1:1)	Sigma-Aldrich
GeneSHUTTLE	Polykationisches Lipid	Qbiogene
LipofectAMINE	DOSPER + DOPE (3:1)	Invitrogen
LipofectAMINE2000	Kationische Lipide	Invitrogen
Lipofectin	Kationische Lipide	Invitrogen
LipoTAXI <sup>®</sup>	Kationische Lipide	Stratagene
Oligofectamine <sup>™</sup>	Kationische Lipide	Invitrogen
PerFectin <sup>™</sup>	Kationische Lipide	Gene Therapy Systems
Plus <sup>™</sup> Reagent	Kationische Lipide	Invitrogen
X-tremeGENE Q2	Kationische Lipide	Roche

Zu den zur Transfektion eingesetzten **kationischen Polymeren** gehören hauptsächlich **poly-L-Lysin** [Wu und Wu 1987], **Dendrimere** [Haensler und Szoska 1993] und **Polyethylenimin (pEI)** [Boussif et al. 1995]. Die Transfektion mittels „**Polyplexen**“, so werden die Komplexe aus DNA und kationischen Polymeren bezeichnet, bietet den Vorteil, sehr kostengünstig zu sein. Überdies sind die Polymere selber gut zu lagern und die Komplexe einfach herzustellen. Im Vergleich zu Lipoplexen weisen kationische Polymere meist eine erhöhte Toxizität auf. Im Fall des Poly-L-Lysins ist auch die Effizienz geringer.

Neuerdings werden immer häufiger **Multikomponenten-Systeme** zur nichtviralen Transfektion eingesetzt [Cartier und Reszka 2002], die aus (poly)kationischen Elementen zur DNA Kondensation und zusätzlichen Liganden zur rezeptorvermittelten Aufnahme (z. B. Transferrin [Wagner et al. 1990] oder Integrinbindungsproteine [Erbacher et al. 1999]) oder zur Förderung der Kernlokalisierung (z. B. die Kernlokalisationssequenz des großen Antigens des Simian Virus T40 [Schwartz et al. 1999], die Sequenz des heterogenen Ribonukleoproteins [Siomi und Dreyfuss 1995] oder das argininreiche Motiv des HIV TAT-Proteins [Rudolph et al. 2002]) bestehen.

#### 4.1.4 Mechanismus der nichtviralen Transfektion

In folgender Abbildung wird der Mechanismus der nichtviralen Transfektion vereinfacht dargestellt.

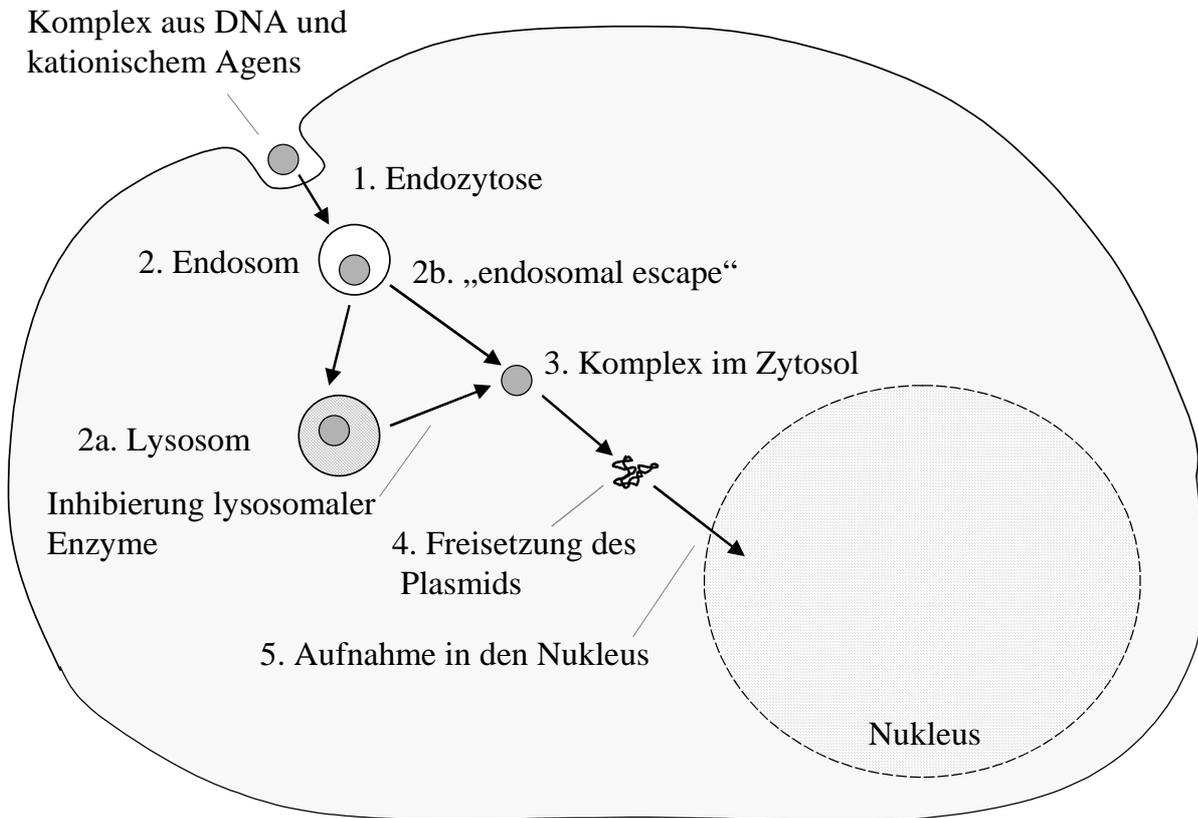


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Transfektionsmechanismus von nichtviralen Transfektionsagenzien, die nicht rezeptorvermittelt aufgenommen werden oder die Zellmembran direkt überwinden können.

Das kationische Agens kondensiert die DNA, wodurch sich diskrete, positiv geladene Partikel bilden [Rädler et al. 1997]. Die Interaktion dieser Komplexe mit der Zelle kann über elektrostatische Wechselwirkungen (zwischen dem positiv geladenen Komplex und der negativ geladenen Zellmembran) [Stamatatos et al. 1988], durch Sedimentation der Komplexe auf die Zellen (geht natürlich nur in Zellkultur und mit adhärennten Zellen) [Bally et al. 1999] oder rezeptorvermittelt stattfinden. Für eine rezeptorvermittelte Aufnahme bedarf es der Integration einer rezeptorbindenden Struktur wie z. B. Transferrin [Wagner et al. 1990]. Obwohl man den genauen Aufnahmemechanismus der kationischen Komplexe noch nicht für jede Zellart und jedes Agens bewiesen hat, ist es allgemein akzeptiert, daß Lipo- und Polyplexe durch **Endozytose** aufgenommen werden [Li und Huang 2000]. Eine

direkte Fusion der Lipoplexe mit der Zellmembran wäre theoretisch möglich, doch tritt sie wenn überhaupt nur zu einem sehr geringen Anteil auf [Li und Huang 2000]. Bei phagozytoseaktiven Zellen ist natürlich auch eine Aufnahme durch Phagozytose anzunehmen.

Zabner hat Versuche an Cos-1 Zellen durchgeführt, die beweisen, daß Lipoplexe über Endozytose aufgenommen werden [Zabner et al. 1995]. Auch für die meisten Polyplexe wird die Endozytose als Haupteintrittsmechanismus angesehen [Wagner et al. 1992, Plank et al. 1998]. Nach der Aufnahme durch Endozytose befinden sich die Lipo- oder Polyplexe in den Endosomen. pEI induziert eine Anreicherung von Protonen und deren Gegenionen in den Endosomen, was man als den sog. „**proton sponge Effekt**“ [Boussif et al. 1995, van Dyke 1996] bezeichnet. Dieser führt zu einer Schwellung und zum Platzen der Endosomen, wodurch der pEI-Komplex ins Zytosol freigelassen wird. Kationische Lipide sollen die endosomale Membran destabilisieren [Hafez et al. 2001], was ebenfalls zur Freisetzung in das Zytosol führt. Die Endosomen fusionieren mit den Lysosomen zu **Endolysosomen** [Raff 1986], in denen ein leicht saures Milieu herrscht. Die Endolysosomen enthalten eine Reihe von abbauenden Enzymen, unter anderen auch Nukleasen [Wattiaux et al. 2000]. Kann der Komplex nicht aus diesem Kompartiment entkommen, so wird die enthaltene DNA inaktiviert. Befindet sich **Chloroquin** im Medium, so reichert es sich in den Endolysosomen an, denn ist die schwache Base einmal im Endolysosom, so wird sie protoniert und kann nicht mehr hinaus [Wattiaux et al. 2000]. Es kommt zur Schwellung und zum Platzen des Endolysosoms [de Duve et al. 1974]. Ebenfalls hebt die schwache Base Chloroquin den endolysosomalen pH-Wert an, was pH-abhängige, abbauende Enzyme hemmt [Luthman und Magusson 1983, Cotton et al. 1992, Wagner et al. 1992]. Auf diese Weise fördert Chloroquin die Freisetzung der Transfektionskomplexe in das Zytosol. Für im leicht Sauren protonierbare kationische Lipide und Polymere wird ein ähnlicher Mechanismus angenommen [Simoes et al. 2001].

Nachdem der Komplex in das Zytosol entlassen worden ist, muß die DNA aus den Komplexen freigesetzt werden. Dies muß vor der Aufnahme in den Nukleus geschehen. Man hat nämlich herausgefunden, daß die direkte Injektion von Lipoplexen in den Nukleus nur zu sehr geringen Transfektionsraten führt [Zabner et al 1995]. Die Mikroinjektion des Plasmids in den Kern dagegen vermittelte 50-100 %-ige Transfektionsraten [Capecchi 1980]. Die Freisetzung kommt vermutlich durch Interaktion mit anionischen Zytosolbestandteilen oder anionischen Lipiden der Endosomenmembran zustande [Youhong et al. 1996]. Letztlich ist die Aufnahme des Plasmids über die Kernporen in den Nukleus ein ef-

fizienzlimitierender Schritt [Capecchi 1980, Escriou et al. 1998b]. **Kernlokalisationssequenzen** können die Aufnahme erleichtern [Cartier und Reszka 2002] und die Effizienz z. T. erheblich steigern (vgl. Kapitel 4.6).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß es beim nichtviralen Gentransfer zwei problematische Schritte gibt. Das ist die Freisetzung aus den Endo-/Lysosomen und der Eintritt der DNA in den Nukleus.

### 4.1.5 Gentherapie

Bisher steht noch kein zugelassenes **Gentherapeutikum** zur Behandlung von Patienten zur Verfügung [Brown et al. 2001]. Alle Therapieansätze befinden sich noch in der Entwicklung. Bis zum Jahr 2001 wurden schon über 500 klinische Gentherapiestudien abgeschlossen [Journal of Gene Medicine 2001]. Nur bei etwa 20 % wurden nichtvirale Vektoren eingesetzt. Einsatzgebiete der Gentherapie sind bisher nicht oder nur unzureichend behandelbare Erkrankungen. Zum einen sind dabei **Erkrankungen mit genetischer Ursache** zu nennen. Am einfachsten sollte dies bei Erkrankungen möglich sein, denen ein einziger Gendefekt zugrunde liegt. Das Ziel hierbei ist die Zuführung des gesunden Gens. Ein Beispiel für eine solche Erkrankung ist die **zystische Fibrose** (syn. Mukoviszidose) [Porteous et al. 1997]. Weitere genetische Krankheiten, bei denen eine gentherapeutische Behandlung in Frage kommen könnte, sind z. B. der **schwere kombinierte Immundefekt** (severe combined immunodeficiency, SCID) [Hacein-Bey-Abina et al. 2002], die **Hämophilie** oder die **Sichelzellanämie** [Verma und Somia 1997]. Zum anderen kommen **erworbene Erkrankungen** wie z. B. **Krebs** oder **AIDS** für eine Gentherapie in Frage. In der Krebstherapie verfolgt man mehrere Ansätze, z. B. kann ein mutiertes Tumorsuppressorgen durch die unmutierte und funktionsfähige Form ausgetauscht, ein Onkogen blockiert oder ein apoptoseinduzierendes Gen aktiviert werden [Hunt und Vorbürger 2002]. Ein anderer Ansatz ist die Transfektion von Genen, die für Enzyme kodieren, die Chemotherapeutika gezielt aktivieren sollen. Ebenfalls zu nennen ist die Tumorstimmulierung, die eine systemische Immunreaktion gegen den Tumor induzieren soll [Schätzlein und Uchegbu 2001a, Rochlitz 2001].

Ein Problem der systemischen Gentherapie ist die schwierige Erreichbarkeit der meisten Zielgewebe. Nach der intravenösen Applikation von Lipoplexen werden diese schnell wie-

der aus der systemischen Zirkulation entfernt und akkumulieren in der Leber und der Lunge [Niven et al. 1998]. Die Expression des transgenen Proteins tritt hauptsächlich nur im ersten Kapillarbett, das die Lipoplexe erreichen d. h. der Lunge, auf [Song et al. 1998]. Die effektive Transfektion andere Organe konnte bisher nur durch regionale Applikation, wie zum Beispiel die direkte Injektion in die Nierenarterie, erreicht werden [Lai et al. 1997]. Daher steht es zu erwarten, daß die erste Generation der Gentherapeutika, sofern sie nicht die Lunge als Zielorgan hat, lokal appliziert werden muß [Schätzlein und Uchegbu 2001b].

### 4.1.6 SLN als Transfektionsagenzien

Feste Lipidnanopartikel (engl. Solid Lipid Nanoparticles, SLN) sind eine Dispersion aus innerer fester Lipidphase und äußerer wäßriger Emulgatorphase [Müller 1998]. Die Lipidmatrix besteht aus bei Raumtemperatur festen, physiologisch gut verträglichen Fetten, die den GRAS-Status (= generally recognized as safe) [Food Additive Database der FDA 1999] besitzen. Als Emulgatoren werden zugelassene, gebräuchliche Stoffe wie zum Beispiel Tween 80 oder Eilecithin genutzt. Je nach Herstellungsmethode und Zusammensetzung liegt die Partikelgröße bei ca. 50-1000 nm. Die Herstellung kann im Gegensatz zu Polymernanopartikeln ohne die Verwendung organischer Lösungsmittel erfolgen (vgl. Kapitel 2.1.1). Für eine Zusammenfassung über die Entwicklung und die Einsatzmöglichkeiten von SLN siehe Müller und Mehnert [Müller et al. 2000a, Mehnert und Mäder 2001].

Seit der Einführung von Liposomen aus kationischen Lipiden zur Transfektion [Felgner et al. 1987] sind diese Systeme von unzähligen Arbeitsgruppen intensiv beforscht worden [Brown et al 2001]. Heute sind über zwanzig liposomale Transfektionsreagenzien zur *in vitro*-Transfektion auf dem Markt [Biocompare 2002]. Kationische Liposomen wurden auch schon in einigen klinischen Studien zur Gentherapie erfolgreich eingesetzt [Li und Huang 2000, Brown et al. 2001]. In letzter Zeit wurden mehrere Artikel über kationische Nanoemulsionen publiziert [Liu et al. 1996, Kim et al. 2001, Chung et al. 2001, Kim et al. 2002], die gute Transfektionsraten erzielten und sogar eine im Vergleich zu Liposomen erhöhte Serumstabilität zeigten. Trotzdem besteht noch immer ein Bedarf nach effizienteren, kostengünstigeren, stabileren und weniger toxischen nichtviralen Transfektionsvektoren [Hunt und Vorburgen 2002].

Herstellungstechnisch ist es einfach möglich gewesen kationische Lipide in SLN-Formulierungen zu integrieren, so daß man kationische SLN erhielt. Mit dem Ziel eine neue Plattformtechnologie zur nichtviralen Transfektion zu schaffen, wurden bisher vier verschiedene kationische SLN-Formulierungen entwickelt und an Cos-1 Zellen getestet [Olbrich et al. 2001b]. Als Matrixlipid wurde entweder Compritol oder Hartparaffin und als kationisches Lipid entweder Cetylpyridiumchlorid oder Esterquat 1 (EQ1, vgl.4.2.1.1) verwendet. Eine dieser vier Formulierungen war in der Lage zu transfezieren. Die Effizienz war allerdings steigerungswürdig. Doch für einen ersten Versuch waren das tolle Ergebnisse. Deshalb entschlossen wir uns dieses neue System, welches den Namen TransoPlex<sup>®</sup> bekam [Müller et al. 2001], weiterzuentwickeln.

### **4.1.7 Zielsetzung der Arbeit**

Basierend auf den ersten Ergebnissen zum Gentransfer mit kationischen SLN [Olbrich et al. 2001b] sollte die Formulierung optimiert werden. Vorrangiges Ziel war dabei die Steigerung der Gentransfereffizienz.

Die Optimierung der Formulierung erfolgte durch die Variation der Art und der Menge des Matrixlipids, der stabilisierenden Tenside und der kationischen Lipide. Weitere berücksichtigte Faktoren waren das Herstellungsverfahren, die Teilchengröße, die Kristallinität und das Transfektionsprotokoll. Letztlich wurde der Effekt einer Kombination von SLN mit Kernlokalisationssequenzen untersucht.

## 4.2 Formulierungsentwicklung und –optimierung I

### 4.2.1 Formulierungsentwicklung

Nachdem die vorausgegangenen Versuche gezeigt hatten, daß die Transfektion von Cos-1 Zellen mit einer der SLN-Formulierungen wenn auch mit geringer Effizienz möglich war, sollten nun neue Formulierungen entwickelt werden. Das Ziel war die Steigerung der Transfektionseffizienz. Zu diesem Zweck wurden folgende Parameter variiert:

- die Art des kationischen Lipids,
- die Art des Matrixlipids und
- der Gehalt des sterisch stabilisierenden Tensids

#### 4.2.1.1 Kationische Lipide

Als kationische Lipide wurden zum einen kostengünstige, in zugelassenen Fertigarzneimitteln enthaltene, positiv geladene Tenside wie Cetylpyridiumchlorid (CPC), Benzalkoniumchlorid (BA) und Cetrimid (CTAB) gewählt. Sollten kationische SLN aus diesen Substanzen gut transfezieren, so wäre es möglich, diese kationischen SLN in großen Mengen zu sehr günstigen Preisen zu produzieren. CTAB wird seit Mitte der neunziger Jahre als Komponente von kationischen Liposomen zur Transfektion verwendet [Gustafsson et al. 1995, Holmen et al. 1995]. CTAB wurde auch schon zur Herstellung kationischer Mikropartikel [Briones et al. 2001] als Adjuvans für DNA-Vakzinen eingesetzt. Bei diesen drei Substanzen handelt es sich um kationische Tenside mit nur einer lipophilen Kette.

Des Weiteren wurden kationische Lipide mit zwei hydrophoben Ketten eingesetzt. DDAB enthaltene kationische Liposomen wurden erstmals 1991 zur Transfektion eingesetzt [Rose et al. 1991]. DDAB ist im kommerziell erhältlichen liposomalen Transfektionsreagenz Lipofectase<sup>™</sup> (Lifetechnologies) enthalten. DOTAP wurde 1988 als Bestandteil von kationischen Liposomen zur Transfektion eingeführt [Stamatatos et al. 1988] und ist heutzutage in verschiedenen kommerziell erhältlichen Transfektionsagencien (z. B. Escort<sup>™</sup> von Sigma oder „Dotap liposomales Transfektionsreagenz“ von Roche) enthalten. DOTAP wurde als Bestandteil von kationischen Emulsionen ebenfalls erfolgreich zum Gentransfer eingesetzt [Kim et al. 2001]. Esterquat 1 (EQ1) wurde bisher noch nicht zur Transfektion verwendet, zeigt aber eine starke strukturelle Ähnlichkeit mit DOTAP (vgl. 2.2.3).

### 4.2.1.2 Matrixlipid

Als Matrixlipide wurden Compritol und Cetylpalmitat gewählt. Compritol wurde deshalb verwendet, weil im vorausgegangenen Versuch, einzig die Formulierung aus Compritol und nicht die aus Hartparaffin Transfektionsaktivität zeigte. Cetylpalmitat wurde gewählt, da sich dieses Wachs aufgrund seines relativ geringen Schmelzpunktes (vgl. 2.2.1) im allgemeinen sehr gut zu SLN verarbeiten läßt. Weiterhin ist es in der Zelle schnell bioabbaubar, was eine Rolle für die Freisetzung des Plasmids spielen könnte.

### 4.2.1.3 Tensid

Durch den Zusatz von Tween 80 zu kationischen Emulsionen konnte deren Serumstabilität deutlich verbessert werden [Yi et al. 2000]. Erklärt wurde dies durch die Behinderung der elektrostatischen Interaktionen von kationischen Lipiden und negativ geladenen Serumproteinen durch diese sterischen Stabilisatoren. Für kationische Emulsionen, die unter Zusatz von Polyethylenglykol-konjugierten Phospholipiden hergestellt worden sind, konnte ebenfalls eine Verbesserung der Serumstabilität festgestellt werden [Chesnoy et al. 2001]. Bei der In-vivo-Applikation von nanopartikulären Systemen wurde durch den Zusatz von Polyethylenglykolen (PEG) eine veränderte und verminderte Anlagerung von Serumproteinen erzielt, die im allgemeinen zu einer Zunahme der intravenösen Zirkulationszeit führte [Gombotz et al. 1991]. Dieser Effekt wird als „Stealth-Effekt“ bezeichnet [Domurado et al. 2002]. „Stealth-SLN“ (SSLN), deren In-vivo-Zirkulation durch einen Zusatz von Stearinsäure-Polyethylenglycol 2000 verlängert worden ist, sind ebenfalls beschrieben worden [Fundaro et al. 2000].

Basierend auf diesen Überlegungen wurde Tween 80 als Tensid zur Stabilisierung der SLN ausgewählt. Durch die Kombination von 7 Teilen Tween 80 mit 3 Teilen Span 85 erhält man einen Komplexemulgator, der eine effektivere stabilisierende Wirkung auf dieses O/W-System hat, als Tween 80 alleine. Alle Formulierungen wurden sowohl mit einem Tween/Span-Gehalt von 4 % als auch 2 % hergestellt, um den Einfluß der Reduktion dieser hohen Tensidmenge auf die Stabilität der Formulierung und die Serumstabilität zu untersuchen.

### **4.2.1.4 Herstellung**

Die Herstellung erfolgte am LAB 60 im 1,5 Liter Maßstab. Auf diese Weise lassen sich sehr stabile und homogene Formulierungen produzieren [Dingler und Gohla 2002]. Einzig für die DOTAP-SLN wurde die Herstellung am EmulsiFlex<sup>®</sup>-B3 vorgezogen. Der Grund hierfür war der hohe Preis von kommerziell erhältlichem DOTAP, der nur eine Herstellung im kleineren Maßstab zuließ.

#### **4.2.1.4.1 LAB 60**

Die Zusammensetzung der verschiedenen SLN-Formulierungen gibt Tabelle 4.2 wieder. Alle Formulierungen enthielten 2,25 % wasserfreies Glycerol zur Isotonisierung.

Variiert wurde die Art des Fettes (Compritol ATO 888 oder Cetylpalmitat), die Menge des Tensidgemisches Tween 80/Span 85 (7:3) (2 oder 4 %) und die Art des kationischen Tensides. Somit war es möglich, den Einfluß dieser Parameter auf die Teilchengröße, die Stabilität, das Zetapotential, die DNA-Bindung, die Zytotoxizität und die Transfektionseffizienz zu untersuchen.

Tabelle 4.2: Zusammensetzung der SLN-Formulierungen (Die Prozentwerte sind Massenprozentwerte (m/m).)

Formulierung	Fett	Tween 80/Span 85 7:3	Kationisches Tensid
Co(2)Ctab	Compritol 4 %	2 %	CTAB 1 %
Co(4)Ctab	Compritol 4 %	4 %	CTAB 1 %
Co(2)Ddab	Compritol 4 %	2 %	DDAB 1 %
Co(4)Ddab	Compritol 4 %	4 %	DDAB 1 %
Co(2)Cpc	Compritol 4 %	2 %	CPC 1 %
Co(4)Cpc	Compritol 4 %	4 %	CPC 1 %
Co(2)Ba	Compritol 4 %	2 %	BA 1 %
Co(4)Ba	Compritol 4 %	4 %	BA 1 %
Co(2)Eq	Compritol 4 %	2 %	EQ1 1 %
Co(4)Eq	Compritol 4 %	4 %	EQ1 1 %
Cp(2)Ctab	Cetylpalmitat 4 %	2 %	CTAB 1 %
Cp(4)Ctab	Cetylpalmitat 4 %	4 %	CTAB 1 %
Cp(2)Ddab	Cetylpalmitat 4 %	2 %	DDAB 1 %
Cp(4)Ddab	Cetylpalmitat 4 %	4 %	DDAB 1 %
Cp(2)Cpc	Cetylpalmitat 4 %	2 %	CPC 1 %
Cp(4)Cpc	Cetylpalmitat 4 %	4 %	CPC 1 %
Cp(2)Ba	Cetylpalmitat 4 %	2 %	BA 1 %
Cp(4)Ba	Cetylpalmitat 4 %	4 %	BA 1 %
Cp(2)Eq	Cetylpalmitat 4 %	2 %	EQ1 1 %
Cp(4)Eq	Cetylpalmitat 4 %	4 %	EQ1 1 %

Die Herstellung erfolgte mittels Hochdruckhomogenisation am LAB 60 in 1,5 Liter Chargen bei einer Temperatur von 85°C. Als Druck wurde 500 bar gewählt. Am zweiten Homogenisationsventil herrschte ein Druck von 50 bar. Die Dauer des Prozesses betrug 30 Minuten. Nach 5, 10 und 15 Minuten wurden Proben gezogen, um den Homogenisationsprozeß abbilden zu können. Das fertige Produkt wurde in autoklavierte silanisierte Infusionsflaschen abgefüllt.

### 4.2.1.4.2 EmulsiFlex®-B3

Aufgrund des hohen Preises des kationischen Lipids DOTAP wurden die DOTAP-SLN am EmulsiFlex®-B3 hergestellt. Mit diesem Gerät konnten auch Chargen mit einem Volumen von nur 3,5 ml homogenisiert werden. Die Zusammensetzung der Formulierungen wird in Tabelle 4.3 dargestellt. Die Isotonisierung erfolgte mit 2,25 % wasserfreiem Glycerol. Die Herstellung wurde wie unter 2.1.1 beschrieben durchgeführt. Das fertige Produkt wurde in autoklavierte Eppendorffgefäße aus Polyethlen (LD-PE) abgefüllt.

Tabelle 4.3: Zusammensetzung der am EmulsiFlex®-B3 hergestellten SLN-Formulierungen (Die Prozentwerte sind Massenprozent (m/m).)

Formulierung	Fett	Tween 80/Span 85 7:3	Kationisches Lipid
Co(2)Dotap	Compritol 4 %	2 %	DOTAP 1 %
Cp(2)Dotap	Cetylpalmitat 4 %	2 %	DOTAP 1 %

### 4.2.1.5 Lagerung

Alle SLN-Formulierungen wurden bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluß gelagert. Diese Lagerungsbedingungen haben sich als am besten erwiesen [Freitas et al. 1994].

## 4.2.2 Physikalische Charakterisierung

### 4.2.2.1 Partikelgrößenbestimmung

#### 4.2.2.1.1 1,5 Liter Chargen

Die Partikelgrößenbestimmung der am LAB 60 hergestellten SLN-Formulierungen erfolgte mittels PCS. Auf die selbe Weise wurden die während des Homogenisationsvorgangs nach 5, 10 und 15 Minuten gezogenen Proben vermessen. Somit ließ sich der Homogenisationsvorgang abbilden (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4: Entwicklung der Partikelgrößen und der Polydispersitätsindizes (PI) im Verlauf des Homogenisationsprozesses

Formulierung	5 min ( $\varnothing$ Partikeldurchmesser in nm / PI)	10 min ( $\varnothing$ Partikeldurchmesser in nm / PI)	15 min ( $\varnothing$ Partikeldurchmesser in nm / PI)	30 min ( $\varnothing$ Partikeldurchmesser in nm / PI)
Co(2)Ctab		178 / 0,213	165 / 0,192	148 / 0,194
Co(4)Ctab	207 / 0,262	176 / 0,201	165 / 0,188	148 / 0,205
Co(2)Ddab	228 / 0,270	199 / 0,230	183 / 0,214	158 / 0,241
Co(4)Ddab	214 / 0,287	171 / 0,210	162 / 0,189	148 / 0,209
Co(2)Cpc	219 / 0,250	187 / 0,220	172 / 0,190	154 / 0,241
Co(4)Cpc	207 / 0,255	172 / 0,233	157 / 0,235	145 / 0,232
Co(2)Ba	191 / 0,241	160 / 0,176	149 / 0,162	134 / 0,199
Co(4)Ba	184 / 0,222	149 / 0,157	138 / 0,188	123 / 0,186
Co(2)Eq	271 / 0,396	184 / 0,287	167 / 0,256	144 / 0,239
Cp(4)Eq	192 / 0,298	163 / 0,238	145 / 0,208	132 / 0,224
Cp(2)Ctab	192 / 0,152	154 / 0,121	144 / 0,112	131 / 0,190

Formulierung	5 min ( $\emptyset$ Partikeldurchmesser in nm / PI)	10 min ( $\emptyset$ Partikeldurchmesser in nm / PI)	15 min ( $\emptyset$ Partikeldurchmesser in nm / PI)	30 min ( $\emptyset$ Partikeldurchmesser in nm / PI)
Cp(4)Ctab		163 / 0,113	146 / 0,126	133 / 0,186
Cp(2)Ddab	195 / 0,195	142 / 0,107	128 / 0,140	113 / 0,201
Cp(4)Ddab	231 / 0,256	187 / 0,174	166 / 0,088	131 / 0,180
Cp(2)Cpc	197 / 0,094	162 / 0,077	149 / 0,116	137 / 0,179
Cp(4)Cpc	208 / 0,126	184 / 0,103	157 / 0,115	139 / 0,157
Cp(2)Ba	219 / 0,191	167 / 0,126	150 / 0,091	127 / 0,225
Cp(4)Ba	212 / 0,154	166 / 0,129	149 / 0,145	127 / 0,186
Cp(2)Eq	208 / 0,15	161 / 0,12	132 / 0,131	110 / 0,136
Cp(4)Eq	197 / 0,199	152 / 0,128	134 / 0,054	114 / 0,142

Hierbei erkennt man, daß der mittlere Partikeldurchmesser mit der Dauer des Homogenisationsvorgangs abnahm. Am Ende des Prozesses lag der Durchmesser der Partikel im Bereich von 110 bis 158 nm. Der PI lag im Bereich von 0,136 und 0,241. Beachtlich ist, daß der PI nach 15 minütiger Homogenisation bei allen Formulierungen geringer war (durchschnittlich 26 %) als nach 30 min. Die weiteren 15 Minuten Homogenisation führten zwar zu einer weiteren Abnahme der Partikelgröße (um durchschnittlich 13 %), doch ging das zu Lasten des Polydispersitätsindex. Die weitere Reduktion des mittleren Teilchendurchmessers führte also zu einer breiteren Verteilung. Ein ähnliches Verhalten wurde auch schon von Gohla und Dingler beschrieben [Gohla und Dingler 2001].

Die Partikelgröße der verschiedenen SLN-Formulierungen differierte zwar von Formulierung zu Formulierung, lag aber für alle in einem Größenbereich von 110-158 nm.

Des weiteren ließ sich feststellen, daß die aus Compritol hergestellten SLN immer etwas größer waren und einen größeren PI zeigten, als die unter Zusatz der gleichen kationischen

Lipide aus Cetylpalmitat formulierten SLN. Dies kann mit dem höheren Schmelzpunkt des Compritols erklärt werden. Je höher der Schmelzpunkt eines Fettes ist, je größer ist normalerweise auch die resultierende Partikelgröße bei einer gegebenen Homogenisationstemperatur [Siekmann und Westensen 1992, zur Mühlen 1996]. Der Grund dafür ist die höhere Viskosität der geschmolzenen Lipidmatrix [Jahnke 1998].

Die Reduktion der Tween 80/Span 85 Menge von 4 auf 2 % hat in der Regel eine signifikante Zunahme der Partikelgröße zur Folge. Doch führt diese Größenzunahme praktisch zu keinem Stabilitätsproblem. Dies liegt höchstwahrscheinlich darin begründet, daß Tween/Span sowohl in 4 %-iger als auch in 2 %-iger Konzentration im Überschuß vorlag. Durch die Reduktion der Tween/Span Menge von 4 auf 2 % kam es zu keiner merklichen Beeinträchtigung der Stabilität.

Die Lagerung der Formulierungen erfolgte bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluß in silanisierten Glasflaschen. Die Partikelgrößen und Polydispersitätsindices verhielten sich während des Lagerungszeitraumes wie in Abbildung 4.2 und Abbildung 4.3 dargestellt.

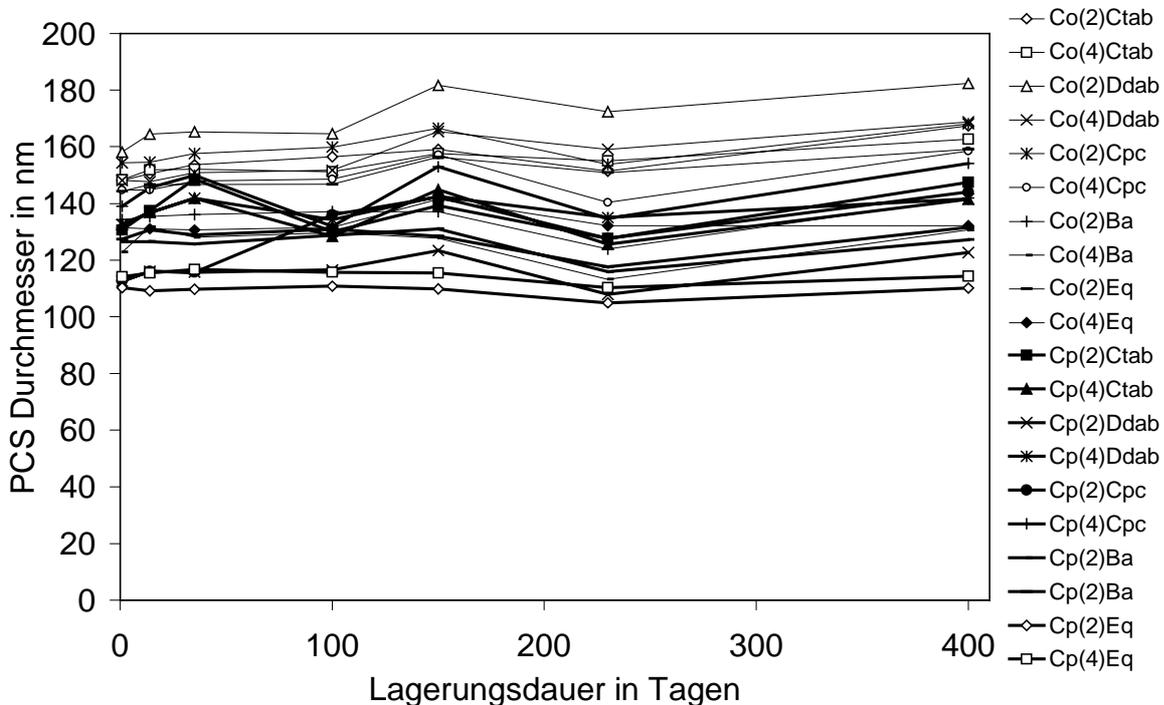


Abbildung 4.2: PCS-Durchmesser der SLN-Formulierungen in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer

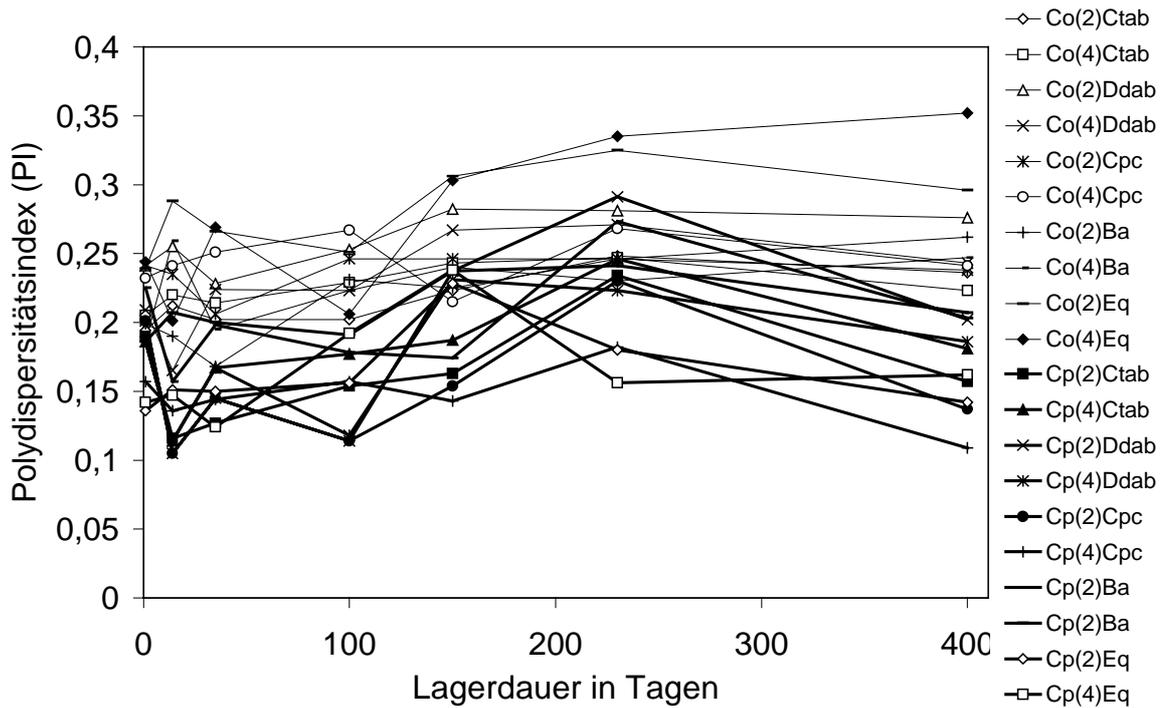


Abbildung 4.3: Polydispersitätsindex (PI) der SLN-Formulierungen in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer

Die Daten zeigen, daß es über den untersuchten Zeitraum nur zu einer ganz geringen Größenzunahme kam. Die Partikel zeigten eine gute Lagerstabilität.

Um sicher zu gehen, daß sich in den Formulierungen keine Partikel von  $> 5 \mu\text{m}$  befanden, die die PCS nicht erfassen konnte, wurden die Formulierungen alle einmal mittels LD vermessen. Dabei konnten keine Mikropartikel gefunden werden.

Trotz dieser Meßdaten, die eine sehr gute Lagerungsstabilität aufzeigen, ließ sich bei einigen der SLN makroskopisch eine Ablagerung von Matrixlipid an der Glaswand feststellen. An der Oberfläche der Suspension hatte sich entlang der Glaswand ringförmig ein wenig Fett abgelagert.

Bei den SLN aus Cetylpalmitat trat dies etwas häufiger bzw. ausgeprägter auf, als bei den aus Compritol. Ebenfalls zeigen die SLN mit 2 % Tween/Span öfter Ablagerungen als bei den 4 %-igen. Einzig die mit CTAB hergestellten SLN setzten sich unabhängig vom Tensidgehalt und der Art des Matrixlipids nie ab. Trotz dieser Erscheinung ließen sich durch PCS- und LD-Messungen keine Aggregate in der Suspension nachweisen. Dies spricht dafür, daß diese Aggregation und Anlagerung scheinbar nur in Interaktion mit der Glaswand stattgefunden hat, und nicht in der gesamten Zubereitung.

#### 4.2.2.1.2 3,5 ml Chargen

Die in 3,5 ml Chargen produzierten SLN mit DOTAP wurden wegen ihrer erwartungsgemäß etwas größeren Teilchengröße zunächst mittels Laserdiffraktometrie vermessen (Abbildung 4.4/Abbildung 4.5/Abbildung 4.5). Wegen der geringen Produktmenge wurde nur eine Messung kurz nach dem Einsatz zur Transfektion durchgeführt.

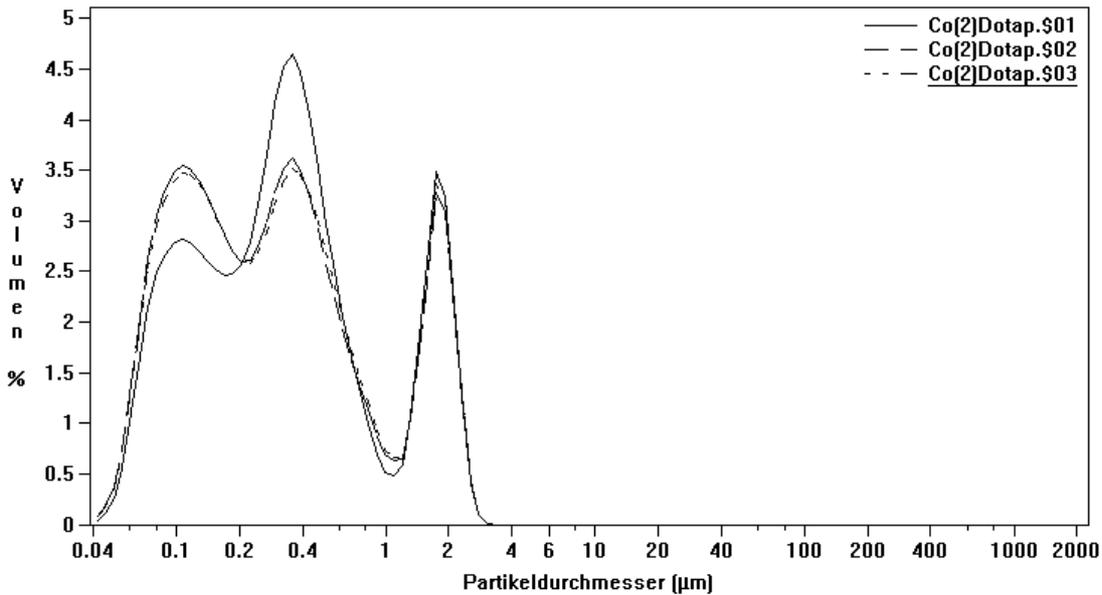


Abbildung 4.4: Laserdiffraktometriemessung von Co(2)Dotap am Tag 40. Die Ergebnisse sind als Partikelgrößen-Volumen-Verteilung dargestellt.

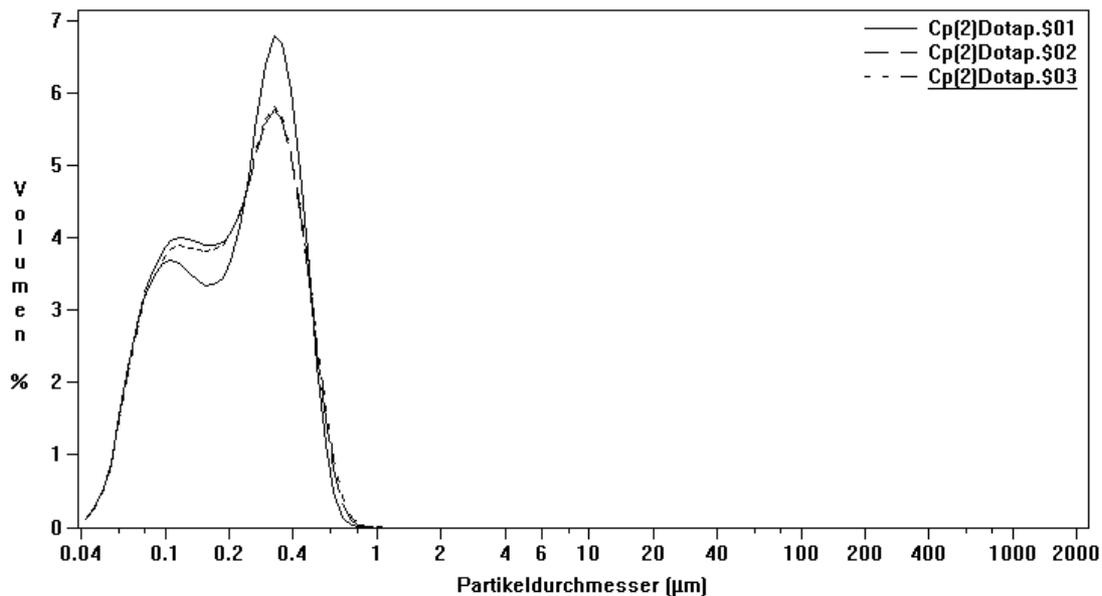


Abbildung 4.5: Laserdiffraktometriemessung von Cp(2)Dotap am Tag 40. Die Ergebnisse sind als Partikelgrößen-Volumen-Verteilung dargestellt.

Die Formulierung Co(2)Dotap zeigte nur bis LD50 (0,296  $\mu\text{m}$ ) Nanopartikel. Die Verteilung reichte bis in den Mikrometerbereich hinein. Die Formulierung Cp(2)Dotap dagegen zeigte eine LD99 von 0,582  $\mu\text{m}$  und somit deutlich kleinere Partikelgrößen als Co(2)Dotap, allerdings auch noch deutlich größere als die anderen 20 Chargen ohne DOTAP. Der Trend, der sich bei der Großproduktion schon zeigte, nämlich daß SLN aus Cetylpalmitat etwas kleinere Partikelgrößen und etwas engere Verteilungen aufwiesen, war hier noch viel stärker ausgeprägt.

Um die Partikelgrößen der 22 Formulierungen besser vergleichen zu können, wurden sie in Abbildung 4.6 gegenübergestellt.

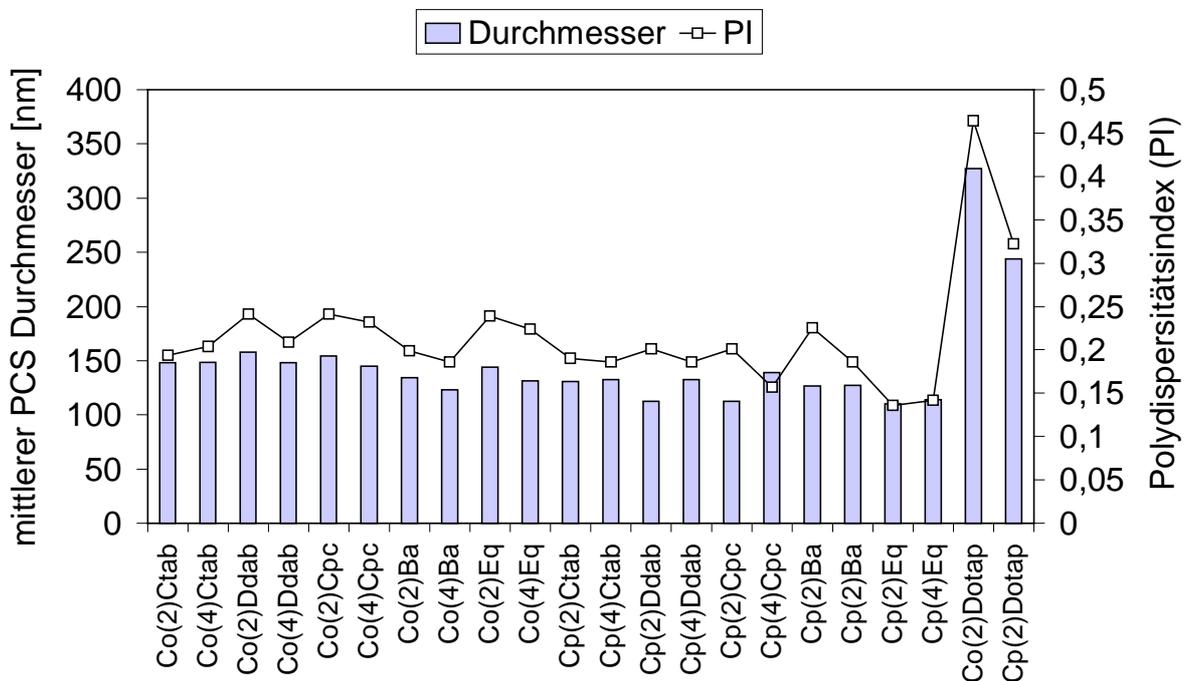


Abbildung 4.6: Gegenüberstellung der durch PCS-Messung erhaltenen mittleren Partikeldurchmesser und Polydispersitätsindices (PI) der 22 Formulierungen am Tag 100

Hierbei erkennt man sehr gut, daß die am EmulsiFlex<sup>®</sup>-B3 hergestellten SLN einen größeren Partikeldurchmesser und Polydispersitätsindex zeigten als die am Micron LAB 60 produzierten. Ob der Grund dafür in der Verwendung des anderen Homogenisators lag oder in der Verwendung von DOTAP als kationisches Lipid läßt sich unter vertretbaren Kosten nicht beweisen. Die Art des eingesetzten kationischen Lipids hatte bei den am LAB 60 produzierten SLN keinen so gravierenden Einfluß auf die Partikelgröße. Aufgrund dessen kann vermutet werden, daß die Herstellung am EmulsiFlex<sup>®</sup>-B3 der Grund für die größeren Partikeldurchmesser war.

#### 4.2.2.2 Zetapotential

Die Bestimmung des Zetapotentials diente dazu, Unterschiede bezüglich der Oberflächenladung zwischen den verschiedenen Formulierungen zu detektieren. Zu diesem Zwecke wurde in sogenanntem "Leitfähigkeitswasser" [Müller 1996d] gemessen. Bei den ladungsgebenden Gruppen handelte es sich um pH-unempfindliche quartäre Amine. Um diese Annahme zu beweisen, wurde eine pH-Titration für Cp(2)Dotap und Cp(2)Ddab durchgeführt (Abbildung 4.7).

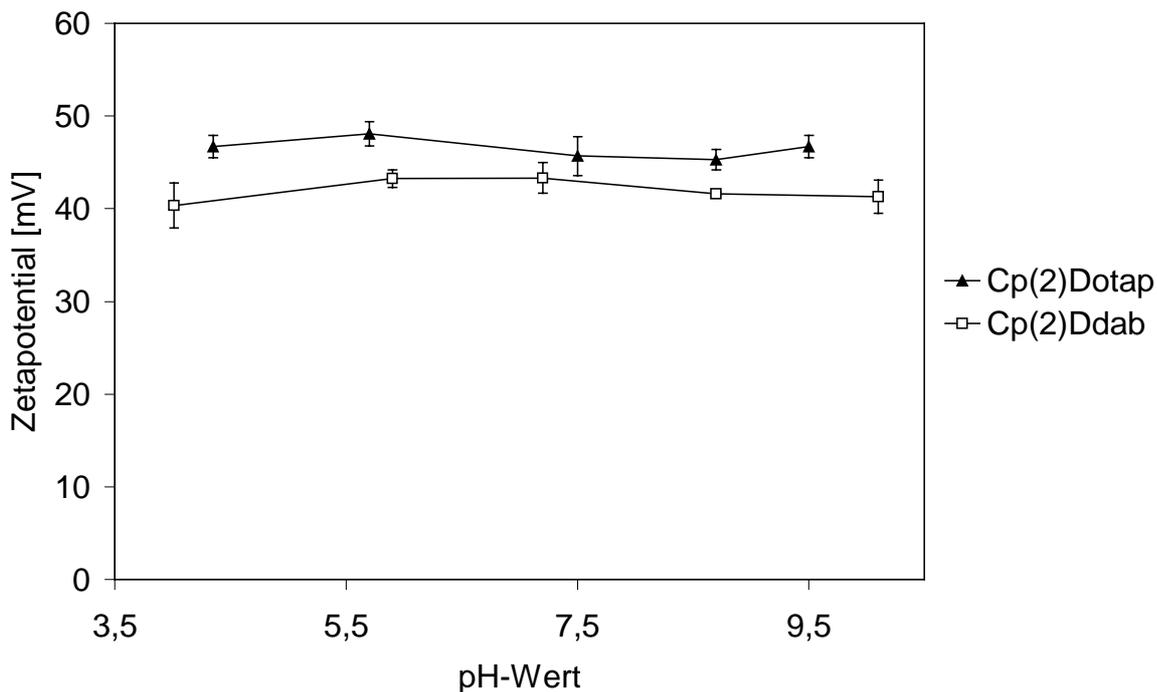


Abbildung 4.7: Zetapotential der Formulierungen Cp(2)Ddab und Cp(2)Dotap in Abhängigkeit vom pH-Wert. Der pH-Wert wurde mit Salzsäure oder Natronlauge eingestellt.

Das Ergebnis beweist die pH-Unempfindlichkeit des Zetapotentials. pH-Werte  $< 3,5$  und  $> 10$  sind nicht von Interesse, da in der lebenden Cos1-Zelle keine pH-Werte von  $< 4$  oder  $> 10$  zu erwarten sind. Der endosomale pH fällt vor der Fusion mit den Lysosomen nur auf Werte von pH 4-5 ab [Fok et al. 1987].

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde auf weitere pH-Titrations verzichtet und die Messungen immer bei pH 7,2 bis 7,4 durchgeführt.

Die folgende Abbildung 4.8 zeigt das Zetapotential der verschiedenen Partikel im Vergleich.

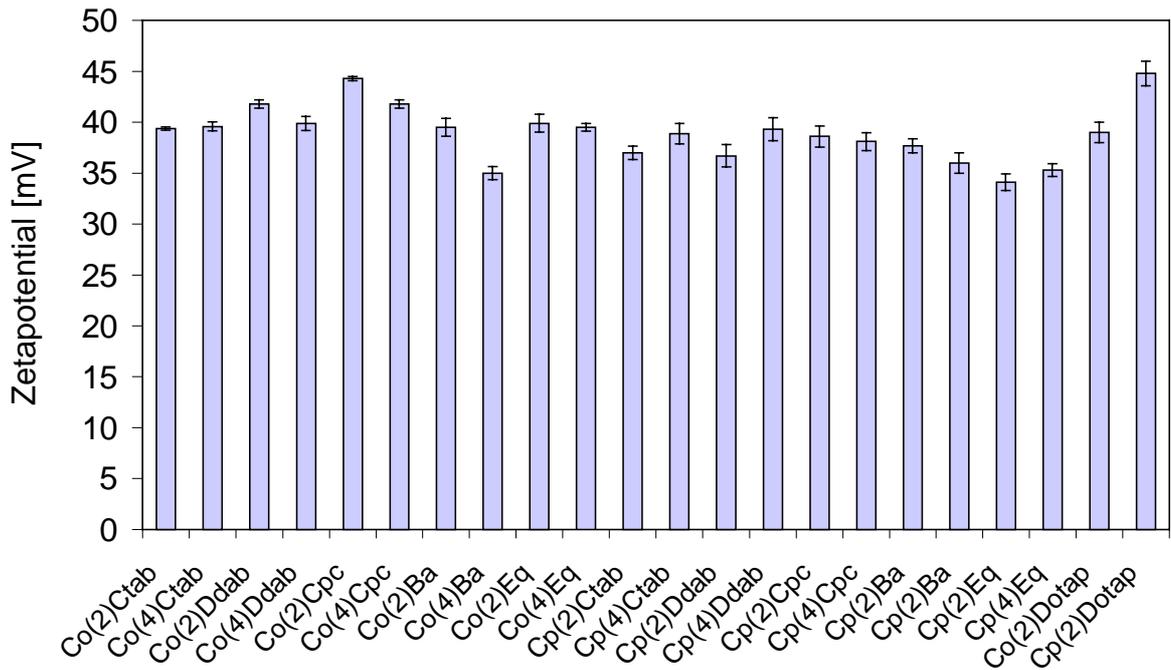


Abbildung 4.8: Zetapotential der 22 Formulierungen im Vergleich. Die Messung wurde bei einer Leitfähigkeit von  $50 \mu\text{S}/\text{cm}$  und bei pH 7,4 durchgeführt.

Das Zetapotential der verschiedenen Partikel differierte nicht stark voneinander. Es lag für alle Formulierungen etwa im Bereich von +34 bis +44 mV.

#### 4.2.2.3 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese diente der Charakterisierung der Partikel hinsichtlich ihrer Fähigkeit DNA so fest zu binden, daß sie im elektrischen Feld immobilisiert wird. Im Englischen wird dieses Experiment als „electrophoretic mobility shift assay“ bezeichnet. Die feste Bindung der DNA soll das Plasmid vor dem Abbau durch DNAsen schützen, die Interaktion mit anderen kationischen Substanzen minimieren und den Eintritt durch Endozytose der Partikel-DNA-Komplexe ermöglichen.

Die fertigen mit Ethidiumbromid angefärbten Gele wurden unter UV-Licht fotografiert. Am Anfang jedes Gels wurde jeweils der DNA-Sizer, das freie Plasmid und das Plasmid mit dem Partikel im Verhältnis 1:1 (d. h. kationisches Lipid zu Plasmid im Verhältnis von 0,25:1) aufgetragen. Anschließend folgten die aus verschiedenen SLN-Mengen und immer gleichbleibenden DNA-Anteilen zusammengesetzten Komplexe. Den Abschluß bildete jeweils eine freie Tasche. Von jedem dieser 22 Partikel wurde ein solches Gel angefertigt.

Die folgenden Abbildung 4.9 bis Abbildung 4.14 zeigen beispielhaft die Fotografien solcher Gele.

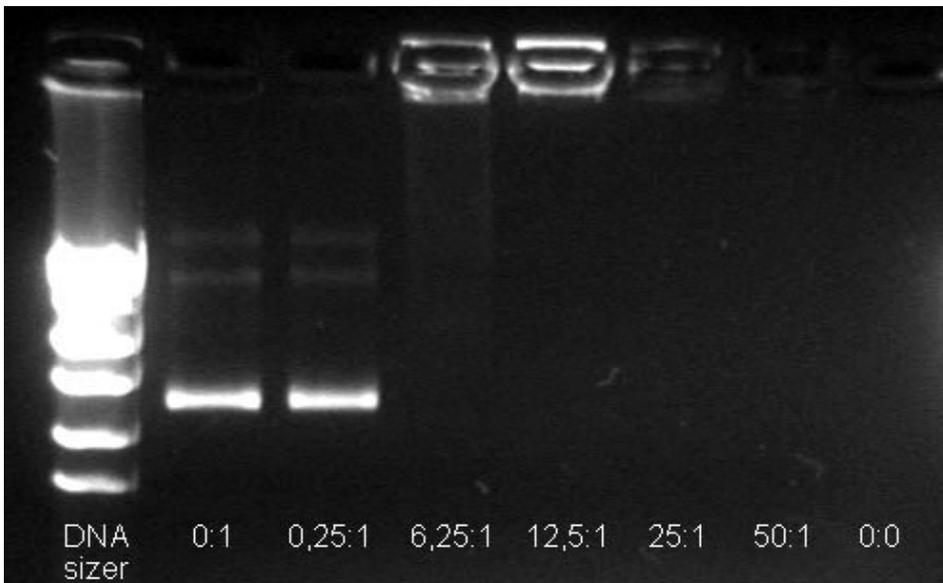


Abbildung 4.9: Mit Ethidiumbromid angefärbtes Agarosegel von Komplexen der Formulierung Co(2)Ctab mit DNA. Die Bildbeschriftungen geben das Massenverhältnis von CTAB:DNA an. Ab einem Massenverhältnis von CTAB:DNA von 25:1 war das Plasmid (pCMVbeta) vollständig immobilisiert. Das Verhältnis von 0:1 kennzeichnet eine Tasche, die nur das Plasmid enthält. Das Verhältnis 0:0 bezeichnet eine leere Geltasche.

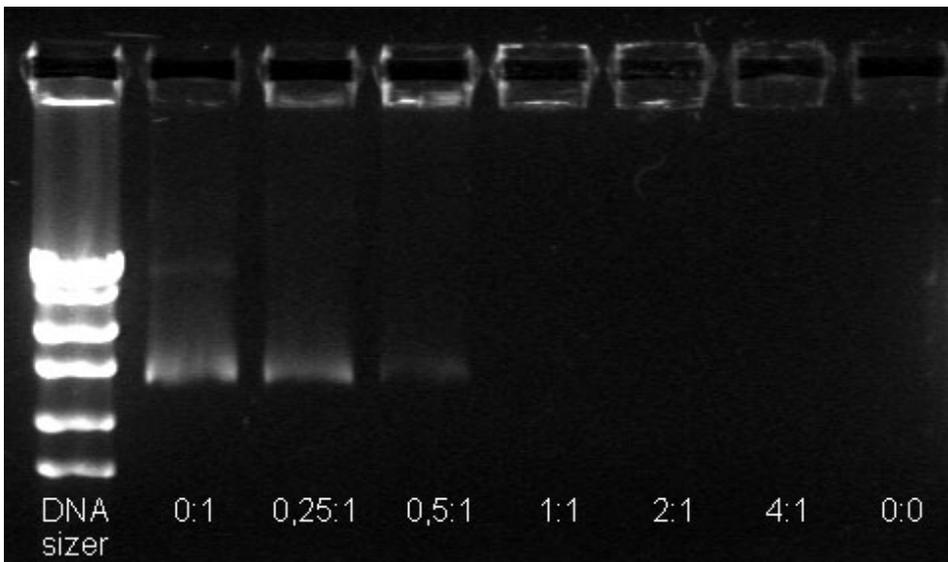


Abbildung 4.10: Mit Ethidiumbromid angefärbtes Agarosegel von Komplexen der Formulierung Co(2)Ddab mit DNA. Die Bildbeschriftungen geben das Massenverhältnis von DDAB:DNA an. Ab einem Massenverhältnis von DDAB:DNA von 1:1 war das Plasmid (pCMVbeta) vollständig immobilisiert. Das Verhältnis von 0:1 kennzeichnet eine Tasche, die nur das Plasmid enthält. Das Verhältnis 0:0 bezeichnet eine leere Geltasche.

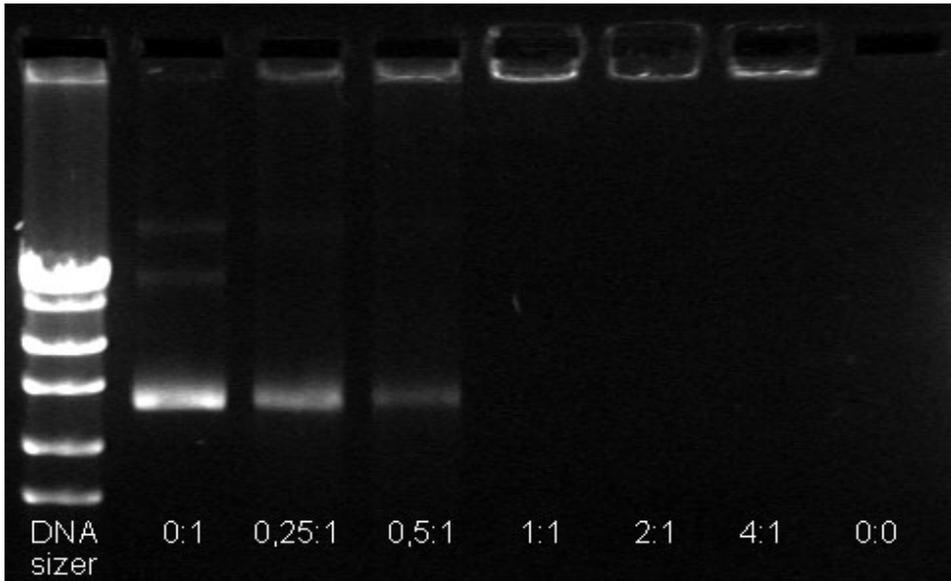


Abbildung 4.11: Mit Ethidiumbromid angefärbtes Agarosegel von Komplexen der Formulierung Co(2)Eq mit DNA. Die Bildbeschriftungen geben das Massenverhältnis von EQ1:DNA an. Ab einem Massenverhältnis von EQ1:DNA von 1:1 war das Plasmid (pCMVbeta) vollständig immobilisiert. Das Verhältnis von 0:1 kennzeichnet eine Tasche, die nur das Plasmid enthält. Das Verhältnis 0:0 bezeichnet eine leere Geltasche.

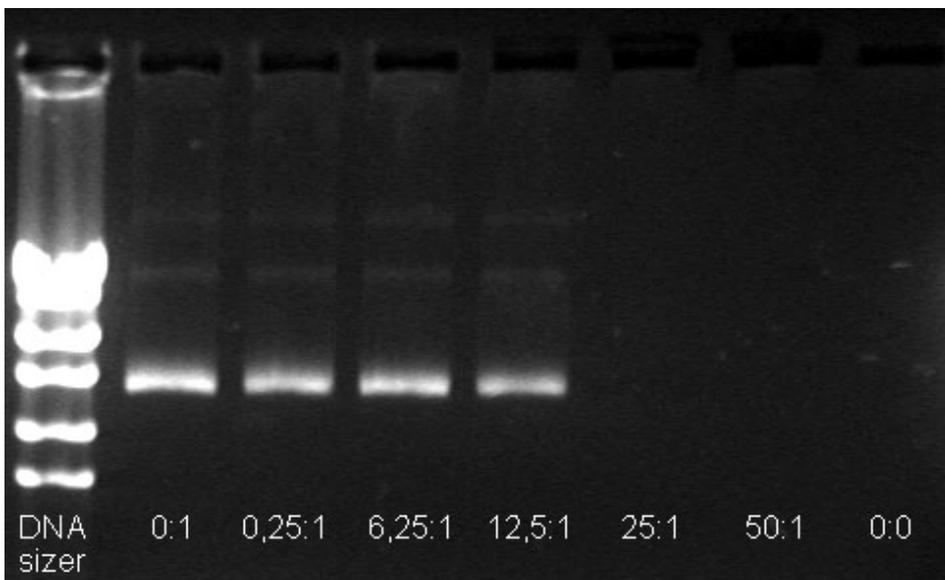


Abbildung 4.12: Mit Ethidiumbromid angefärbtes Agarosegel von Komplexen der Formulierung Cp(2)Cpc mit DNA. Die Bildbeschriftungen geben das Massenverhältnis von CPC:DNA an. Ab einem Massenverhältnis von CPC:DNA von 1:1 war das Plasmid (pCMVbeta) vollständig immobilisiert. Das Verhältnis von 0:1 kennzeichnet eine Tasche, die nur das Plasmid enthält. Das Verhältnis 0:0 bezeichnet eine leere Geltasche.

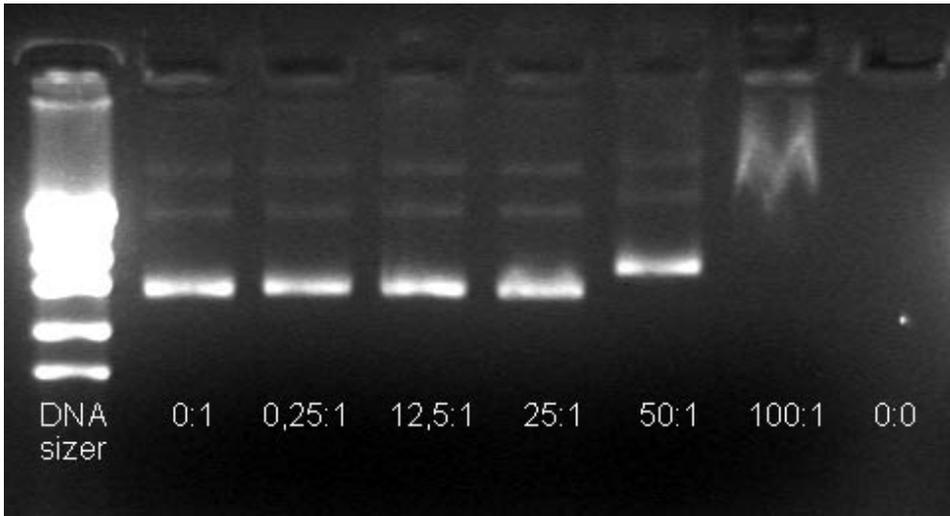


Abbildung 4.13: Mit Ethidiumbromid angefärbtes Agarosegel von Komplexen der Formulierung Cp(2)Ba mit DNA. Die Bildbeschriftungen geben das Massenverhältnis von BA:DNA an. Ab einem Massenverhältnis von 100:1 war das Plasmid vollständig immobilisiert. Das Verhältnis von 0:1 kennzeichnet eine Geltasche, die nur das Plasmid enthält. Das Verhältnis 0:0 bezeichnet eine leere Tasche.

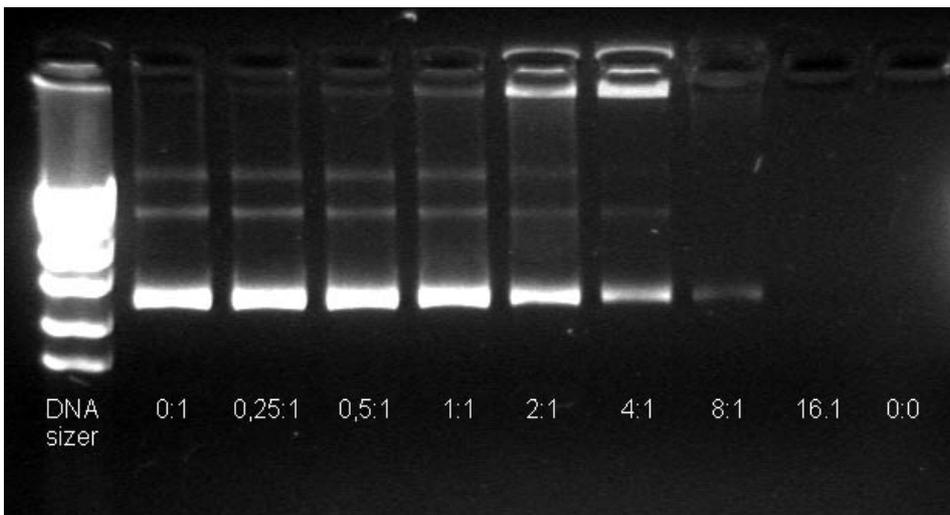


Abbildung 4.14: Mit Ethidiumbromid angefärbtes Agarosegel von Komplexen der Formulierung Co(2)Dotap mit DNA. Die Bildbeschriftungen geben das Massenverhältnis von DOTAP:DNA an. Ab einem Massenverhältnis von 16:1 war das Plasmid vollständig immobilisiert. Das Verhältnis von 0:1 kennzeichnet eine Geltasche, die nur das Plasmid enthält. Das Verhältnis 0:0 bezeichnet eine leere Tasche.

Mit Hilfe der Molecular Analyst Software wurde der Anteil freier DNA quantifiziert. Dieser wurde ins Verhältnis gesetzt zur Menge freier DNA ohne Partikel ( $\hat{=}$  100 %). Die leere Geltasche ohne DNA lieferte den Hintergrundwert ( $\hat{=}$  0 %). Der Anteil mobiler DNA wurde in Abhängigkeit vom der Menge an kationischem Lipid im DNA-Lipid-Komplexes dargestellt (Abbildung 4.15 bis Abbildung 4.20).

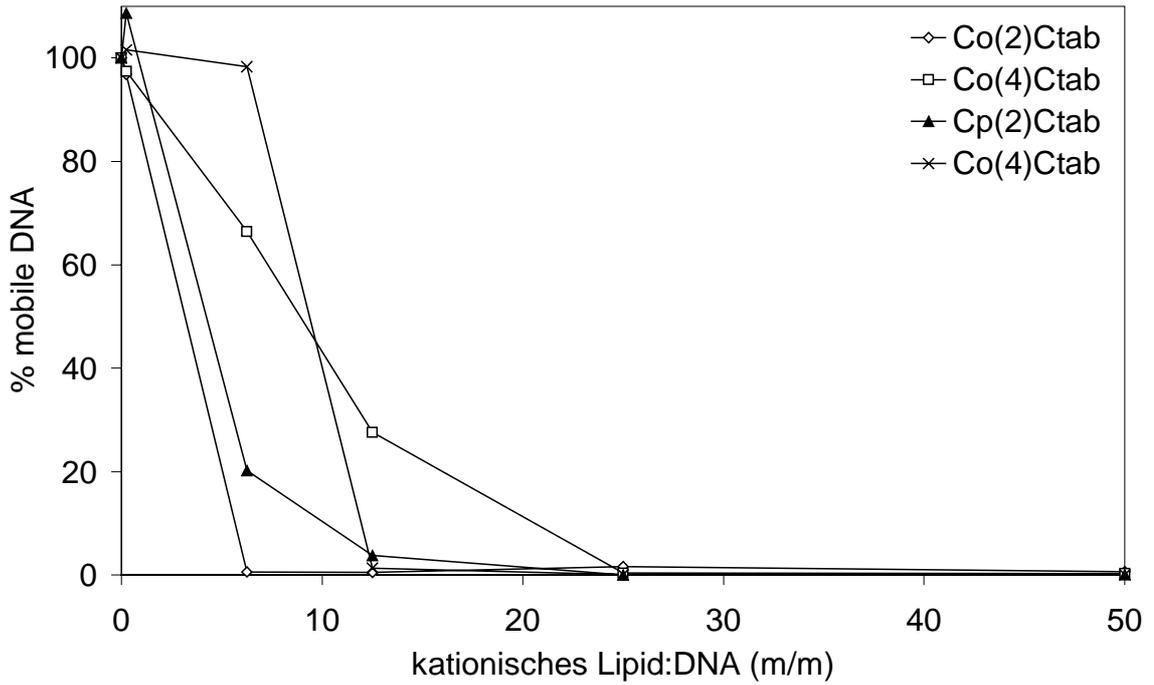


Abbildung 4.15: Vermögen der CTAB-SLN, pCMVbeta im Gel zu immobilisieren. Auf der x-Achse ist das Massenverhältnis von kationischem Lipid zu DNA angegeben, auf der y-Achse der prozentuale Anteil mobiler DNA.

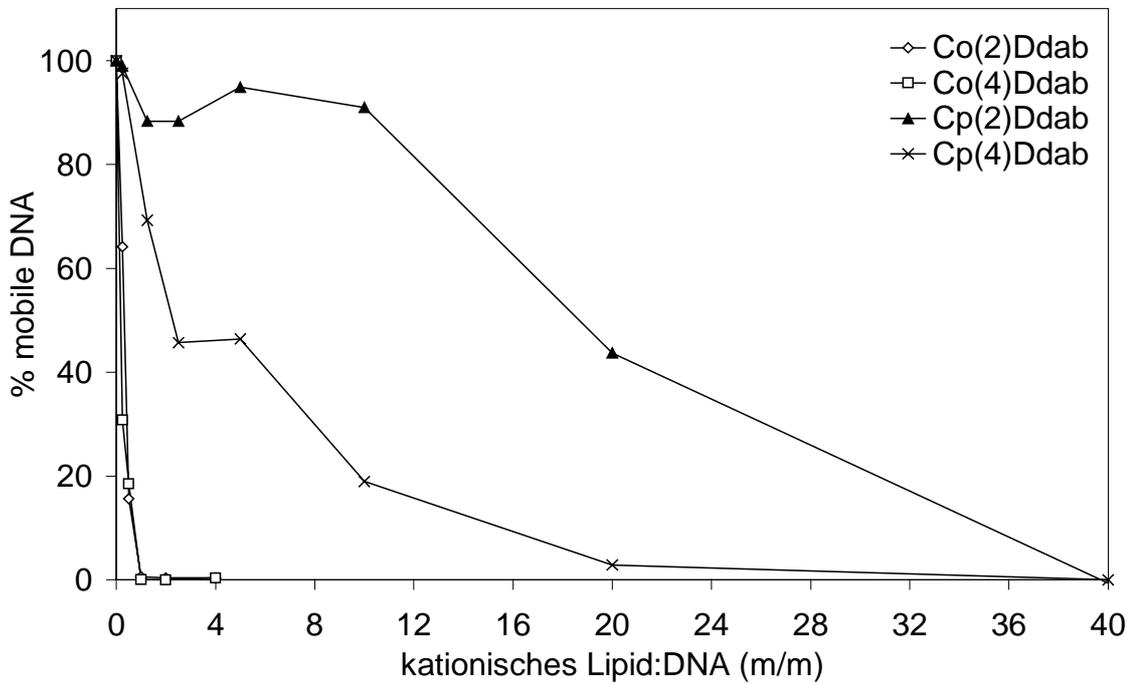


Abbildung 4.16: Vermögen der DDAB-SLN, pCMVbeta im Gel zu immobilisieren. Auf der x-Achse ist das Massenverhältnis von kationischem Lipid zu DNA angegeben, auf der y-Achse der prozentuale Anteil mobiler DNA.

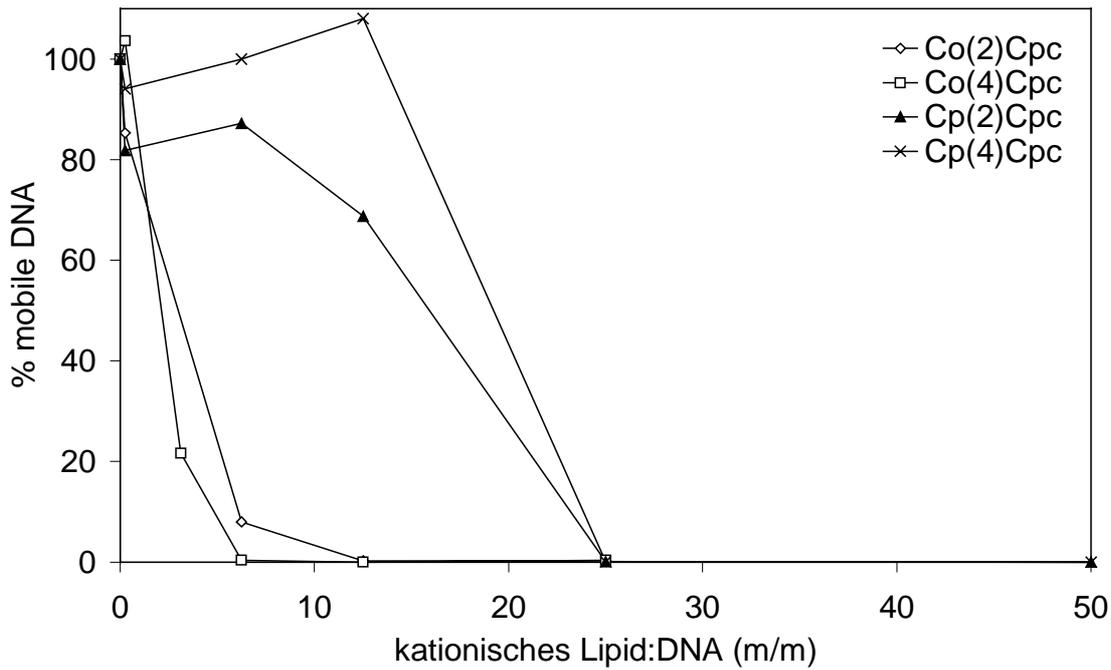


Abbildung 4.17: Vermögen der CPC-SLN, pCMVbeta im Gel zu immobilisieren. Auf der x-Achse ist das Massenverhältnis von kationischem Lipid zu DNA angegeben, auf der y-Achse der prozentuale Anteil mobiler DNA.

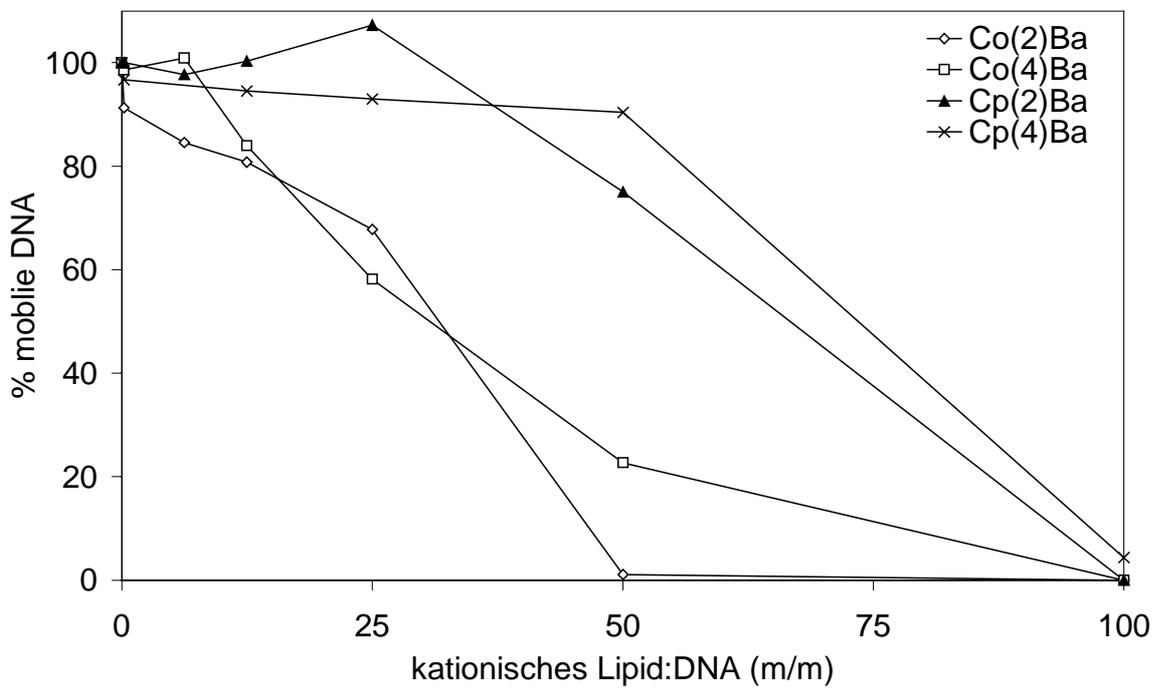


Abbildung 4.18: Vermögen der BA-SLN, pCMVbeta im Gel zu immobilisieren. Auf der x-Achse ist das Massenverhältnis von kationischem Lipid zu DNA angegeben, auf der y-Achse der prozentuale Anteil mobiler DNA.

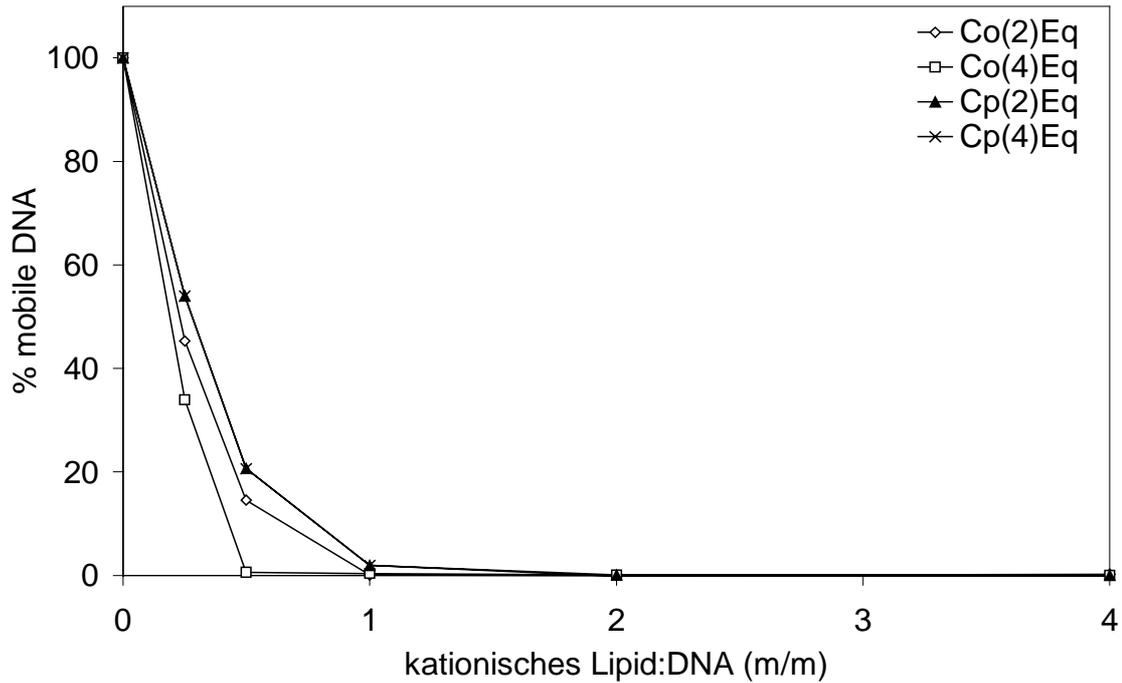


Abbildung 4.19: Vermögen der EQ1-SLN, pCMVbeta im Gel zu immobilisieren. Auf der x-Achse ist das Massenverhältnis von kationischem Lipid zu DNA angegeben, auf der y-Achse der prozentuale Anteil mobiler DNA.

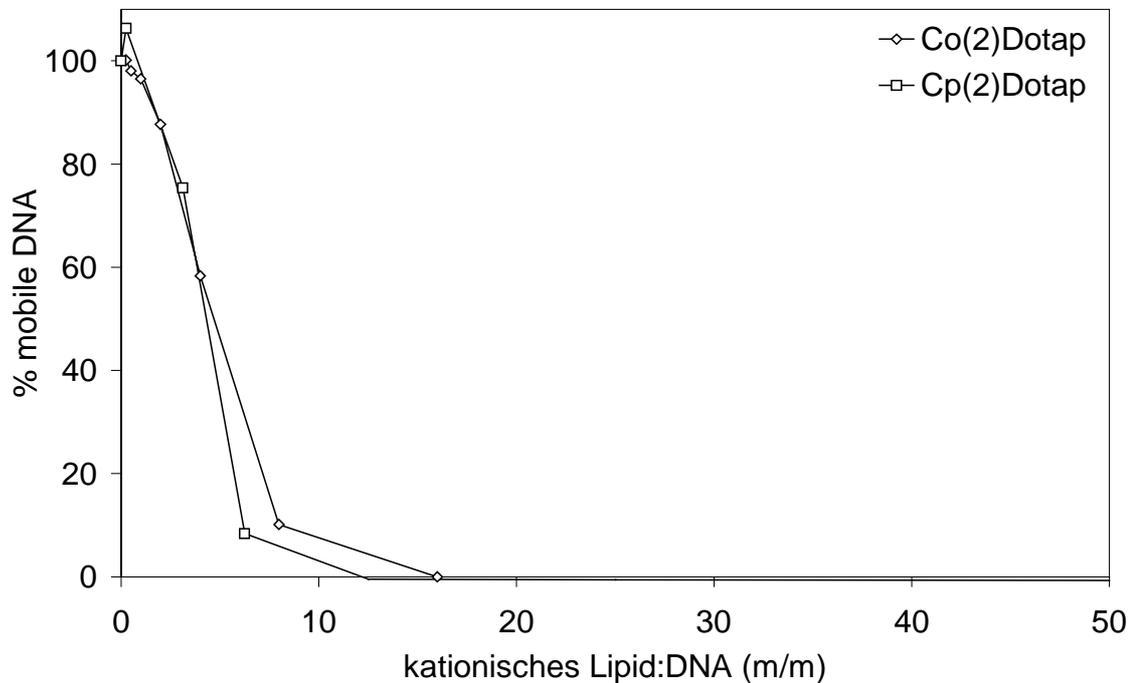


Abbildung 4.20: Vermögen der DOTAP-SLN, pCMVbeta im Gel zu immobilisieren. Auf der x-Achse ist das Massenverhältnis von kationischem Lipid zu DNA angegeben, auf der y-Achse der prozentuale Anteil mobiler DNA.

Um das Immobilisierungsvermögen der verschiedenen SLN-Formulierungen miteinander vergleichen zu können, werden in der Abbildung 4.21 nur die zur jeweils vollständigen Immobilisierung ( $\geq 95\%$ ) notwendigen Mengen bezogen auf das kationische Lipid dargestellt.

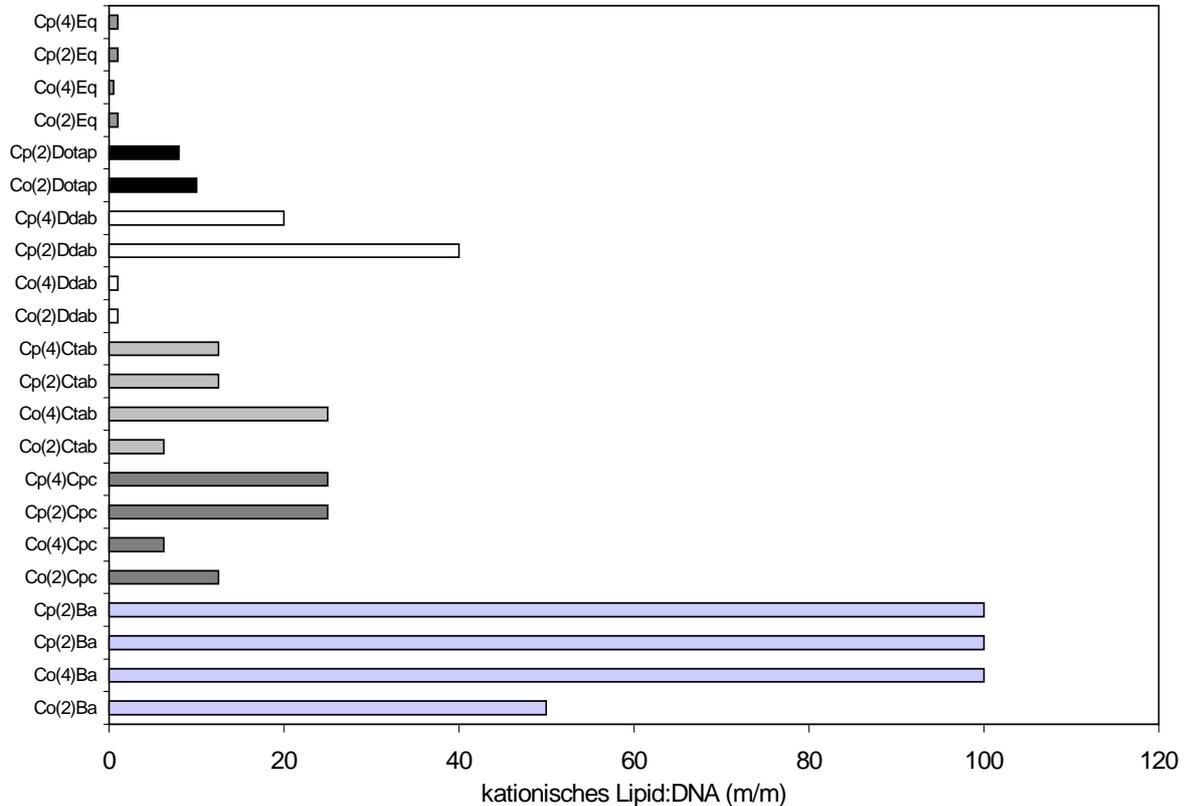


Abbildung 4.21: Notwendiger Überschuss an kationischem Lipid, um eine gegebene Menge DNA im Gel zu immobilisieren (d. h.  $> 95\%$  immobilisiert). Die Formulierungen enthalten alle 1%, z. T. unterschiedliche kationische Lipide.

Alle Partikel waren in der Lage, das Plasmid pCMVbeta zu immobilisieren.

Das DNA-Bindungsvermögen der verschiedenen Formulierungen war sehr unterschiedlich. Den größten Einfluß hatte die Art des verwendeten kationischen Lipids. Es ist zu erkennen, daß die unter Verwendung von BA hergestellten SLN pCMVbeta nur in sehr hohen Anteilen binden konnten. Die unter Verwendung von EQ1 gefertigten SLN immobilisierten die DNA dagegen schon im EQ1:DNA-Verhältnis von 0,5-1:1.

Die eingesetzte Menge an Tween 80/ Span 85 schien keinen merklichen Einfluß auf die DNA-Immobilisierungsfähigkeit zu haben. Das verwendete Matrixlipid beeinflusste die Bindungsfähigkeit bei einigen Formulierungen jedoch schon. Bei den unter Verwendung von DDAB, CPC und BA hergestellten SLN immobilisierten die Compritol-SLN die DNA

in geringeren Überschüssen als die Cetylpalmitat-SLN. Am ausgeprägtesten war dieser Effekt bei den SLN mit DDAB. Die Partikel aus Compritol und DDAB immobilisierten die DNA schon im Verhältnis von 1:1 vollständig, die aus Cetylpalmitat und DDAB erst bei 20 bzw. 40:1. Die mit CPC und Compritol hergestellten SLN banden schon bei 6,25:1 vollständig, die mit Cetylpalmitat dagegen erst bei 25:1. Bei BA banden alle vier Formulierungen erst in sehr hohem SLN-Überschuß, die unter Verwendung von Compritol hergestellten aber immerhin noch im Verhältnis von 50:1, die mit Cetylpalmitat erst bei 100:1.

Daraus läßt sich schließen, daß sowohl das kationische Lipid als auch das Matrixlipid und die jeweilige Kombination von beiden die DNA-Immobilisierungsfähigkeit beeinflussen. Vielleicht ist die Anordnung des kationischen Lipids auf der Partikeloberfläche von der Zusammensetzung der Lipidmatrix abhängig. Bestimmte Anordnungen und Ausrichtungen erleichtern eventuell die elektrostatischen Interaktionen mit der DNA, andere behindern sie.

Das Zetapotential der Partikel ohne DNA unterschied sich kaum voneinander. Die geringen Differenzen, die vorhanden waren, korrelierten nicht mit den Unterschieden in der DNA-Immobilisierungsfähigkeit.

## 4.2.3 Zellbiologische Charakterisierung der kationischen SLN

### 4.2.3.1 Zytotoxizität

Für SLN, deren Matrix aus Wachsen, Tri- oder Partialglyceriden besteht und die mit sterischen oder negativ geladenen Tensiden stabilisiert worden sind, ist in den zur Transfektion notwendigen, geringen Konzentrationen<sup>1</sup> bisher kein merklicher zytotoxischer Effekt beschrieben worden [Schöler et al. 2001a]. Durch den Einsatz von kationischen Tensiden, wie zum Beispiel CPC oder DDAB, kann die Verträglichkeit im Vergleich zu ungeladenen oder anionischen SLN verringert sein [Schöler 2001a, Schöler 2001b, Tabatt et al. 2002]. Auch liposomale Zubereitungen zur Transfektion zeigen in Abhängigkeit vom eingesetzten kationischen Lipid und der Konzentration mitunter erhebliche Toxizitäten [Leventis und Silvius 1990, Filion und Philips 1998]. Vor diesem Hintergrund war die Bestimmung der Zytotoxizität unerlässlich.

Die BA-SLN wurden nicht auf Zytotoxizität getestet, da sie pCMVbeta nur ungenügend binden konnten. Die Zytotoxizitätsbestimmungen wurden vor den Transfektionsversuchen durchgeführt, um eine Vorauswahl an Partikeln treffen zu können. Anschließend wurden nur solche Formulierungen auf ihre Transfektionseffizienz getestet, bei denen die zur vollständigen DNA-Immobilisierung notwendigen Partikelkonzentrationen, weit unterhalb der LD50 lagen.

#### 4.2.3.1.1 LDH-Test

Das Ausmaß der Freisetzung des zytoplasmatischen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) in das Kulturmedium ist ein direktes Maß für die Abnahme der Zellmembranintegrität und der Viabilität der Zelle. Die Laktatdehydrogenaseaktivität wurde direkt nach der vierstündigen Inkubation mit den verschiedenen SLN oder mit pEI aus dem Kulturmedium bestimmt. Das Ausmaß der Laktatdehydrogenasefreisetzung wurde um die natürliche LDH-Freisetzung unbehandelter Zellen (entspr. 0 % Toxizität) bereinigt. Die erhaltenen Werte

---

<sup>1</sup> (bei 4%igen SLN mit 1% kationischem Lipid sind die Zellen während der Transfektion nach unserem Protokoll in der Regel Konzentrationen des kationischen Lipids von 12,5-37,5 µg/ml und Matrixlipid-Konzentrationen von 50-150 µg/ml ausgesetzt das entspricht 0,005-0,02% SLN bezogen auf das Matrixlipid)

wurden mit der LDH-Freisetzung durch eine stark zytotoxische Zubereitung (entspr. 100 % Toxizität, nach Anweisung des Herstellers 2 % TritonX in Medium) ins Verhältnis gesetzt. Auf diese Weise konnten zellschädigende Wirkungen, die zu einer Störung der Zellmembranintegrität führten, quantifiziert werden (Abbildung 4.22).

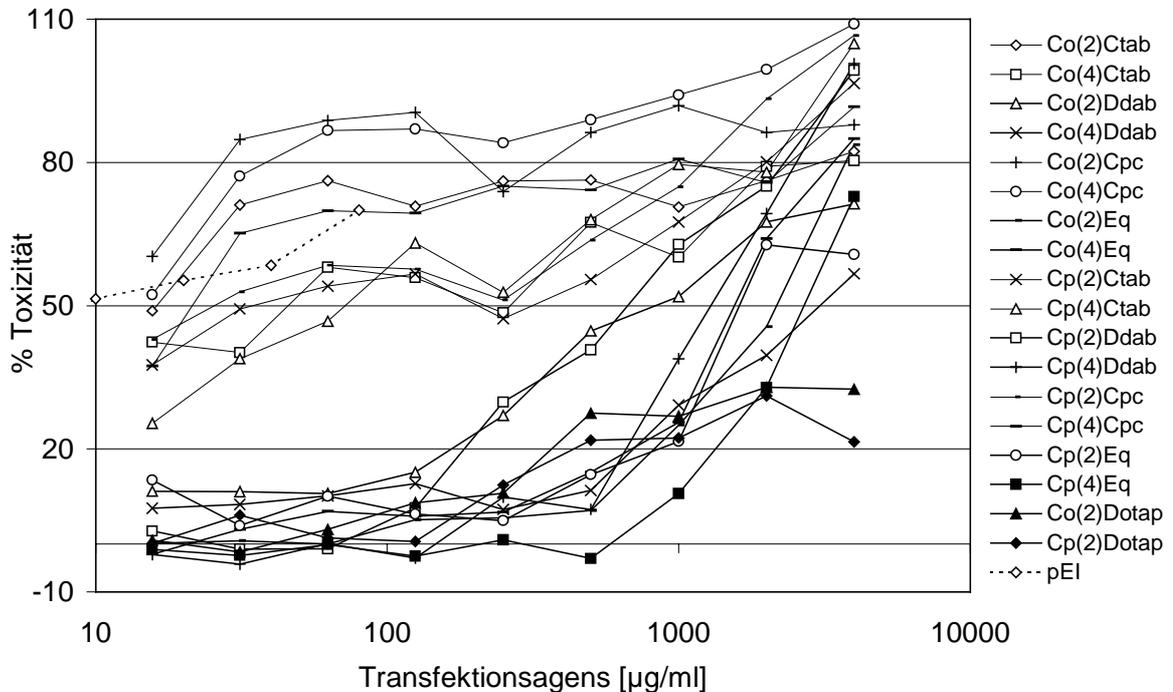


Abbildung 4.22 LDH-Test: prozentuale Zytotoxizität der getesteten SLN und von pEI in verschiedenen Konzentrationen. Durch die Inkubation der Zellen mit 2 %-igem TritonX in Medium erhält man den Wert für 100 % Toxizität. Zellen, die nur mit Medium behandelt wurden, liefern den 0 %-Wert.

Hier erkennt man, daß sich die verschiedenen Formulierungen bezüglich des Parameters Toxizität grob in zwei Gruppen einteilen ließen. Die wenig toxischen SLN zeigten alle erst oberhalb von 500-1000 µg/ml eine merkliche Toxizität. Dies waren die Verbindungen mit den kationischen Lipiden EQ1, DDAB und DOTAP (in der Grafik mit schwarzen Linien dargestellt). Bei diesen drei Lipiden handelte es sich jeweils um Verbindungen mit zwei aliphatischen Ketten (zweikettige Lipide). SLN mit CTAB und besonders CPC waren wesentlich toxischer. Eine merkliche Toxizität zeigte sich schon im Bereich von ca. 15-100 µg/ml. Beide Lipide haben nur eine aliphatische Kette (einkettige Lipide). Noch stärker toxisch war pEI.

#### 4.2.3.1.2 WST-Test

In den Mitochondrien lebender Zellen wird das WST-1 Reagens (siehe 2.1.14) zu einem orange gefärbten Formazan reduziert, welches spektrophotometrisch vermessen wird. Je mehr lebende Zellen vorhanden sind, je mehr Farbstoff wird gebildet und je höher ist die Extinktion. Sie wird mit der Extinktion von unbehandelten Zellen (entspricht 100 %-iger Viabilität) verglichen. Dadurch erhält man einen Wert, der die prozentuale Viabilität beschreibt. Die prozentuale Toxizität ergibt sich aus der Differenz dieses Wertes zu 100. Die Ergebnisse des WST-1 Testes sind in Abbildung 4.23 dargestellt.

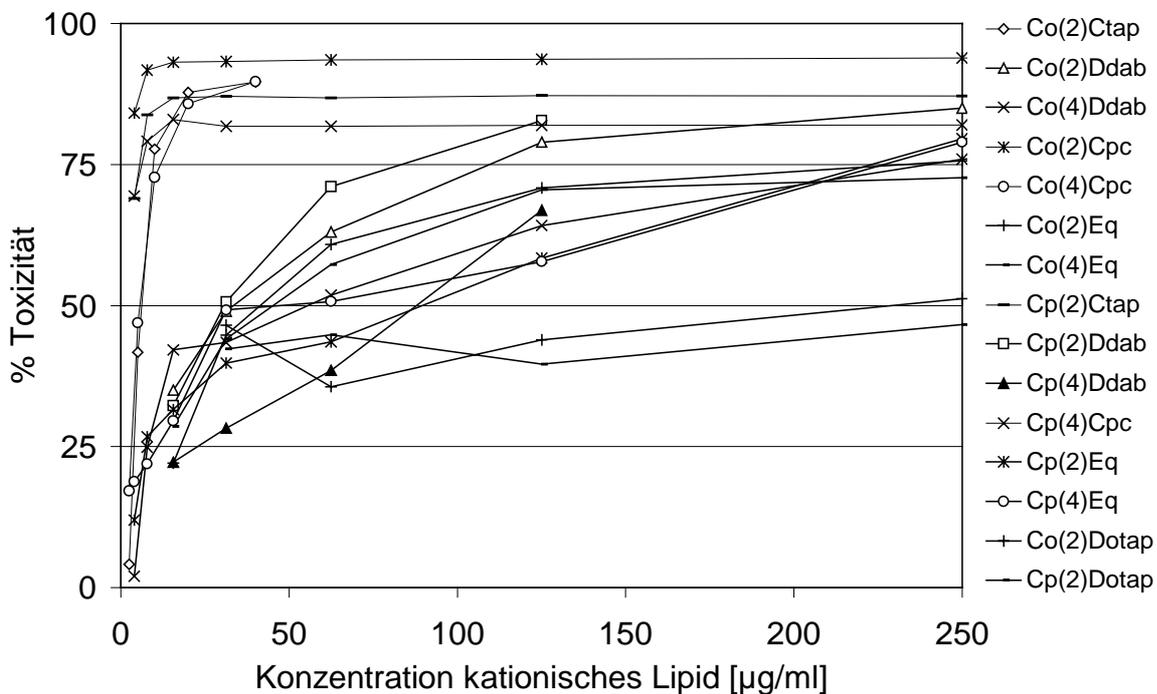


Abbildung 4.23 WST-1 Test: Prozentuale Zytotoxizität der verschiedenen Zubereitungen. Die prozentuale Toxizität wird durch den Vergleich mit unbehandelten Zellen (0 % Toxizität) berechnet.

#### 4.2.3.1.3 Zusammenfassung

Sowohl im LDH-Test (Abbildung 4.22) als auch mit Hilfe des WST-1 Tests (Abbildung 4.23) war zu erkennen, daß sich die SLN bezüglich des Parameters Toxizität in zwei große Gruppen einteilen ließen. Die Kurven verlaufen etwas anders, was darin zu begründen ist, daß beide Bestimmungen nach einem anderen Prinzip ablaufen. Beim LDH-Test wird die gefundene Toxizität mit der 100 %igen Zytotoxizität von TritonX verglichen. Beim WST-Test dagegen wird nicht die Toxizität, sondern die Viabilität im Vergleich mit unbehandelten Zellen bestimmt. Eine gute Kennzahl zum Vergleich verschiedener Zytotoxizitäten miteinander ist die LD50 (Abbildung 4.24 und Abbildung 4.25). Die LD50 bezeichnet hier die Konzentration des kationischen Lipids, bei der die Viabilität der Zellen um 50 % verringert ist. Je größer die LD50, je geringer ist die Toxizität der Zubereitung.

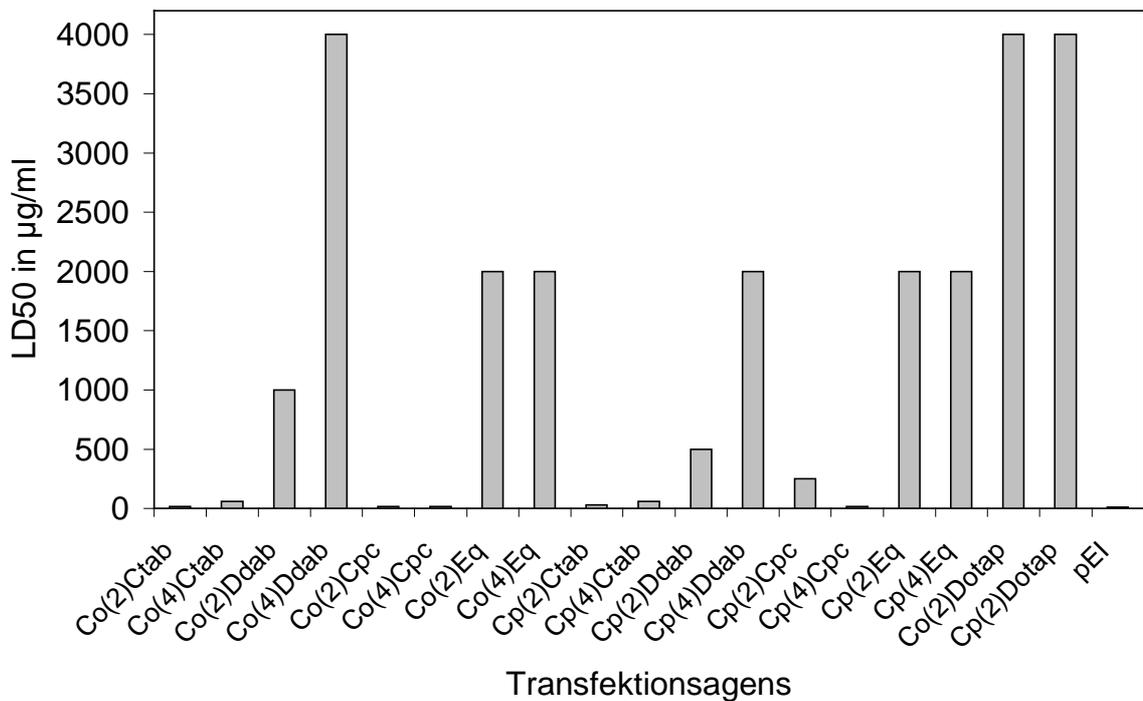


Abbildung 4.24 LDH-Freisetzungstest: LD50 der verschiedenen SLN-Zubereitungen. Beim LDH-Test beschreibt die LD50 die Konzentration, bei der die LDH-Freisetzung nur 50 % des Maximalwertes beträgt.

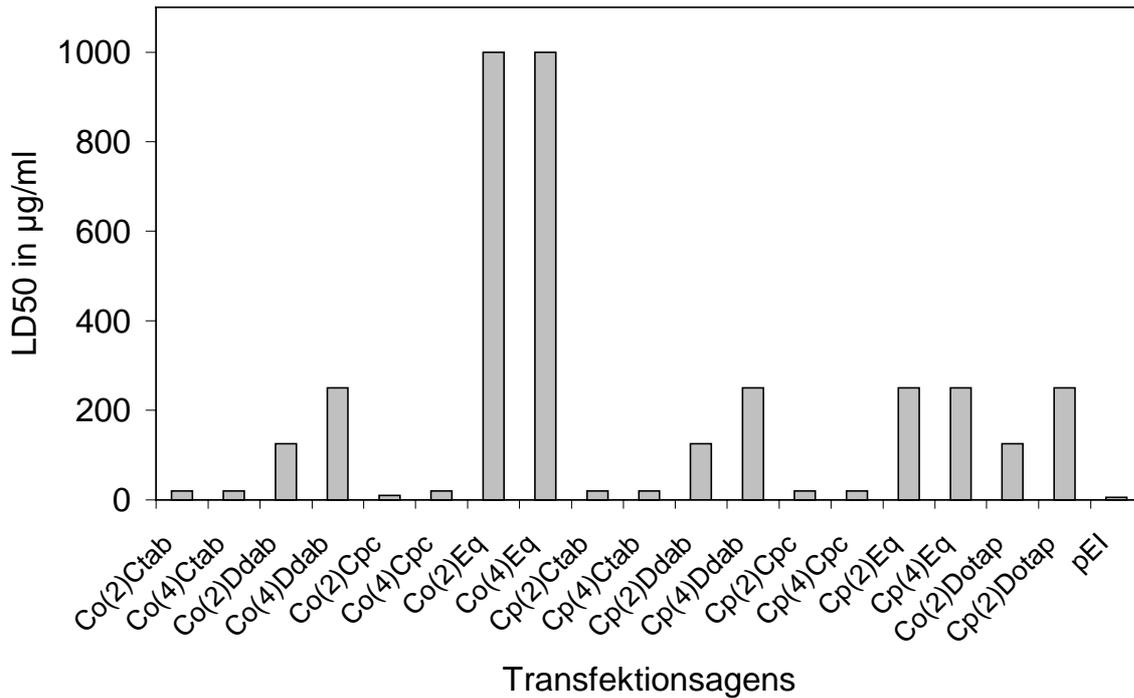


Abbildung 4.25 WST-1 Test: LD50 der verschiedenen SLN-Zubereitungen. Beim WST-1 Test beschreibt die LD50 die Konzentration, bei der halb so viel oranges Formazan gebildet worden ist, wie bei unbehandelten Zellen.

Die LD50 Werte des WST-1 Tests waren generell geringer als die des LDH-Tests. Das liegt höchstwahrscheinlich, wie vorhin schon erwähnt, an den unterschiedlichen Auswertungskriterien der beiden Teste begründet. Doch ähnelten sich die Aussagen stark. SLN, die unter Zusatz von CTAB oder CPC hergestellt worden sind, zeigten alle eine wesentlich höhere Toxizität als die unter Zusatz von DDAB, EQ1 oder DOTAP produzierten. Bei den kationischen Lipiden, die den SLN eine merkliche Toxizität verliehen, handelte es sich um Lipide mit einer aliphatischen Kohlenstoffkette (einkettige Lipide). CPC zeigte eine noch stärkere Toxizität als CTAB. Bei den relativ untoxischen kationischen Lipiden DDAB, DOTAP und EQ1 handelte es sich dagegen um zweikettige Lipide. Über die erhöhte Zytotoxizität von einkettigen kationischen Lipiden gegenüber zweikettigen wurde auch bei Untersuchungen an kationischen Liposomen berichtet [Pinnaduwa et al. 1989]. Die Toxizität der SLN wird also durch die Wahl des kationischen Lipids bestimmt. Um eine Minderung der Toxizität zu erreichen, sind zweikettige kationische Lipide den einkettigen vorzuziehen. pEI zeigt eine wesentlich höhere Toxizität als die meisten SLN-Formulierungen.

In der folgenden Tabelle 4.5 wird die SLN-Konzentration einer jeden Formulierung, die zur vollständigen Immobilisierung des Plasmids notwendig ist, mit der LD50 aus LDH und WST-1 Test verglichen.

Tabelle 4.5: Gegenüberstellung der zur vollständigen DNA-Immobilisierung notwendigen SLN-Konzentration (bei gegebener DNA Konzentration von 5 µg/ml) und der LD50 Konzentrationen aus LDH und WST-1 Test. Alle SLN-Formulierungen enthalten 1 % kationisches Lipid.

Formulierung	SLN-Konzentration (µg/ml), um 5µg/ml DNA zu immobilisieren	LD50 im LDH-Test (µg/ml)	LD50 im WST-1 Test (µg/ml)
Co(2)Ctab	125	>15,6	>20
Co(4)Ctab	500	<62,5	>20
Co(2)Ddab	<b>20</b>	<b>1000</b>	<b>&gt;125</b>
Co(4)Ddab	<b>20</b>	<b>&lt;4000</b>	<b>250</b>
Co(2)Cpc	250	<15,6	>10
Co(4)Cpc	125	15,6	20
Co(2)Eq	<b>20</b>	<b>&gt;2000</b>	<b>1000</b>
Co(4)Eq	<b>10</b>	<b>&lt;2000</b>	<b>&gt;1000</b>
Cp(2)Ctab	500	31,3	20
Cp(4)Ctab	500	>62,5	>20
Cp(2)Ddab	800	>500	125
Cp(4)Ddab	400	>2000	>250
Cp(2)Cpc	250	250	20
Cp(4)Cpc	250	>15,6	20
Cp(2)Eq	<b>20</b>	<b>2000</b>	<b>&gt;250</b>
Cp(4)Eq	<b>20</b>	<b>&gt;2000</b>	<b>250</b>
Co(2)Dotap	<b>320</b>	<b>&gt;4000</b>	<b>&gt;125</b>
Cp(2)Dotap	<b>250</b>	<b>&gt;4000</b>	<b>&lt;250</b>
pEI	5-20	10	<5

Hieraus wurde ersichtlich, daß die Formulierungen mit CTAB oder CPC zu toxisch waren, um auf Transfektion getestet zu werden. Das Transfektionsassay war so konzipiert, daß die DNA-Konzentration im Transfektionsmedium 5 µg/ml betrug. Dabei wurden die verschiedenen Partikel in SLN:DNA-Verhältnissen eingesetzt, die um das Verhältnis der vollständigen DNA-Immobilisierung herum angesiedelt waren. Der Grund für diese Vorgehensweise liegt in der Annahme begründet, daß freies Plasmid ohne Vektor nur eine ganz geringe Transfektionseffizienz zeigt, leicht von DNAsen abgebaut oder von Serumproteinen komplexiert wird. Ist die zur vollständigen DNA-Immobilisierung notwendige Partikelkonzentration schon größer als die LD50, so ist es nicht sehr vielversprechend, diese Formulierungen auf ihre Transfektionseffizienz zu testen. pEI zeigte ein ebenfalls recht ungünstiges Verhältnis von Toxizität zu eingesetzter Konzentration im Transfektionsassay.

Andererseits erkennt man, daß die Formulierungen mit DDAB, EQ1 oder DOTAP ein sehr viel günstigeres Verhältnis zeigten. Die Toxizität trat bei den Formulierungen Co(2)Ddab, Co(4)Ddab, Co(2)Eq, Co(4)Eq, Cp(2)Eq, Cp(4)Eq, Co(2)Dotap und Cp(2)Dotap erst in Konzentrationen auf, die um ein Vielfaches größer waren, als die im Transfektionsassay eingesetzten. Bei den Formulierungen Cp(2)Ddab und Cp(4)Ddab war diese Differenz nicht so groß, doch das lag an der größeren Partikelmenge die notwendig war, um die DNA zu binden.

### **4.2.3.2 In-vitro-Transfektion**

Die Transfektionseffizienz wurde aus den in 4.2.3.1 erläuterten Gründen nur für die Formulierungen mit DDAB, EQ1 und DOTAP ermittelt.

Die eingesetzten SLN:DNA-Verhältnisse orientierten sich an den durch die Gelelektrophorese ermittelten Verhältnissen, bei denen die DNA vollständig immobilisiert wurde. Von den jeweils fünf aufgetragenen SLN-DNA-Komplexen waren jeweils 2 unterhalb und 2 oberhalb dieses Verhältnisses angesiedelt. Der Grund für diese Vorgehensweise liegt in der Annahme begründet, daß freies Plasmid ohne Vektor nur eine ganz geringe Transfektionseffizienz zeigt, leicht von DNAsen abgebaut oder von Serumproteinen komplexiert wird. Auch in der Literatur finden sich Aussagen, daß das für die Transfektion optimale DNA-Partikel-Verhältnis mit dem DNA-Bindungsverhalten korreliert [Kneuer 2000].

Die Transfektion wurde wie unter 2.1.15 beschrieben durchgeführt. Die erhaltenen Lumineszenzwerte, die in der Einheit „relative Licht-Units“ (RLU) dargestellt werden, wurden

durch den Proteingehalt im jeweiligen Well geteilt. Angenommen wurde hierbei, daß tote Zellen in Folge der häufigen Waschschrte entfernt worden sind. Auf diese Weise sind unterschiedliche Versuchsdurchläufe oder -protokolle, die nicht immer mit den gleichen Zellzahlen pro Vertiefung arbeiten, vergleichbar. Andererseits wird durch diese Art der Berechnung eine eventuell vorhandene leichte Toxizität eines Vektors nicht als Nachteil dargestellt. Transfezieren zwei Vektoren zum Beispiel genauso gut, der eine ist völlig un-toxisch und der andere hat eine gewisse Toxizität, so werden sie mit diesem Verfahren die gleichen Ergebnisse zeigen. Deshalb ist es wichtig, um einen Vektor letztlich beurteilen zu können, auch die Toxizitätsdaten bestimmt zu haben.

In den Abbildung 4.26 bis Abbildung 4.36 werden die Ergebnisse der Transfektionsversuche zunächst für jeden einzelnen Partikel und pEI gesondert dargestellt.

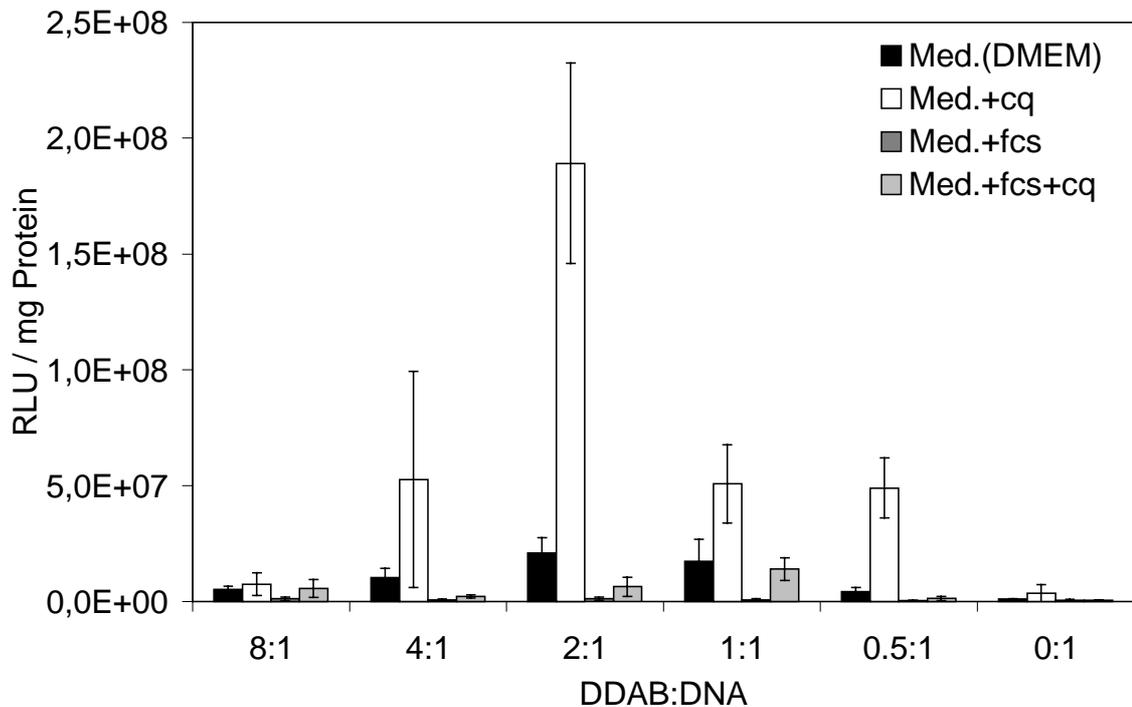


Abbildung 4.26: Transfektionsaktivität von Co(2)Ddab in verschiedenen DDAB-DNA-Massenverhältnissen in unterschiedlichen Inkubationsmedien (DMEM = Med., DMEM mit 100 µM Chloroquin = Med.+cq, DMEM mit 10 % FCS = Med.+fcs und DMEM mit 100 µM Chloroquin und 10 % FCS = Med.+fcs+cq). Das Verhältnis 0:1 kennzeichnet die Transfektionseffizienz von Plasmid ohne Vektor. Die y-Achse ist linear skaliert.

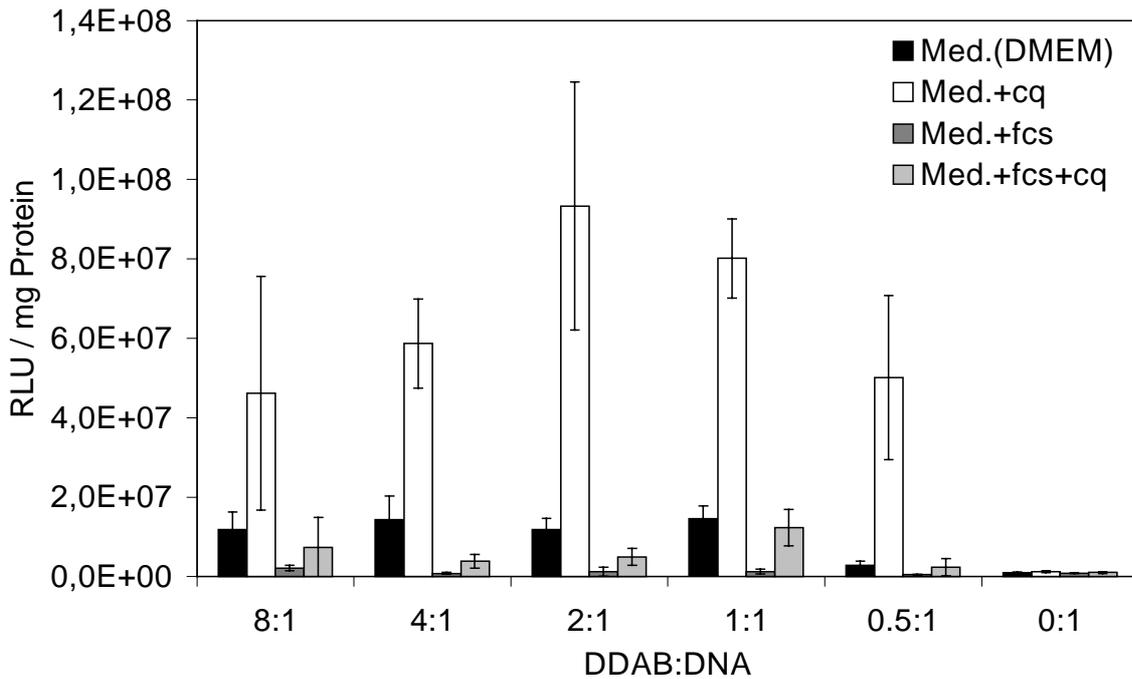


Abbildung 4.27: Transfektionsaktivität von Co(4)Dab in verschiedenen DDAB-DNA-Massenverhältnissen in unterschiedlichen Inkubationsmedien (DMEM = Med., DMEM mit 100  $\mu$ M Chloroquin = Med.+cq, DMEM mit 10 % FCS = Med.+fcs und DMEM mit 100  $\mu$ M Chloroquin und 10 % FCS = Med.+fcs+cq). Das Verhältnis 0:1 kennzeichnet die Transfektionseffizienz von Plasmid ohne Vektor. Die y-Achse ist linear skaliert.

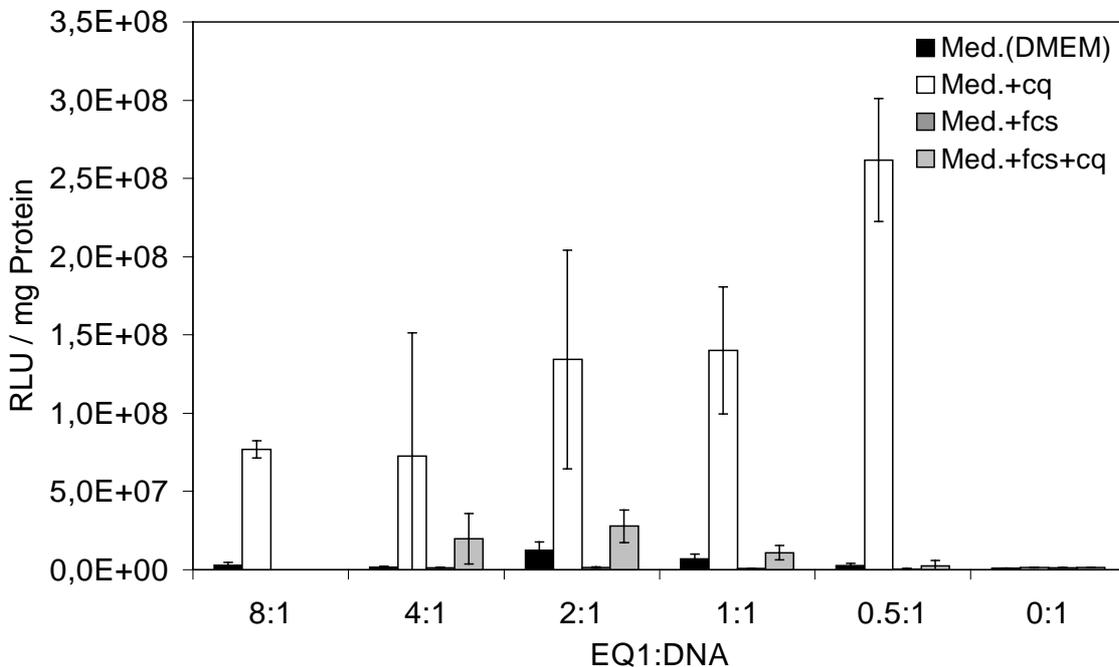


Abbildung 4.28: Transfektionsaktivität von Co(2)Eq in verschiedenen EQ1-DNA-Massenverhältnissen in unterschiedlichen Inkubationsmedien (DMEM = Med., DMEM mit 100  $\mu$ M Chloroquin = Med.+cq, DMEM mit 10 % FCS = Med.+fcs und DMEM mit 100  $\mu$ M Chloroquin und 10 % FCS = Med.+fcs+cq). Das Verhältnis 0:1 kennzeichnet die Transfektionseffizienz von Plasmid ohne Vektor. Die y-Achse ist linear skaliert.

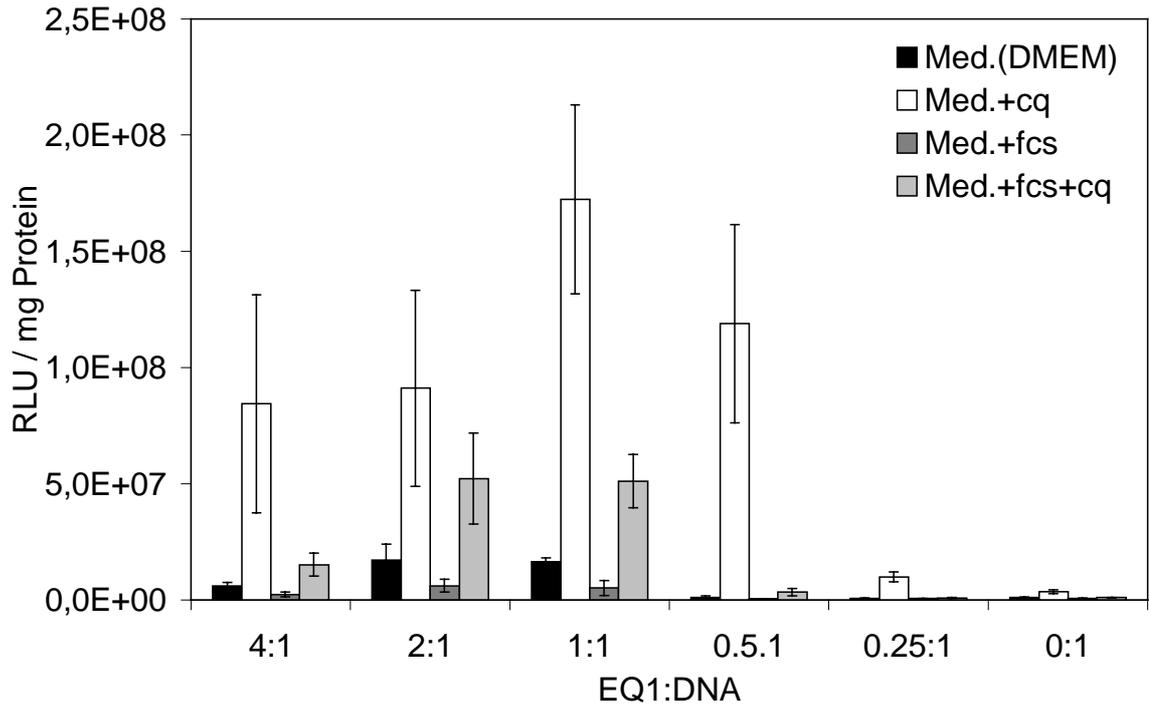


Abbildung 4.29: Transfektionsaktivität von Co(4)Eq in verschiedenen EQ1-DNA-Massenverhältnissen in unterschiedlichen Inkubationsmedien (DMEM = Med., DMEM mit 100  $\mu$ M Chloroquin = Med.+cq, DMEM mit 10 % FCS = Med.+fcs und DMEM mit 100  $\mu$ M Chloroquin und 10 % FCS = Med.+fcs+cq). Das Verhältnis 0:1 kennzeichnet die Transfektionseffizienz von Plasmid ohne Vektor. Die y-Achse ist linear skaliert.

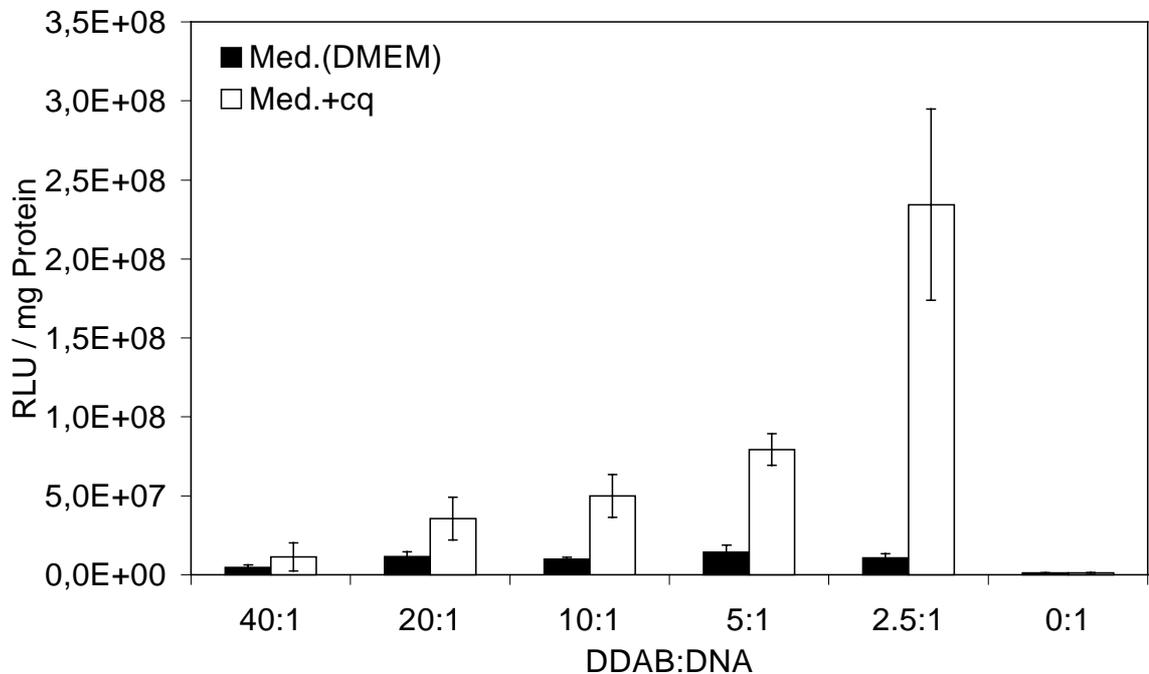


Abbildung 4.30: Transfektionsaktivität von Cp(2)Ddab in verschiedenen DDAB-DNA-Massenverhältnissen in unterschiedlichen Inkubationsmedien (DMEM = Med. und DMEM mit 100  $\mu$ M Chloroquin = Med.+cq). Das Verhältnis 0:1 kennzeichnet die Transfektionseffizienz von Plasmid ohne Vektor. Die y-Achse ist linear skaliert.

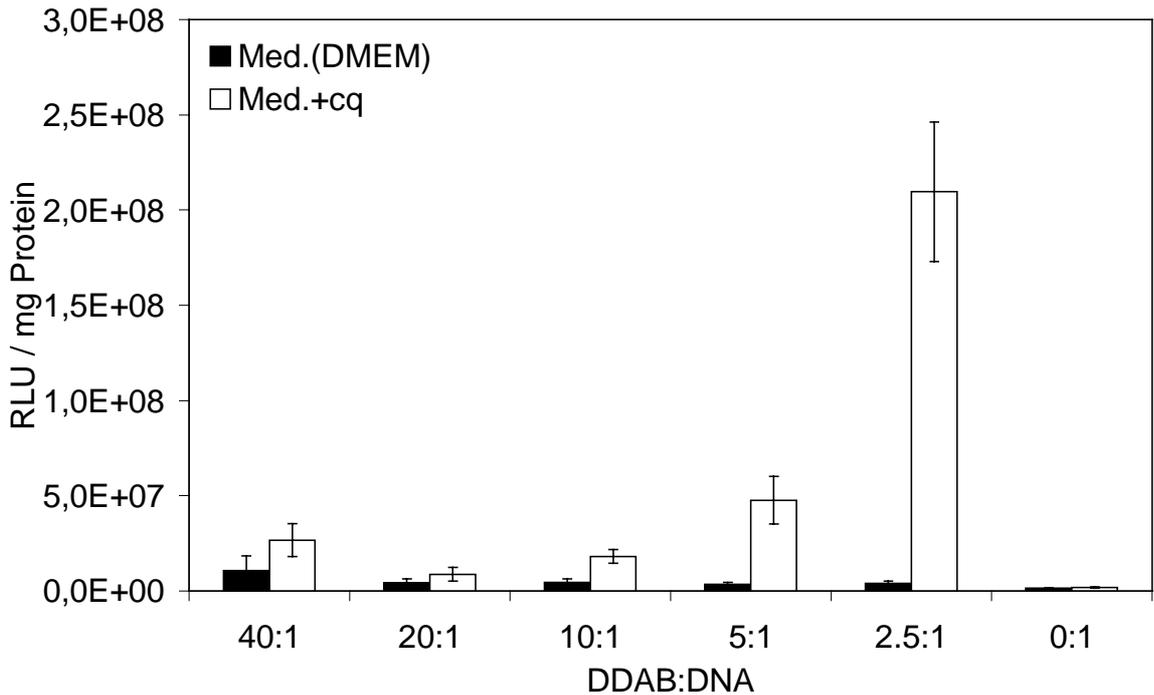


Abbildung 4.31: Transfektionsaktivität von Cp(4)Ddab in verschiedenen DDAB-DNA-Massenverhältnissen in unterschiedlichen Inkubationsmedien (DMEM = Med. und DMEM mit 100  $\mu$ M Chloroquin = Med.+cq). Das Verhältnis 0:1 kennzeichnet die Transfektionseffizienz von Plasmid ohne Vektor. Die y-Achse ist linear skaliert.

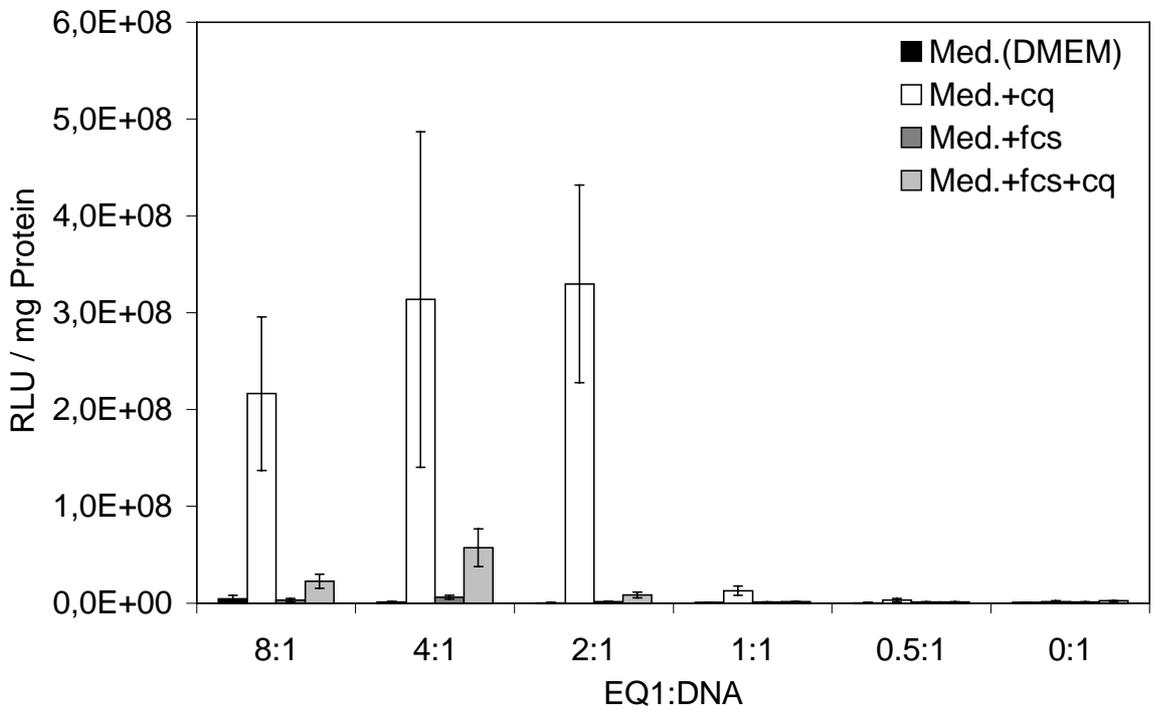


Abbildung 4.32: Transfektionsaktivität von Cp(2)Eq in verschiedenen EQ1-DNA-Massenverhältnissen in unterschiedlichen Inkubationsmedien (DMEM = Med., DMEM mit 100  $\mu$ M Chloroquin = Med.+cq, DMEM mit 10 % FCS = Med.+fcs und DMEM mit 100  $\mu$ M Chloroquin und 10 % FCS = Med.+fcs+cq). Das Verhältnis 0:1 kennzeichnet die Transfektionseffizienz von Plasmid ohne Vektor. Die y-Achse ist linear skaliert.

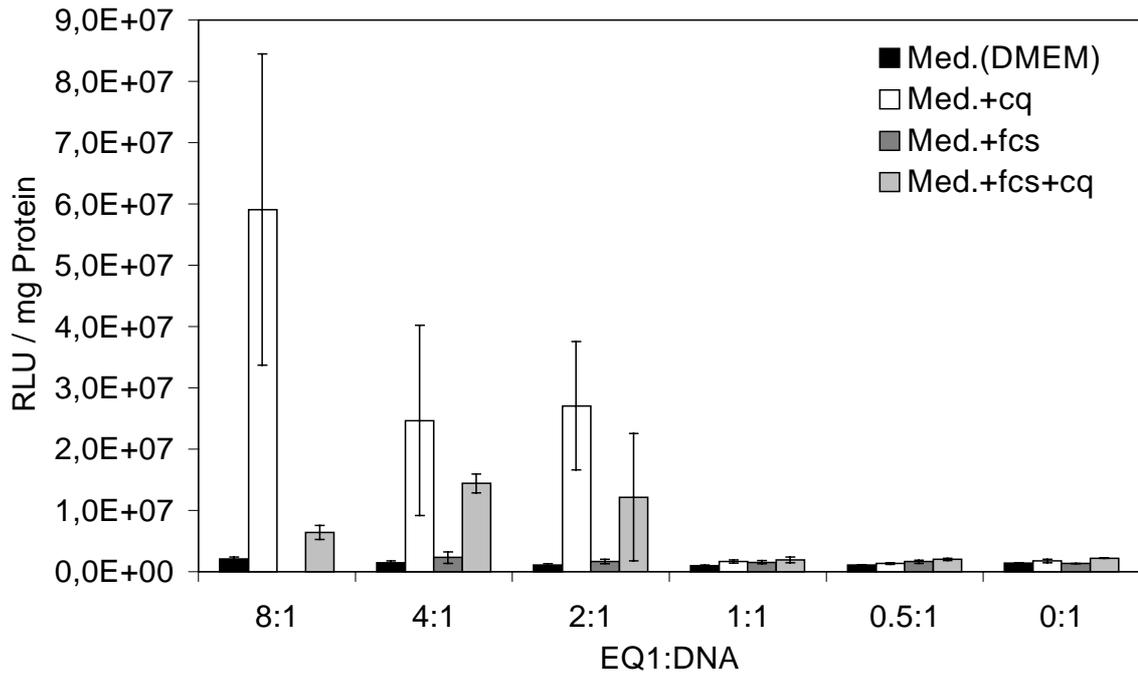


Abbildung 4.33: Transfektionsaktivität von Cp(4)Eq in verschiedenen EQ1-DNA-Massenverhältnissen in unterschiedlichen Inkubationsmedien (DMEM = Med., DMEM mit 100  $\mu$ M Chloroquin = Med.+cq, DMEM mit 10 % FCS = Med.+fcs und DMEM mit 100  $\mu$ M Chloroquin und 10 % FCS = Med.+fcs+cq). Das Verhältnis 0:1 kennzeichnet die Transfektionseffizienz von Plasmid ohne Vektor. Die y-Achse ist linear skaliert.

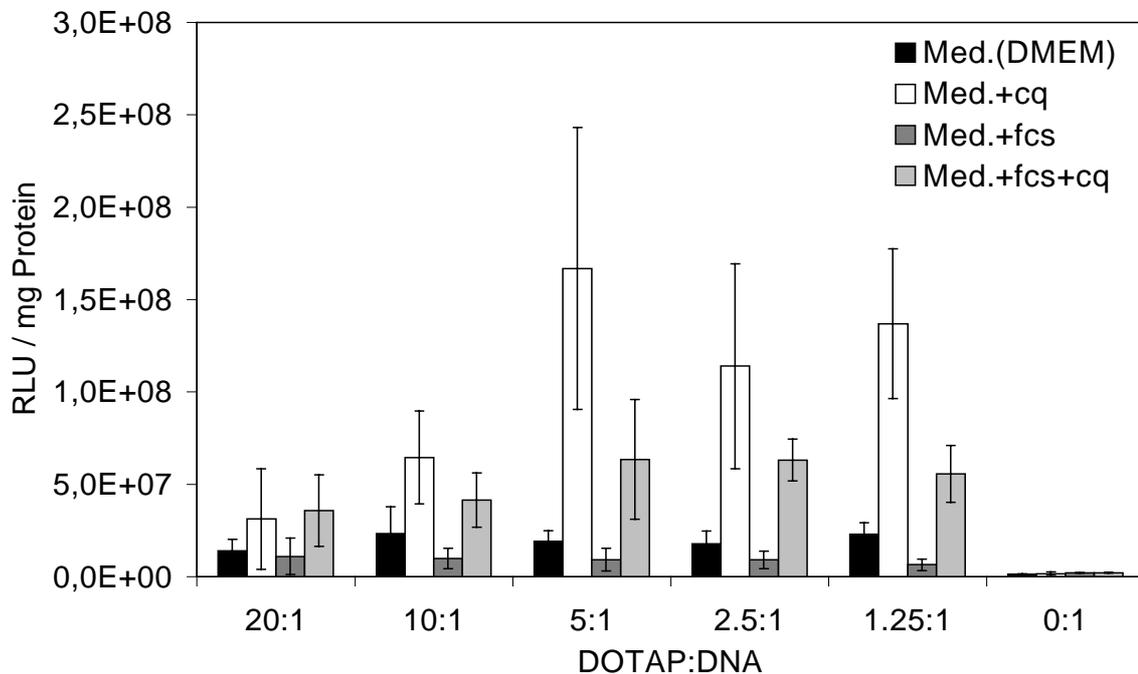


Abbildung 4.34: Transfektionsaktivität von Co(2)Dotap in verschiedenen DOTAP-DNA-Massenverhältnissen in unterschiedlichen Inkubationsmedien (DMEM = Med., DMEM mit 100  $\mu$ M Chloroquin = Med.+cq, DMEM mit 10 % FCS = Med.+fcs und DMEM mit 100  $\mu$ M Chloroquin und 10 % FCS = Med.+fcs+cq). Das Verhältnis 0:1 kennzeichnet die Transfektionseffizienz von Plasmid ohne Vektor. Die y-Achse ist linear skaliert.

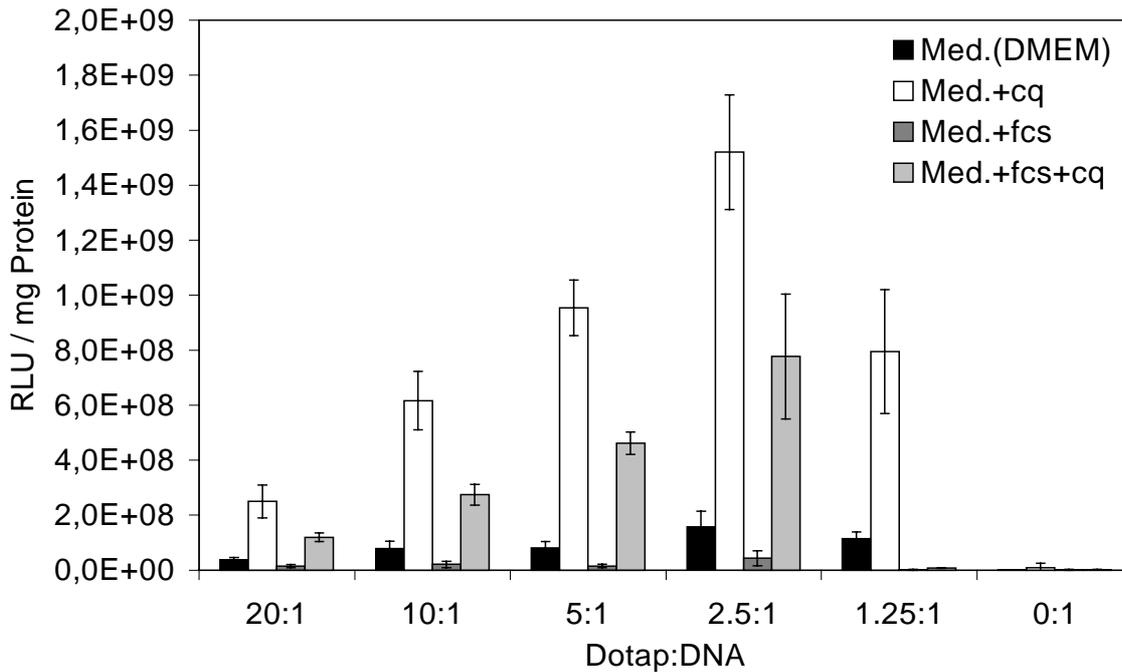


Abbildung 4.35: Transfektionsaktivität von Cp(2)Dotap in verschiedenen DOTAP-DNA-Massenverhältnissen in vier verschiedenen Inkubationsmedien (DMEM = Med., DMEM mit 100  $\mu$ M Chloroquin = Med.+cq, DMEM mit 10 % FCS = Med.+fcs und DMEM mit 100  $\mu$ M Chloroquin und 10 % FCS = Med.+fcs+cq). Das Verhältnis 0:1 kennzeichnet die Transfektionseffizienz von Plasmid ohne Vektor. Die y-Achse ist linear skaliert.

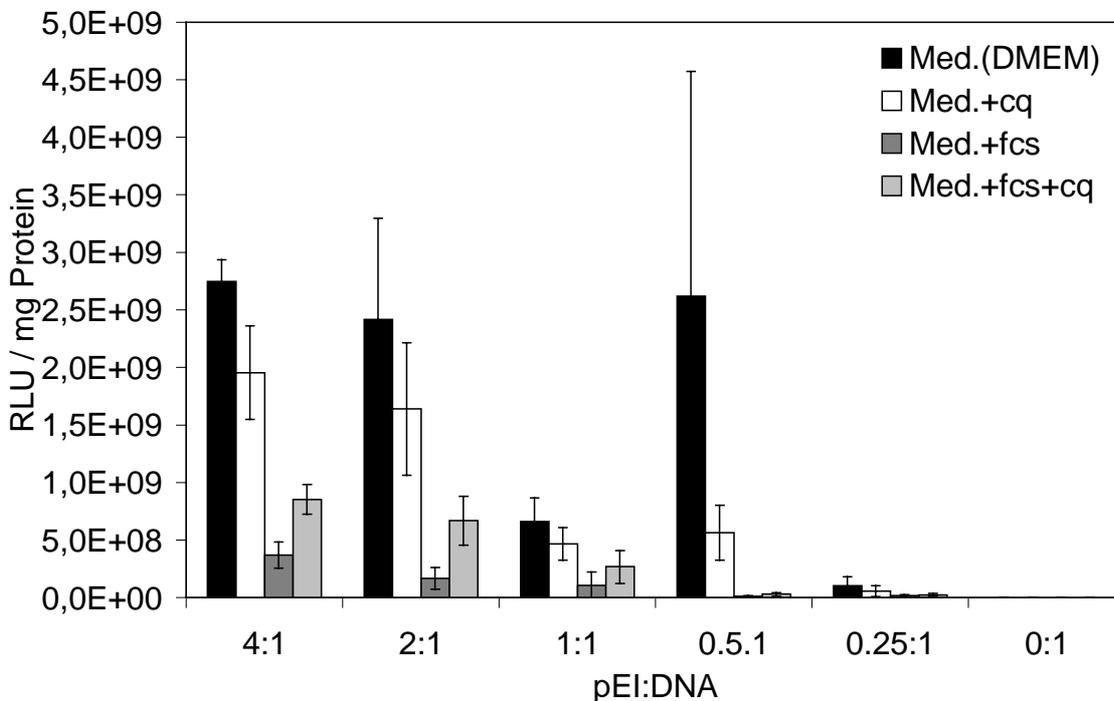


Abbildung 4.36: Transfektionsaktivität von pEI in verschiedenen pEI-DNA-Massenverhältnissen in unterschiedlichen Inkubationsmedien (DMEM = Med., DMEM mit 100  $\mu$ M Chloroquin = Med.+cq, DMEM mit 10 % FCS = Med.+fcs und DMEM mit 100  $\mu$ M Chloroquin und 10 % FCS = Med.+fcs+cq). Das Verhältnis 0:1 kennzeichnet die Transfektionseffizienz von Plasmid ohne Vektor. Die y-Achse ist linear skaliert.

Die TransoPlexe<sup>®</sup> aller untersuchten SLN-Formulierungen zeigten gute Transfektionsraten. Die Transfektionseffizienz war im Vergleich zu pCMVbeta ohne Vektor stark erhöht.

Besonders in Medium mit CQ war die beta-Galaktosidaseexpression hoch. Im Vergleich mit pEI zeigte sich, daß z. B. Formulierung Cp(2)Dotap (Abbildung 4.35) sogar die Hälfte dieses Wertes erreichte.

Der Zusatz von CQ erhöhte bei allen SLN die Transfektionseffizienz. Sollten die Komplexe durch Endozytose aufgenommen werden, so gelangen sie ins Endosom (vgl.4.1.4). Die Endosomen fusionieren mit den Lysosomen [Bally et al. 1999]. Diese enthalten viele hydrolytische Enzyme, unter anderen auch saure Nukleasen, welche ihr pH-Optimum im Sauren haben [Wattiaux et al. 2000]. Diese Enzyme führen zu einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Inaktivierung der zu transfezierenden DNA. Der für CQ angenommene Wirkmechanismus [Luthman und Magusson 1983, Ciftci und Levy 2001] beruht darauf, den lysosomalen pH-Wert anzuheben. Dieser für die lysosomalen Enzyme ungünstige pH führt zu einem verminderten lysosomalen Abbau der eingeschleusten DNA. Erhöht der Zusatz von CQ also die Transfektionseffizienz, so ist es ein Hinweis darauf, daß sich die Komplexe vor dem Eintritt ins Zytosol in den Endosomen befinden und höchstwahrscheinlich über Endozytose in die Zelle gelangt sind [Zabner et al. 1995]. Zabner hat Versuche an Cos-1 Zellen durchgeführt, die beweisen, daß Lipoplexe über Endozytose aufgenommen werden. Auch für die meisten Polyplexe wird die Endozytose als Haupteintrittsmechanismus angesehen [Wagner et al. 1992, Plank et al. 1998].

Bei pEI führte der Zusatz von CQ zu DMEM ohne Serum zu einer Abnahme der Effizienz im Vergleich zu reinem DMEM. pEI benötigt keine lysosomotrophen Substanzen, da pEI selber endosomolytische Fähigkeiten haben soll [Boussif et al. 1995]. Durch eine Erhöhung des osmotischen Drucks in den Endosomen platzen diese und geben die DNA frei. Eine Zugabe von CQ schien nur die Toxizität zu erhöhen und störte somit die Transfektion.

Die Zugabe von 10 % Serum zum Transfektionsmedium verringerte die Effizienz. Die Effizienz war aber immer noch signifikant höher als bei nacktem Plasmid. Das Ausmaß dieser Aktivitätsabnahme durch Serum war allerdings unterschiedlich ausgeprägt. Bei DOTAP-SLN kam es nur zu einer Reduktion der Aktivität auf die Hälfte, bei EQ1 auf etwa ein Drittel bis ein Viertel und bei DDAB-SLN war die Effizienzverminderung noch stärker

ausgeprägt. Die Inaktivierung durch Serum ist auch ein Problem bei kationischen Liposomen [Felger et al. 1987]. Für Liposomen wird diese Inaktivierung durch elektrostatische Wechselwirkungen mit den Serumproteinen erklärt [Li und Huang 2000]. Die elektrostatische Interaktion mit anionischen Serumproteinen soll teilweise zur Freisetzung der DNA aus den Lipoplexen führen. Die Abnahme der Effektivität wird ebenfalls durch die Hinderung der Komplexe, mit der Zellmembran zu interagieren, erklärt, was zur verminderten Aufnahme in die Endosomen führt [Yang und Huang 1997]. Andere Autoren verbreiten die Annahme, daß die Aktivitätsminderung auf einer Hemmung der Zunahme der Lipoplexgröße in Anwesenheit von Serum beruht [Escriou et al. 1998a, Ross und Hui 1999]. Man ist sich also nicht ganz einig, was genau die Gründe für diesen Effekt sind. Sicher ist nur, daß er bei nahezu allen Liposomen und allen untersuchten Zelllinien in mehr oder weniger ausgeprägtem Maße auftritt. Wie es scheint, tritt diese Seruminaktivierung in ähnlicher Weise auch bei den TransoPlexen<sup>®</sup> auf. Die Transfektionseffizienz von pEI wurde durch die Zugabe von 10 % Serum ebenfalls verringert. Zum besseren Vergleich der Aktivitäten wurden alle SLN-Formulierungen in den jeweils transfektionseffizientesten SLN:DNA-Verhältnissen gegen freies Plasmid und pEI aufgetragen (Abbildung 4.37).

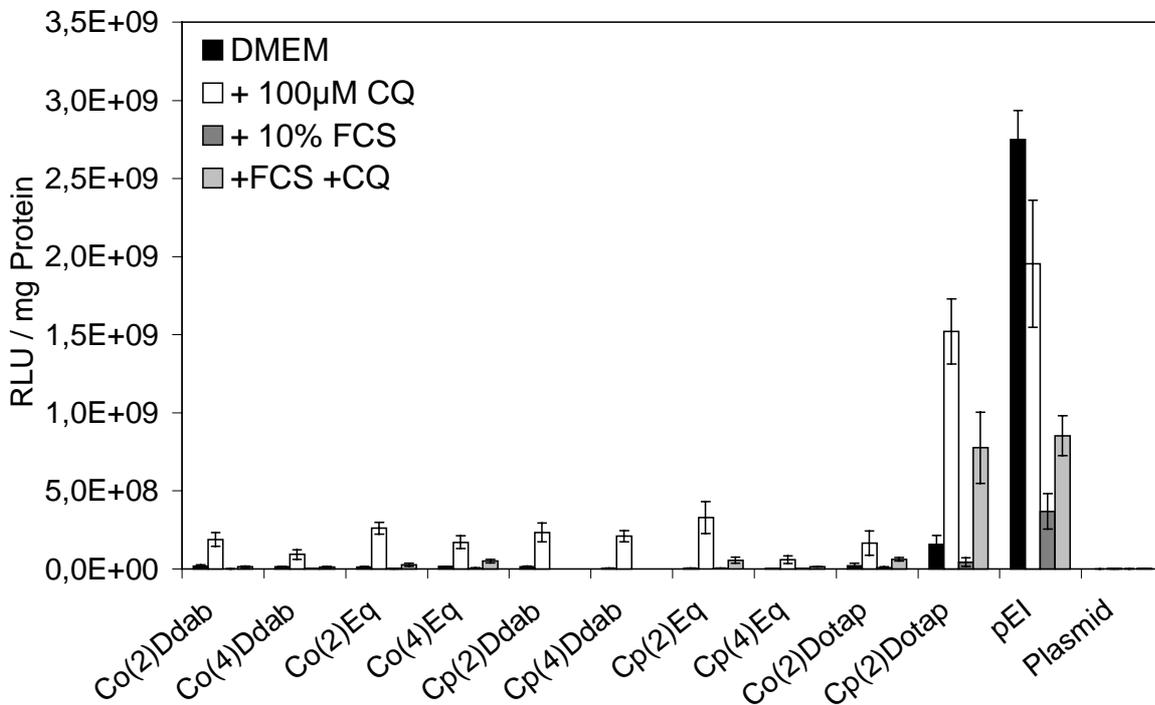


Abbildung 4.37: Vergleich der maximal gemessenen Transfektionseffizienzen der verschiedenen SLN-Formulierungen mit pEI und freiem Plasmid (Plasmid). Die beta-Galaktosidase-expression durch freies Plasmid ist so gering, daß sie bei dieser Skalierung nicht zu erkennen ist. Die y-Achse ist linear skaliert.

Die getesteten SLN-Formulierungen konnten alle transfezieren. Die Effizienz war im Vergleich zu freier DNA erheblich gesteigert. Co(2)Ddab, Co(4)Ddab, Co(2)Eq, Co(4)Eq, Cp(2)Ddab, Cp(4)Ddab, Cp(2)Eq, Cp(4)Eq und Co(2)Dotap steigerten die Transfektionsrate verglichen mit der von freier DNA um etwa eine Zehnerpotenz. Unter Zusatz von CQ trat sogar eine 100-fache Effizienzsteigerung auf. Cp(2)Dotap setzte sich von den anderen Formulierungen ab, denn diese Zubereitung steigerte die Transfektionsrate gegenüber freier DNA um das 100-fache und unter Zusatz von CQ sogar um drei Zehnerpotenzen! Beim Vergleich mit pEI zeigten die Formulierungen Co(2)Ddab, Co(4)Ddab, Co(2)Eq, Co(4)Eq, Cp(2)Ddab, Cp(4)Ddab, Cp(2)Eq, Cp(4)Eq und Co(2)Dotap etwa 10 % von dessen Aktivität. Cp(2)Dotap brachte es sogar auf 50 % der Aktivität von pEI. Felgner et al. haben die Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der Art der Alkylkette untersucht [Felgner et al. 1994]. Sie kamen zu dem Schluß, daß die Transfektionsaktivität von C18:1 höher als von C16:0 und C18:0 ist. Das traf auch hier zu, denn DOTAP hat zwei Kohlenstoffketten mit je 18 C-Atomen und je einer Doppelbindung (C18:1), während EQ1 auch 18 C-Atome aber keine Doppelbindungen (C18:0) zeigt.

Inwiefern unterschied sich die Formulierung Cp(2)Dotap von den anderen?

Sie enthielt 1 % DOTAP, so wie auch Co(2)Dotap. Die anderen SLN dagegen enthielten EQ1 oder DDAB als kationisches Lipid. Das kationische Lipid allein konnte also nicht diesen Unterschied bewirkt haben. Ein weiterer Unterschied war das Matrixlipid. Co(2)Dotap bestand aus Compritol, Cp(2)Dotap aus Cetylpalmitat. Doch zeigten die beiden Formulierungen bezüglich der Fähigkeit, DNA im Gel zu immobilisieren, nahezu gleiche Eigenschaften. Aufgrund dessen ist nicht anzunehmen, daß Dotap mit einem der Lipide stärker interagiert als mit dem anderen. Cp(2)Dotap zeigte ein Zetapotential von fast +45 mV, Co(2)Dotap dagegen nur von +39 mV. Doch ließ sich bei den anderen SLN, deren Zetapotential sich auch in etwa einem solchen Rahmen unterschied, kein Einfluß der Oberflächeladungsunterschiede auf die Transfektionseffizienz erkennen. Bei der Größenbestimmung der beiden DOTAP-SLN zeigte sich jedoch (siehe 2.1.2), daß die Formulierung Co(2)Dotap Partikelgrößen aufwies, die ab dem-LD50% Durchmesser im µm-Bereich lagen und sich bis zu 3 µm erstreckten. Die Formulierung Cp(2)Dotap dagegen zeigte nur Nanopartikel. Lag es an der Größe von Co(2)Dotap, daß diese Formulierung trotz des Gebrauchs von DOTAP nicht auch so hohe Transfektionsraten erzielte? In der Literatur ist beschrieben, daß Lipoplexe mit kleiner, homogener Größe in vitro weniger transfektionseffizient sind, als Lipoplexe mit sehr heterogener Partikelverteilung [Zabner et al. 1995].

Liegt das Größenoptimum für die TransoPlexe® im mittleren Nanometerbereich, ist eine breite Verteilung günstiger als eine enge, vermittelt DOTAP höhere Transfektionsraten als die anderen kationischen Lipide oder war gerade die Kombination von DOTAP mit Cetylpalmitat für die gesteigerte Effizienz von Cp(2)Dotap im Vergleich zu den anderen SLN verantwortlich?

Genau beantworten ließ sich das noch nicht, da keine Formulierung mit DOTAP getestet worden war, die wie die anderen im Bereich von 110-150 nm lag. Es stellte sich also die Frage, ob bei Formulierung Cp(2)Dotap das verwendete kationische Lipid DOTAP in Kombination mit dem Matrixlipid Cetylpalmitat oder die Partikelgröße im mittleren Nanometerbereich und die etwas breitere Verteilung den Vorteil gegenüber den anderen Formulierungen bewirkt hat.

Interessanterweise zeigte sich bei den oben beschriebenen Versuchen, daß die durch die Agarose-Gel-Elektrophorese ermittelten SLN-DNA-Bindungsverhältnisse nicht immer mit der Lage der transfektionsaktivsten SLN-DNA-Verhältnisse korrelierten und auch keine Korrelation zwischen guter Immobilisierungsfähigkeit und Transfektionseffizienz bestand.

### **4.2.3.3 Proteingehalt als Maß der Zytotoxizität**

Wie unter 2.1.16 beschrieben wurde im Anschluß an die Transfektion der Proteingehalt in jedem Well bestimmt. Dieser gilt als Maß für die Anzahl lebender Zellen. Zur Quantifizierung der Transfektionseffizienz wird die gemessene Lumineszenz (RLU) pro Well durch die Masse Protein im jeweiligen Well dividiert, was der Vergleichbarkeit von verschiedenen Versuchsansätzen und -protokollen dient.

Ebenso ist der Proteingehalt ein reziprokes Maß für die Toxizität der TransoPlexe®. Die beiden vorausgegangenen Toxizitätsbestimmungen zeigten die zytotoxischen Eigenschaften der kationischen SLN ohne DNA auf. Diese Proteinbestimmung dagegen quantifiziert die Toxizität der SLN-DNA-Komplexe. In der folgenden Abbildung 4.38 wird die prozentuale Viabilität der Zellen nach der Transfektion dargestellt.

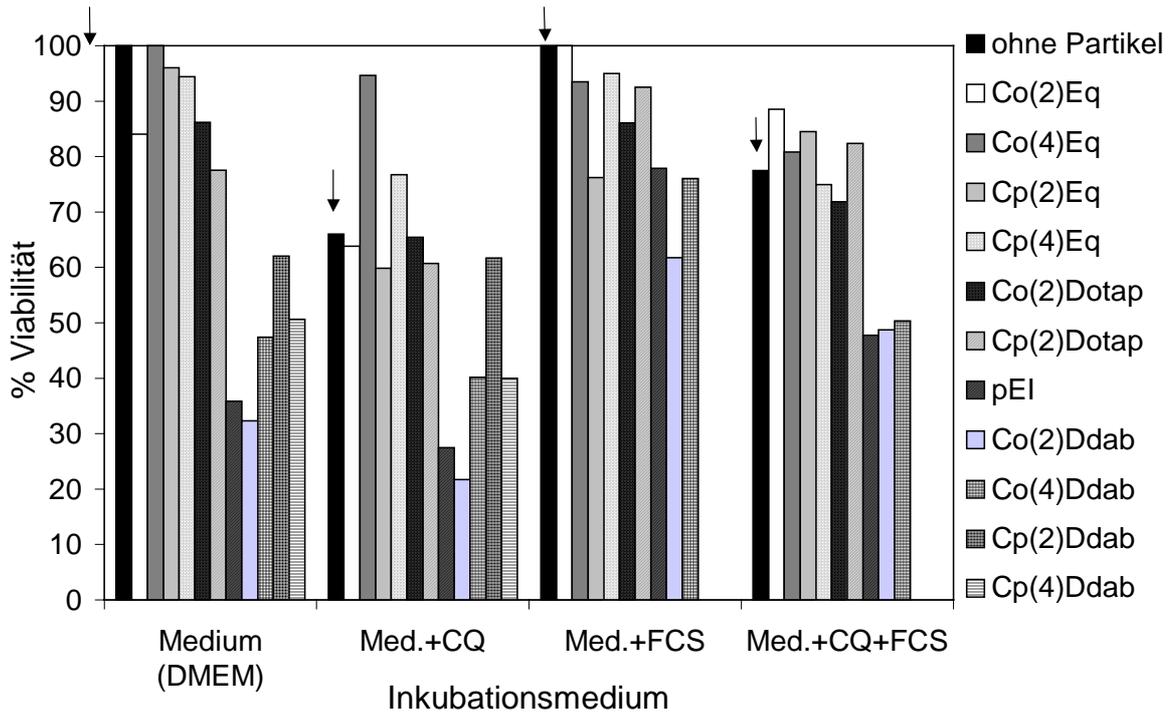


Abbildung 4.38: prozentuale Viabilität der Zellen nach der Transfektion. Die Viabilität wird in Abhängigkeit von der eingesetzten SLN-Formulierung (im jeweils transfektionsaktivsten SLN:DNA-Verhältnis) und vom verwendeten Inkubationsmedium (DMEM = Med., DMEM mit 100  $\mu$ M CQ = Med.+CQ, DMEM mit 10 % FCS = Med.+FCS oder DMEM mit CQ und FCS = Med.+CQ+FCS) abgebildet. Den Vergleichswert für die 100 %-ige Viabilität lieferten jeweils Zellen, die nur mit DMEM oder DMEM + 10 % FCS behandelt worden sind. Die mit den Pfeil markierten schwarzen Balken geben die Viabilität der Zellen wieder, die nur im entsprechenden Medium ohne Transfektionsagens („ohne Partikel“) kultiviert worden sind.

Zunächst einmal läßt sich feststellen, daß die Viabilität der Zellen durch den Zusatz von Chloroquin vermindert worden ist. Der Effekt trat sowohl bei serumfreien als auch bei serumhaltigen Medium auf. Allerdings war der Effekt bei FCS-haltigem Medium aber schwächer ausgeprägt.

Der Zusatz von 10 % FCS mindert nicht nur die Toxizität von CQ, sondern auch die von pEI und den TransoPlexen<sup>®</sup>. Wie schon unter 2.1.15 beschrieben sind vielfältige Interaktionen mit den Serumproteinen anzunehmen, die unter anderem zur teilweisen Ablösung der DNA, zur Neutralisation der Oberflächenladung und zur Verminderung der Aggregatbildung führen. Dies und auch die Tatsache, daß die Zellen durch den FCS-Zusatz einfach besser wachsen, verringert die Toxizität, doch gleichzeitig auch die Transfektionseffizienz.

Da, wie unter 2.1.15 schon beschrieben, die Toxizität bei der Bewertung der Transfektionseffizienz nicht mit gewertet wird, ist es wichtig, diese extra zu bestimmen. Durch die

Betrachtung der Viabilität bei den jeweils transfektionseffizientesten SLN:DNA-Verhältnissen der verschiedenen Partikel erhielt man einen direkten Vergleich.

Dabei zeigte sich, daß die DDAB enthaltenen Formulierungen in den relevanten Verhältnissen 2:1 bzw. 2,5:1 noch eine merkliche Toxizität zeigten. Die Formulierungen mit EQ1 dagegen zeigten in den transfektionsaktivsten kationischen Lipid:DNA-Massenverhältnissen fast keine Toxizität, wenn man von der des CQ absieht. Die mit DOTAP formulierten Partikel waren ebenfalls gut verträglich für die Zellen.

Die Metabolisierbarkeit der kationischen Lipide ist als ein die Toxizität beeinflussender Faktor beschrieben worden [Leventis und Silvius 1990, Behr 1994]. Interessanterweise sind bei DOTAP und EQ1 die aliphatischen Ketten über leicht metabolisierbare Esterbindungen mit der kationischen Kopfgruppe verbunden. Bei DDAB dagegen sind diese direkt mit dem quartären Stickstoff verbunden.

Bei pEI war die Viabilität der Zellen beim Massenverhältnis von 4:1 (entspricht 20 µg/ml) stark vermindert. Die Toxizität war beim effizientesten pEI:DNA-Verhältnis höher als die Toxizität der SLN-DNA Komplexe der Verbindungen mit EQ1 oder DOTAP. Durch das Zufügen von FCS wurde auch bei pEI die Toxizität gemindert, die Transfektionseffizienz aber gleichzeitig erheblich herabgesetzt.

### **4.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Die Herstellung der kationischen SLN mittels Hochdruckhomogenisation im 1,5 Liter Maßstab war einfach und lieferte lagerstabile Produkte mit einem Partikeldurchmesser von < 150 nm und PIs von < 0,25 (Compritol) oder < 0,19 (Cetylpalmitat). Bei der Vermessung mittels LD konnten keine Mikropartikel detektiert werden.

Die Herstellung am EmulsiFlex<sup>®</sup>-B3 im 3,5 ml Maßstab führte zwar auch zu Nanopartikeln, diese waren aber größer, breiter verteilt und weniger stabil. Die Formulierung Co(2)Dotap zeigte nur bis zum Durchmesser LD 50% Nanopartikel. Die aus Compritol hergestellten SLN, waren immer etwas größer und hatten einen größeren PI als die unter Zusatz der gleichen kationischen Lipide aus Cetylpalmitat formulierten SLN. Dies läßt sich mit dem höheren Schmelzpunkt des Compritols erklären [Siekmann und Westensen 1992, zur Mühlen 1996, Jahnke 1998]. Die Reduktion der Tween 80/Span 85 Menge von 4 auf

2 % führte in den meisten Fällen zu einem geringen, signifikanten Anstieg der Partikelgröße. Praktisch gesehen beeinflusste diese Größenzunahme die Stabilität aber nicht nachteilig.

Alle verwendeten kationischen Lipide waren quartäre Amine, die theoretisch eine pH-unempfindliche Ladung tragen. Die Bestimmung des Zetapotentials in Abhängigkeit vom pH-Wert zeigte, für die beispielhaft untersuchten Formulierungen Cp(2)Ddab und Cp(2)Dotap, erwartungsgemäß auch keine Abhängigkeit des Zetapotentials vom pH-Wert.

Das Zetapotential der verschiedenen Partikel differierte nicht stark voneinander. Es lag für alle Formulierungen etwa im Bereich von +34 bis +44 mV.

Mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese zeigte sich, daß alle Partikel in der Lage waren, das Plasmid pCMVbeta zu immobilisieren.

Die zur vollständigen Immobilisierung notwendigen Mengen kationischer SLN variierten von Formulierung zu Formulierung stark. Den größten Einfluß hatte die Art des verwendeten kationischen Lipids. Es war zu erkennen, daß die unter Verwendung von Benzalkoniumchlorid hergestellten SLN DNA nur in sehr hohen Anteilen (50-100-facher Überschuß an kationischem Lipid) binden konnten. Unter Verwendung von EQ1 gefertigte SLN banden dagegen schon im EQ1:DNA-Verhältnis von 0,5-1:1.

Der Einsatz von 2 oder 4 % Tween 80/Span 85 schien keinen Einfluß auf die DNA-Immobilisierung der Partikel zu haben. Das verwendete Fett zeigte nur bei den DDAB-, CPC- und BA-SLN einen Einfluß auf die DNA-Immobilisierung. Bei diesen drei Gruppen immobilisierten die aus Compritol hergestellten SLN die DNA in geringeren Überschüssen als die Cetylpalmitat-SLN. Eine Erklärungsmöglichkeit könnte eine vom Matrixlipid abhängige, unterschiedliche Ausrichtung des kationischen Lipids auf der SLN-Oberfläche sein, die im Falle des Cetylpalmitats die elektrostatischen Wechselwirkungen mit der DNA fördert und im Falle des Compritols eher behindert.

Interessanterweise zeigte sich bei den nachfolgenden Transfektionsversuchen, daß die durch die Agarose-Gel-Elektrophorese ermittelten SLN-DNA-Bindungsverhältnisse nicht immer mit der Lage der transfektionsaktivsten SLN-DNA-Verhältnisse korrelierten. Es bestand auch kein Zusammenhang zwischen guter Immobilisierungsfähigkeit und guter Transfektionseffizienz.

Für SLN, deren Matrix aus Wachsen, Tri- oder Partialglyceriden besteht und die mit sterischen oder negativ geladenen Tensiden stabilisiert worden sind, ist in den zur Transfektion notwendigen, geringen Konzentrationen bisher kein merklicher zytotoxischer Effekt beschrieben worden [Schöler et al. 2001a]. Durch den Einsatz von kationischen Tensiden, wie zum Beispiel CPC oder DDAB, kann die Verträglichkeit im Vergleich zu ungeladenen oder anionischen SLN verringert sein [Schöler et al. 2001a, Schöler et al. 2001b, Tabatt et al. 2002]. Auch liposomale Zubereitungen zur Transfektion zeigen in Abhängigkeit vom eingesetzten kationischen Lipid und der Konzentration mitunter erhebliche Toxizitäten [Leventis und Silvius 1990, Filion und Philips 1998]. Vor diesem Hintergrund war die Bestimmung der Zytotoxizität unerlässlich.

Sowohl der LDH-Test als auch der WST-Test zeigte, daß sich die verschiedenen Formulierungen bezüglich des Parameters Toxizität grob in zwei Gruppen einteilen ließen. Die wenig toxischen SLN waren die Verbindungen mit den kationischen Lipiden EQ1, DDAB und DOTAP. Bei diesen drei Lipiden handelte es sich jeweils um Verbindungen mit zwei aliphatischen Ketten (zweikettige Lipide). SLN mit CTAB und besonders CPC waren wesentlich toxischer. Beide Lipide haben nur eine aliphatische Kette (einkettige Lipide). Noch stärker toxisch war pEI. Über diese erhöhte Zytotoxizität von einkettigen kationischen Lipiden gegenüber zweikettigen wurde auch bei Untersuchungen an kationischen Liposomen berichtet [Pinnaduwa et al. 1989]. Die Toxizität der SLN wird also durch die Wahl des kationischen Lipids bestimmt. Um eine Minderung der Toxizität zu erreichen, sind zweikettige kationische Lipide den einkettigen vorzuziehen.

Beim Vergleich der zur vollständigen DNA-Immobilisierung notwendigen SLN-Mengen mit den im LDH- und WST-Test ermittelten LD50-Werten, zeigte es sich, daß die CPC- und die CTAB-SLN zu toxisch waren, um zur Transfektion eingesetzt zu werden. Die DOTAP-, EQ1- und DDAB-SLN zeigten erst merkliche Toxizität in Konzentrationen, die um ein Vielfaches größer waren, als die zur Transfektion benötigten.

Die Transfektionseffizienz wurde für die SLN-Formulierungen mit DDAB, EQ1 und DOTAP ermittelt. Co(2)Ddab, Co(4)Ddab, Co(2)Eq, Co(4)Eq, Cp(2)Ddab, Cp(4)Ddab, Cp(2)Eq, Cp(4)Eq und Co(2)Dotap steigerten die Effizienz im Vergleich zu freiem Plasmid um etwa das Zehnfache. Unter Zusatz von CQ betrug diese Steigerung sogar zwei Zehnerpotenzen. Die Formulierung Cp(2)Dotap hob sich von den anderen deutlich ab. Sie erhöhte die Transfektionsaktivität im Vergleich zu freiem Plasmid um das 100-fache, in

Anwesenheit von CQ sogar um das 1000-fache. Die Effizienz war im Vergleich zu freier DNA erheblich gesteigert. Beim Vergleich mit pEI zeigten die Formulierungen Co(2)Ddab, Co(4)Ddab, Co(2)Eq, Co(4)Eq, Cp(2)Ddab, Cp(4)Ddab, Cp(2)Eq, Cp(4)Eq und Co(2)Dotap etwa 10 % von dessen Aktivität. Cp(2)Dotap brachte es sogar auf 50 % der Aktivität von pEI. Für den ersten Optimierungszyklus waren das sehr vielversprechende Ergebnisse.

Besonders in Medium mit CQ war die beta-Galaktosidaseexpression hoch. Die Formulierung Cp(2)Dotap erreichte unter diesen Bedingungen sogar die Hälfte der Effizienz von pEI.

Der Zusatz von CQ erhöhte bei allen SLN die Transfektionseffizienz erheblich. CQ selber vermittelte allerdings eine gewisse Zytotoxizität. Die Transfektionssteigerung durch CQ gibt Hinweise auf den möglichen Eintrittsmechanismus der TransoPlexe<sup>®</sup> in die Zelle. Erfolgt die Aufnahme nämlich durch Endozytose, so gelangen die Komplexe zunächst ins Endosom. Bei dem als „endo-/lysosomal pathway“ bezeichneten Mechanismus fusionieren die Endosomen anschließend mit den Lysosomen [Bally et al. 1999]. Diese enthalten viele hydrolytische Enzyme, welche ihr pH-Optimum im Säuren haben. Diese Enzyme führen zu einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Inaktivierung der zu transfezierenden DNA. CQ soll den lysosomalen pH-Wert anheben, was den enzymatischen Abbau der eingeschleusten DNA hemmt, da die Anhebung des pH-Wertes inhibierend auf die lysosomalen Enzyme wirkt [Luthman und Magusson 1983, Ciftci und Levy 2001]. Die Steigerung der Transfektionseffizienz durch CQ ist also ein Hinweis darauf, daß sich die Komplexe vor dem Eintritt ins Zytoplasma in den Endosomen befinden und höchstwahrscheinlich über Endozytose in die Zelle gelangt sind [Zabner et al. 1995]. Zabner konnte durch Versuche an Cos-1 Zellen beweisen, daß Lipoplexe von diesen Zellen höchstwahrscheinlich über Endozytose aufgenommen werden. Auch für die meisten Polyplexe wird die Endozytose als Haupteintrittsmechanismus angesehen [Wagner et al. 1992, Plank et al. 1998].

Die Transfektionseffizienz wurde durch die Zugabe von 10 % Serum zum Medium verringert, war aber immer noch signifikant höher als bei Plasmid ohne Transfektionsagens. Das Ausmaß dieser Aktivitätsabnahme durch Serum war allerdings unterschiedlich stark ausgeprägt. Bei DOTAP-SLN kam es nur zu einer Reduktion der Aktivität auf die Hälfte, bei EQ1 auf etwa ein Drittel bis ein Viertel und bei DDAB-SLN war die Effizienzverminderung noch stärker ausgeprägt. Die Inaktivierung durch Serum tritt auch bei kationischen

Liposomen auf [Felgner et al. 1987, Yang und Huang 1997]. Bei diesen Systemen soll der Aktivitätsrückgang auf elektrostatischen Wechselwirkungen mit anionischen Serumproteinen beruhen [Li und Huang 2000].

Es stellte sich also die Frage nach dem Grund für die so viel höhere Transfektionsaktivität der Formulierung Cp(2)Dotap gegenüber den anderen SLN. Liegt das Größenoptimum für die TransoPlexe<sup>®</sup> im mittleren Nanometerbereich, ist eine breite Verteilung günstiger als eine enge, vermittelt DOTAP höhere Transfektionsraten als die anderen kationischen Lipide oder war gerade die Kombination von DOTAP mit Cetylpalmitat für die gesteigerte Effizienz von Cp(2)Dotap im Vergleich zu den anderen SLN verantwortlich? Genau beantworten ließ sich diese Fragen noch nicht, denn es war noch keine Formulierung mit DOTAP getestet worden, die wie die anderen Partikelgrößen im Bereich von 110-150 nm zeigte. Die Frage blieb also, ob bei Formulierung Cp(2)Dotap das verwendete kationische Lipid DOTAP in Kombination mit dem Matrixlipid Cetylpalmitat oder die Partikelgröße im mittleren Nanometerbereich und die etwas breitere Verteilung den Vorteil gegenüber den anderen Formulierungen bewirkt hat.

Durch Auswertung des Proteingehaltes nach der Transfektion wurde die Zytotoxizität der TransoPlexe<sup>®</sup> beurteilt. Beim Vergleich der Toxizitäten der verschiedenen Komplexe in ihrem jeweils transfektionseffizientesten Verhältnis, zeigte sich, daß die mit DDAB hergestellten noch eine gewisse Toxizität zeigten. Die mit EQ1 oder DOTAP formulierten dagegen waren, abgesehen von der CQ-eigenen Toxizität, sehr gut verträglich. Diese Formulierungen waren auch besser verträglich als pEI, welches ebenfalls noch eine deutliche Toxizität zeigte.

## 4.3 Formulierungsentwicklung und –optimierung II

### 4.3.1 Formulierungsentwicklung

Basierend auf den Ergebnissen der vorhergegangenen Experimente sollte die Formulierung optimiert werden. Die Ziele der Formulierungsoptimierung waren:

- Übertragung der hohen Effizienz der Formulierung Cp(2)Dotap auf alle Formulierungen
- Erleichterung des endosomalen Austritts mit dem Ziel des Verzichtes auf das zytotoxische CQ
- Steigerung der Serumstabilität
- Ermittlung des günstigsten Massenverhältnisses von kationischen Lipid zu Matrixlipid
- Untersuchung zum Einfluß des zur Herstellung verwendeten Homogenisators und des Matrixlipids auf die Transfektionseffizienz

Die möglichen Faktoren, die für die Effizienzsteigerung von Formulierung Cp(2)Dotap gegenüber den anderen kationischen SLN verantwortlich sind, wurden bereits unter 4.2.3.2 diskutiert. Hauptsächlich in zwei Punkten unterschied sich die Formulierung Cp(2)Dotap von den anderen. Zum einen wurde als kationisches Lipid DOTAP gewählt, zum anderen war die Partikelgröße der SLN eher im mittleren Nanometerbereich angesiedelt und etwas breiter verteilt als bei den Formulierungen 1 bis 20. Allein die Verwendung von DOTAP konnte nicht der Grund für die höhere Effizienz sein, denn die Formulierung Co(2)Dotap enthielt auch DOTAP, zeigte aber nur eine mit den anderen vergleichbare Aktivität. Co(2)Dotap und Cp(2)Dotap unterschieden sich durch die Art des Matrixlipids und die Partikelgröße, die bei Co(2)Dotap aufgrund des verwendeten Compritols noch größer als bei Cp(2)Dotap war (siehe 4.2.2.1) und in den  $\mu\text{m}$ -Bereich hineinging. Das Zetapotential war für Co(2)Dotap geringer (+39,0 mV) als für Cp(2)Dotap (+44,8 mV). Allerdings zeigten beide bezüglich der DNA-Immobilisierung im Gel keinen Unterschied. Ist es also die etwas größere und etwas breiter verteilte Partikelgröße von Cp(2)Dotap kombiniert mit dem kationischen Lipid DOTAP, welches den Vorteil brachte? Läßt sich die geringere Effizienz von Co(2)Dotap durch die zu große (d. h. im  $\mu\text{m}$ -Bereich liegende) Partikelgröße erklären?

Genau konnte das noch nicht beantwortet werden, da bis dahin noch keine SLN mit DOTAP hergestellt worden sind, die Partikelgrößen wie die anderen 20 Formulierungen zeigten. In der Literatur sind Lipoplexe mit Partikelgrößen im Bereich von 50 nm bis  $> 1 \mu\text{m}$  beschrieben [Labatmoleur et al. 1996, Ross und Hui 1999, Brown et al. 2001]. Die Aussagen über die Abhängigkeit des in-vitro-Transfektionserfolgs von der Komplexgröße sind widersprüchlich. Die meisten Arbeitsgruppen konstatieren aber, daß die Lipoplexe für die in-vitro-Transfektion möglichst mittelgroß bis groß sein sollten [Kawaura et al. 1998, Ross und Hui 1999, Yang und Huang 1997]. Ross beschreibt sogar, daß die Transfektionseffizienz mit steigender Partikelgröße bis zu  $2,2 \mu\text{m}$  hin zunimmt, da größere Komplexe schneller auf adhesiv wachsende Zellen absinken und so die Häufigkeit der Interaktionen mit der Zellmembran zunimmt. Andere präferieren möglichst kleine [Akao 1991] und wieder andere Liposomen mittlerer Größe [Zhang 1997]. Daß die Größe ein sehr entscheidender Faktor für den Erfolg der in-vitro-Transfektion ist, ist unbestritten, doch scheint die jeweils effektivste Größe stark von der Zelllinie, der Zusammensetzung des Vektors und weiteren Faktoren abzuhängen.

### 4.3.2 Herstellung

Die unter 4.3.1 angestellten Überlegungen führten zu der Entscheidung, im nächsten Experiment SLN herzustellen, deren mittlerer Durchmesser  $> 150 \text{ nm}$  und  $< 300 \text{ nm}$  war. Partikel  $> 1 \mu\text{m}$  sollten nicht vorkommen. Da die effektivste Formulierung der letzten Reihe am EmulsiFlex<sup>®</sup>-B3 hergestellt wurde, bot es sich an, dies für die nächsten Formulierungen beizubehalten, um nicht zu viele Faktoren zu variieren. Des weiteren wurde, um den Einfluß des zur Herstellung verwendeten Homogenisators abschätzen zu können, eine SLN-Zubereitung sowohl am EmulsiFlex<sup>®</sup>-B3 (Formulierung S0,5) als auch am Micron LAB 40 (Formulierung Lab40 Cp0,5) hergestellt. Eine Übersicht über die Herstellungsmethoden der verschiedenen SLN-Formulierungen bietet Tabelle 4.6.

Tabelle 4.6: Übersicht über die Herstellungsmethoden der verschiedenen SLN-Formulierungen. Die Zusammensetzung der Zubereitungen ist in Tabelle 4.7 dargestellt.

Formulierung	Homogenisator	Druck	Zyklenzahl	Temperatur
S0,5	EmulsiFlex <sup>®</sup> -B3	480 bar	4	80-85°C
S1 (=Cp(2)Dotap)	EmulsiFlex <sup>®</sup> -B3	480 bar	4	80-85°C
S2	EmulsiFlex <sup>®</sup> -B3	480 bar	4	80-85°C
S1:1	EmulsiFlex <sup>®</sup> -B3	480 bar	4	80-85°C
S1:0,5	EmulsiFlex <sup>®</sup> -B3	480 bar	4	80-85°C
S1:0,25	EmulsiFlex <sup>®</sup> -B3	480 bar	4	80-85°C
Lab40 Cp0,5	Micron LAB 40	500 bar	3	80-85°C
Lab40 Co0,5	Micron LAB 40	800 bar	3	80-85°C

#### 4.3.2.1 Matrixlipid

Als Matrixlipid wurde Cetylpalmitat gewählt (Tabelle 4.7), da bei den beiden vorherigen SLN-Formulierungen mit DOTAP die aus Cetylpalmitat effizienter war, als die aus Compritol. Es stellte sich die Frage, ob das der Matrix selber zu zuschreiben war, oder auf der größeren Teilchengröße beruhte, die Compritol-SLN bei der Herstellung am EmulsiFlex<sup>®</sup>-B3 zeigten. Um dies zu beantworten, wurde eine SLN-Formulierung (Lab40 Co0,5) mit dem Matrixlipid Compritol am Micron LAB 40-Homogenisator hergestellt. Mit diesem Verfahren war es möglich, Compritol-SLN mit ähnlichen Partikelgrößen, wie sie die am EmulsiFlex<sup>®</sup>-B3 hergestellten Cetylpalmitat-SLN zeigten, zu erhalten.

### 4.3.2.2 Tensid

Ein negativer Einfluß der Reduktion der Tween/Span-Menge von 4 auf 2 % auf die Stabilität, das Zetapotential, die Toxizität oder die Transfektionsaktivität konnte nicht gefunden werden. Die beiden ungeladenen Tenside schienen sowohl in 4 als auch in 2 %-iger Konzentration in ausreichenden Mengen vorhanden zu sein, um die Partikel zu stabilisieren. Des weiteren schien die 4 %-ige Tween/Span Konzentration im Vergleich zur 2 %-igen die Einlagerung des kationischen Tensides in die Partikelgrenzfläche nicht zu behindern, denn es ließ sich weder ein Effekt auf die Oberflächenladung noch auf die DNA-Bindung beobachten. Deshalb wurde im folgenden Versuch die Tween/Span-Menge auf 2 % reduziert (Tabelle 4.7).

### 4.3.2.3 Kationisches Lipid

Wie sich in den vorherigen Versuchen gezeigt hat, waren zweikettige kationische Lipide weniger toxisch und vermittelten eine effizientere Transfektion als einkettige. DDAB erwies sich noch als geringfügig toxischer als EQ1 und DOTAP. DOTAP zeigte von diesen drei kationischen Lipiden die höchste Transfektionsaktivität. Deshalb wurde für die neuen Formulierungen DOTAP als kationisches Lipid gewählt (Tabelle 4.7). Die Menge DOTAP wurde bei gleichbleibendem Gehalt des Matrixlipids variiert, um das in Hinblick auf Transfektionseffizienz und Zytotoxizität optimale Verhältnis zu ermitteln.

### 4.3.2.4 Lysosomotrophes Agens

Wie sich im vorherigen Experiment gezeigt hat, ließ sich die Effizienz der TransoPlexe<sup>®</sup> durch den Zusatz von CQ noch steigern. CQ selber besitzt aber eine eigene Toxizität. Wünschenswert wäre es, eine Möglichkeit zu finden, um auf CQ verzichten zu können. In einigen liposomalen Formulierungen dient das zwitterionische Lipid DOPE [Gao und Huang 1991, Felgner et al. 1994] der Erleichterung des „endosomalen Austritts“ und wirkt auf diese Weise, wie auch CQ, dem lysosomalen Abbau der TransoPlexe<sup>®</sup> in den Lysosomen entgegen [Fasbender et al. 1997]. DOPE soll den Lipoplexen (Komplexe aus Liposomen und DNA) helfen aus den Endosomen in das Zytosol zu gelangen, indem es die Fusion mit der Endosomenmembran einleitet [Zhou und Huang 1994, Farhood et al. 1995]. Eine Steigerung der Transfektionseffizienz durch die Einarbeitung von DOPE in eine kationische Emulsion wurde ebenfalls berichtet [Kim et al. 2001]. In drei der neuen Formulierungen

rungen wurde zu diesem Zweck neben DOTAP ein Anteil DOPE eingearbeitet (Tabelle 4.7). Hinsichtlich der DOPE Menge wurde sich dabei an Liposomen [Felgner et al. 1994] und katioischen Emulsionen [Kim et al. 2001] orientiert und DOTAP:DOPE-Verhältnisse zwischen 1:1 und 1:0,25 gewählt.

Tabelle 4.7: Zusammensetzung der neuen Formulierungen (Die Prozentangaben beziehen sich auf Massenprozent (m/m).) Alle Zubereitungen enthalten zur Stabilisierung 2 % einer 7:3 Mischung aus Tween 80 und Span 85.

Formulierung	Matrixlipid	Kationisches Lipid
S0,5	Cetylpalmitat 4 %	DOTAP 0,5 %
S1	Cetylpalmitat 4 %	DOTAP 1 %
S2	Cetylpalmitat 4 %	DOTAP 2 %
S1:1	Cetylpalmitat 4 %	DOTAP 1 %, DOPE 1 %
S1:0,5	Cetylpalmitat 4 %	DOTAP 1 %, DOPE 0,5 %
S1:0,25	Cetylpalmitat 4 %	DOTAP 1 %, DOPE 0,25 %
Lab40 Cp0,5	Cetylpalmitat 4 %	DOTAP 0,5 %
Lab40 Co0,5	Compritol 4 %	DOTAP 0,5 %

#### 4.3.2.5 Lagerung

Die Lagerung der SLN erfolgte in dampfsterilisierten, lichtundurchlässigen Eppendorffgefäßen aus Polyethylen bei 4-8°C. Die Kühlung wurde wegen der möglichen Oxidationsempfindlichkeit der Ölsäuregruppen im DOTAP-Molekül gewählt.

### 4.3.3 Physikalische Charakterisierung

#### 4.3.3.1 Partikelgrößenbestimmung

##### 4.3.3.1.1 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

In der folgenden Abbildung 4.39 sind die Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung mit Hilfe der Photonenkorrelationsspektroskopie dargestellt.

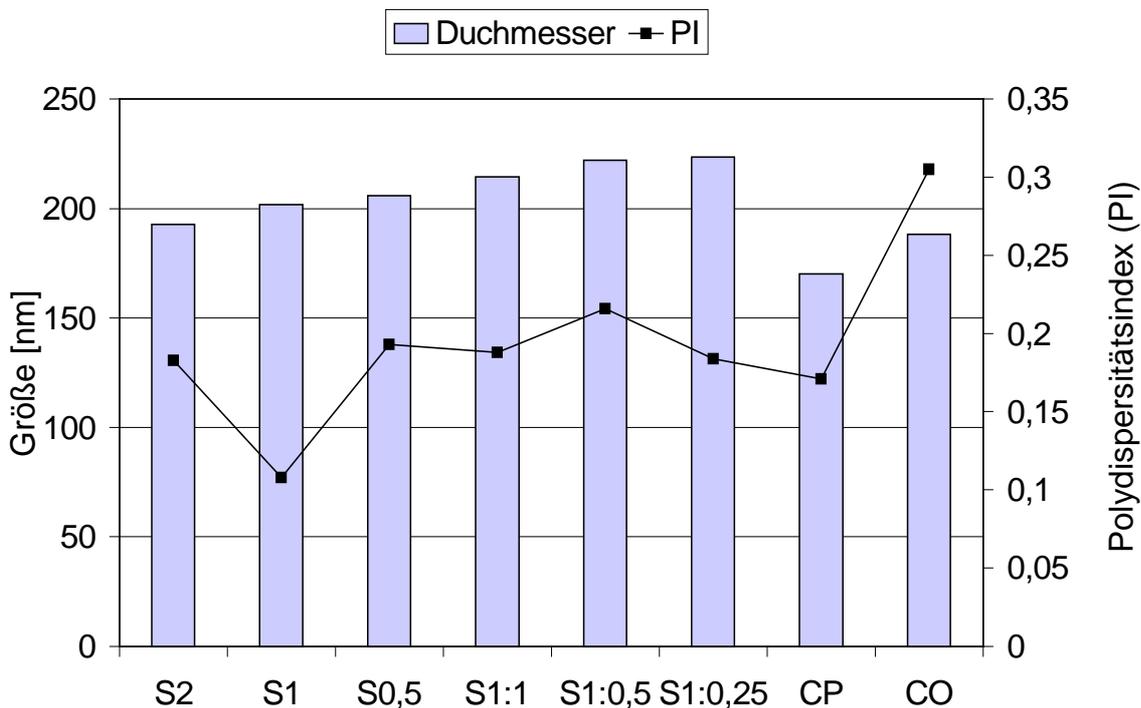


Abbildung 4.39: Partikelgrößenbestimmung mittels PCS am Tag 1 nach der Herstellung. Die Formulierungen Lab40 Cp0,5 und Lab40 Co0,5 werden hier abgekürzt als „CP“ und „CO“ bezeichnet.

Man sieht, daß die nur DOTAP enthaltenen und am EmulsiFlex<sup>®</sup>-B3 hergestellten SLN (S0,5, S1 und S2) alle drei einen mittleren PCS-Durchmesser zeigten, der um 200 nm lag. Die Polydispersitätsindizes waren alle < 0,200, was relativ enge Verteilungen charakterisiert. Das Hinzufügen von DOPE zur Rezeptur schien dazu zu führen, daß die Partikelgrößen etwas zunahmen (214-223 nm). Daß DOPE kein guter Emulgator ist, und deshalb zu einer Zunahme der Partikelgröße führen kann, wurde auch schon in Zusammenhang mit kationischen Emulsionen berichtet [Kim et al. 2001].

Die SLN mit der Compritol-Matrix zeigten bei der Herstellung am Micron LAB 40 einen etwas kleineren mittleren Durchmesser aber eine deutlich breitere Verteilung als die aus Cetylpalmitat hergestellten.

Die Formulierung Lab40 Cp0,5 wies im Vergleich zur gleich zusammengesetzten Zubereitung S0,5 einen etwa 25 nm kleineren Partikeldurchmesser und einen etwa vergleichbaren PI auf. Sie könnte also dazu dienen, den Einfluß der Herstellungsmethode auf die Transfektionseffizienz zu untersuchen. Zur Untersuchung der Lagerungsstabilität wurden die Formulierungen am Tag 1, 47, 100 und 150 mit Hilfe der Photonenkorrelationsspektroskopie vermessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.40 und Abbildung 4.41 dargestellt.

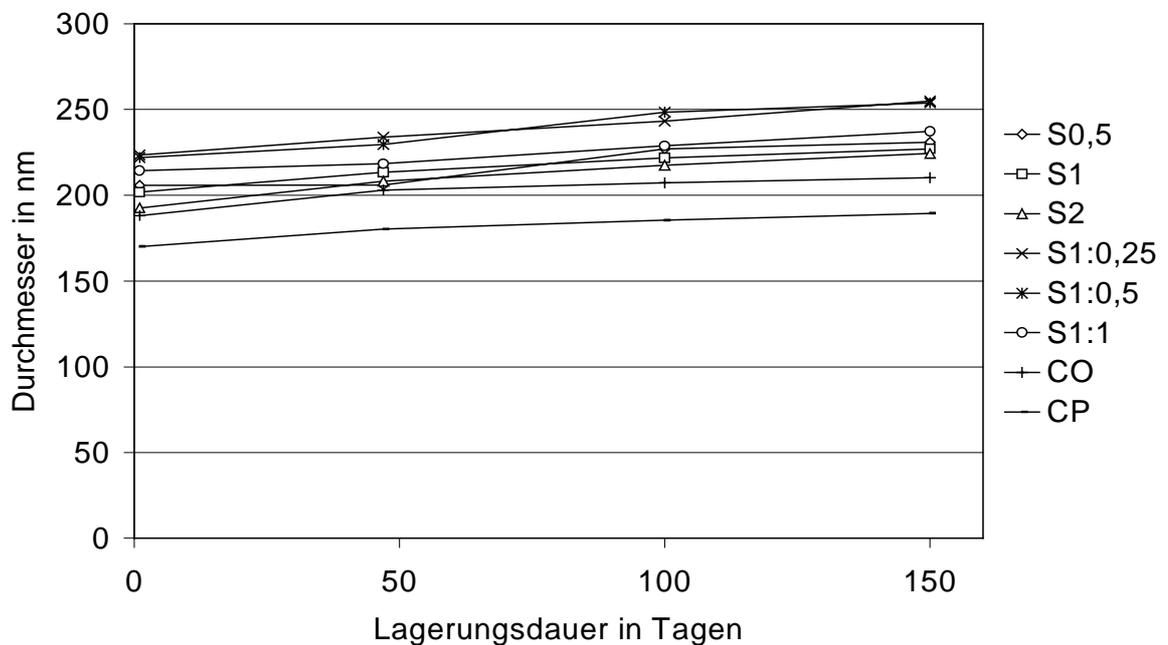


Abbildung 4.40: PCS-Durchmesser der acht Formulierungen in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer. Die Formulierungen Lab40 Cp0,5 und Lab40 Co0,5 werden hier abgekürzt als „CP“ und „CO“ bezeichnet.

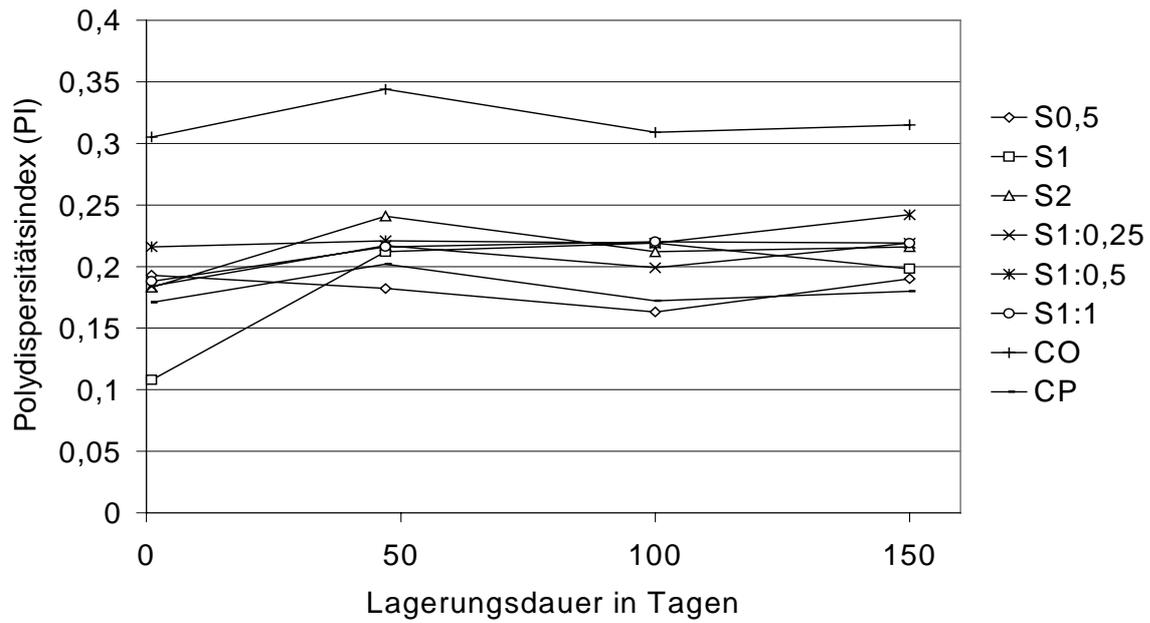


Abbildung 4.41: Polydispersitätsindizes der acht Formulierungen in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer. Die Formulierungen Lab40 Cp0,5 und Lab40 Co0,5 werden hier abgekürzt als „CP“ und „CO“ bezeichnet.

Wie man sieht, kam es bei allen Zubereitungen zu einer vernachlässigbaren Zunahme der Partikelgröße.

**4.3.3.1.2 Laserdiffraktometrie (LD)**

Die SLN-Formulierungen wurden mittels Laserdiffraktometrie untersucht. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle 4.8: Durch Laserdiffraktometrie ermittelte Partikelgrößen der verschiedenen Formulierungen am Tag 100 nach der Herstellung. LD 90 % [ $\mu\text{m}$ ] bedeutet z. B., daß 90 % des Partikelvolumens aus Teilchen mit Größen  $\leq$  des angegebenen Wertes besteht.

	S0,5	S1	S2
LD 10 % [ $\mu\text{m}$ ]	0,062	0,06	0,061
LD 50 % [ $\mu\text{m}$ ]	0,113	0,107	0,107
LD 90 % [ $\mu\text{m}$ ]	0,307	0,306	0,294
LD 95 % [ $\mu\text{m}$ ]	0,367	0,371	0,361
LD 99 % [ $\mu\text{m}$ ]	0,476	0,476	0,484
LD 100 % [ $\mu\text{m}$ ]	0,791	0,869	0,953

	S1:0,25	S1:0,5	S1:1
LD 10 % [ $\mu\text{m}$ ]	0,065	0,06	0,063
LD 50 % [ $\mu\text{m}$ ]	0,173	0,102	0,117
LD 90 % [ $\mu\text{m}$ ]	0,391	0,297	0,327
LD 95 % [ $\mu\text{m}$ ]	0,443	0,356	0,38
LD 99 % [ $\mu\text{m}$ ]	0,535	0,451	0,474
LD 100 % [ $\mu\text{m}$ ]	0,869	0,721	0,869

	Lab40 Co0,5	Lab40 Cp0,5
LD 10 % [μm]	0,069	0,062
LD 50 % [μm]	0,12	0,062
LD 90 % [μm]	0,317	0,105
LD 95 % [μm]	0,4	0,119
LD 99 % [μm]	0,537	0,242
LD 100 % [μm]	1,047	0,324

In keiner der untersuchten Zubereitungen konnte eine mikropartikuläre Fraktion gefunden werden. Es handelte sich um reine Nanopartikel.

### 4.3.3.2 Zetapotential

Die Zetapotentialbestimmung erfolgte wie unter 2.1.4 beschrieben. Die Ergebnisse sind in folgender Abbildung 4.42 dargestellt.

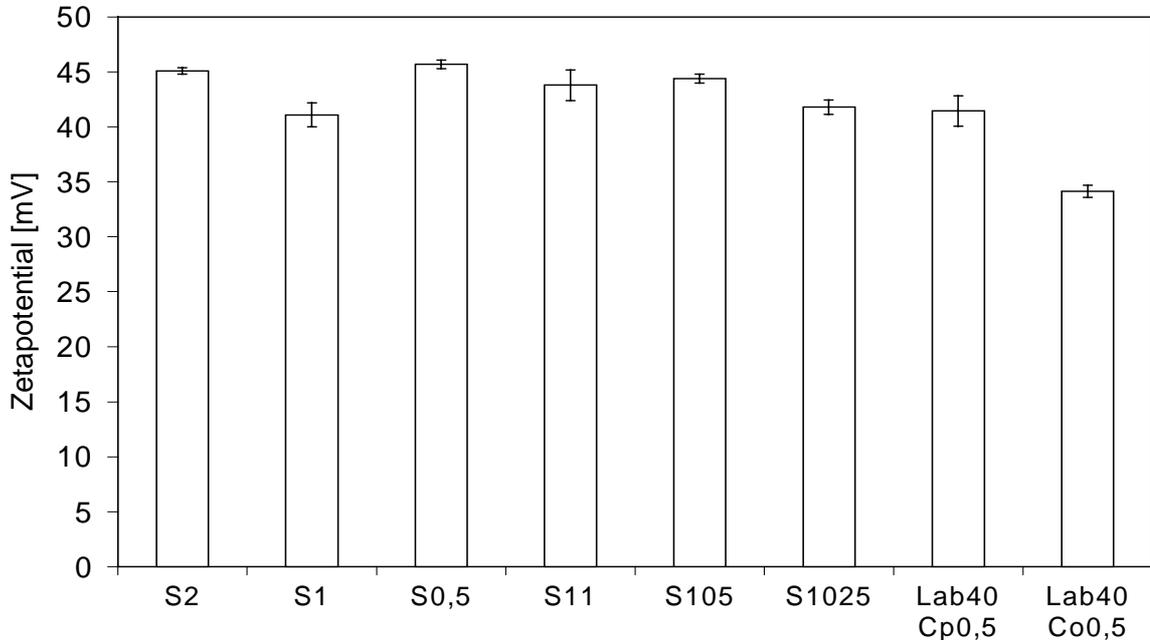


Abbildung 4.42: Zetapotentialbestimmung der neuen SLN-Formulierungen. Die Bestimmung erfolgte in Leitfähigkeitswasser bei pH 7,4.

Man erkennt, daß das Zetapotential aller mit Cetylpalmitat formulierten SLN im Bereich von +40 bis +45 mV lag. Ein Effekt der Variation der DOTAP-Menge von 0,5 über 1 auf 2 % war nicht zu erkennen. Ebenso schien die Zugabe von DOPE das Zetapotential nicht zu beeinflussen. Nur die aus Compritol formulierten SLN zeigten ein etwas geringeres Zetapotential. Das gleiche konnte auch schon bei den vorausgegangenen SLN-Formulierungen beobachtet werden (4.2.2.2). Auch hier zeigten die SLN aus DOTAP und Compritol ein etwas geringeres Zetapotential als die aus DOTAP und Cetylpalmitat. Anscheinend hat DOTAP eine höhere Affinität zu Cetylpalmitat als zu Compritol. Daß alle SLN aus Cetylpalmitat trotz unterschiedlicher Mengen DOTAP das selbe Zetapotential zeigten, könnte damit erklärt werden, daß DOTAP im Überschuß vorhanden war und die Oberflächen aller Formulierungen auch mit einem DOTAP-Gehalt von 0,5 % schon gesättigt waren.

### 4.3.3.3 Agarose-Gel-Elektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese sollte der Überschuss an SLN, der notwendig ist, um eine bestimmte Menge des Plasmids pCMVbeta vollständig zu immobilisieren, ermittelt werden. Die Versuche wurden wie unter 2.1.12 beschrieben durchgeführt und mit Hilfe eines Transluminators und der entsprechenden Software quantitativ ausgewertet (Abbildung 4.43).

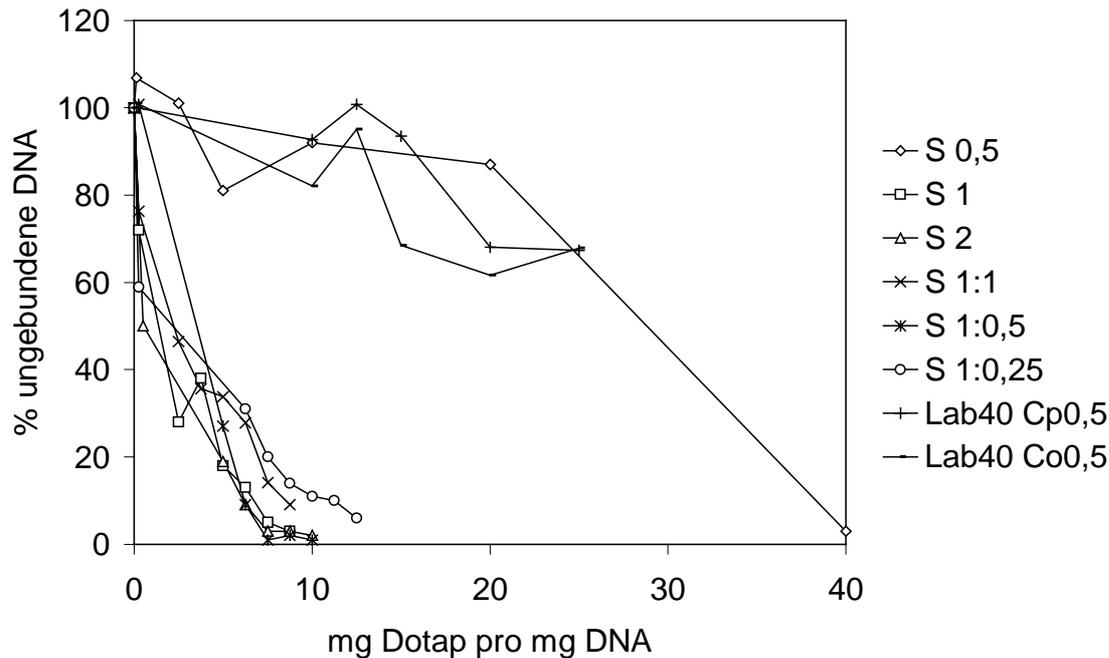


Abbildung 4.43: Vermögen der verschiedenen SLN, pCMVbeta im Gel zu immobilisieren. Auf der x-Achse ist das Massenverhältnis von DOTAP zu DNA angegeben, auf der y-Achse der prozentuale Anteil mobiler DNA. Man erkennt hier, wie hoch der Überschuss an DOTAP sein muß, um die DNA vollständig zu immobilisieren. Dabei ist zu beachten, daß die verschiedenen SLN-Formulierungen unterschiedliche Anteile DOTAP enthalten. Es muß entsprechend umgerechnet werden.

Alle vier Formulierungen mit einem DOTAP-Gehalt von 1 % und 2 % (S1, S2, S1:1, S1:0,5, S1:0,25) zeigten das gleiche DNA-Immobilisierungsverhalten. Schon ab einem DOTAP:DNA-Verhältnis von etwa 7,5:1 wurde die DNA vollständig gebunden. Die drei Formulierungen, die nur 0,5 % DOTAP enthielten, vermochten die DNA erst in viel höherem Überschuss (40:1 bezogen auf mg DOTAP:mg DNA) zu immobilisieren.

Was war der Grund für dieses unterschiedliche Bindungsverhalten?

Die nötige DOTAP-Menge zur vollständigen Immobilisierung der DNA durch 1 %-ige und 2 %-ige SLN war gleich. Man benötigte nur mehr von den 1 %-igen Partikeln als von den

2 %-igen. Warum funktionierte diese Umrechnung auf den DOTAP-Gehalt bei den 0,5 %-igen nicht mehr?

Das Zetapotential zeigte keine Unterschiede zwischen den Partikeln.

Lag DOTAP im so hohen Überschuß vor, daß die Partikeloberfläche von allen SLN gleichermaßen gesättigt war, und sich der Rest als Mizellen oder Liposomen formierte? Eine Erklärung wäre, daß ab einer 0,5 % Konzentration nur die Oberfläche gesättigt ist, doch kaum DOTAP mehr gelöst vorkommt? Bei den 1 und 2 %-igen treten neben den maximal besetzten SLN auch noch Liposomen und Mizellen auf. Diese Begründung würde auch das gleichbleibende Zetapotential aller Partikel erklären.

Tragen die sich bei den 2 und 1 %-igen DOTAP-Formulierungen gebildeten Mizellen und Liposomen dazu bei, daß die DNA stärker immobilisiert wird, als bei kationischen SLN allein? Doch warum gibt es keinen Unterschied zwischen den 1 und 2 % SLN, wenn bei den 2 % der freie DOTAP-Anteil doch höher sein müßte als bei den 1 %? So einfach läßt sich das sicherlich nicht erklären, da wahrscheinlich auch bei DOTAP-Konzentrationen, die die Oberfläche der SLN noch nicht maximal besetzen, schon ein gewisses Gleichgewicht von in die SLN-Grenzfläche angelagertem kationischen Lipid und mizellar oder liposomal gelöstem vorliegt.

Aufschluß darüber, ob sich in den SLN-Formulierungen auch nicht in die Grenzfläche angelagertes DOTAP befindet, könnte die AFM geben, bei der man evtl. vorhandene Mizellen oder Liposomen erkennen müßte.

### 4.3.4 Zellbiologische Charakterisierung

#### 4.3.4.1 In-vitro-Transfektion

Die Transfektion wurde wie unter 2.1.15 beschrieben durchgeführt. Durch die Gel-Elektrophoresen wurde für alle SLN-Formulierungen mit 1 % und 2 % DOTAP festgestellt, daß ein DOTAP:DNA-Verhältnis von 5-7,5:1 ausreicht, um die DNA vollständig zu immobilisieren. Für die SLN-Formulierungen mit 0,5 % DOTAP erschien mir die zur vollständigen Immobilisierung notwendige Menge so unwahrscheinlich hoch, daß ich beschloß, sie auch einfach im selben Verhältnis wie die anderen SLN zu testen. Unterstützt wurde diese Entscheidung dadurch, daß bei den SLN der ersten Reihe, diejenigen mit DOTAP auch ein relativ schlechtes DNA-Bindungsverhalten gezeigt haben. Im Transfektionsversuch lag das Aktivitätsmaximum der DOTAP-SLN aber bei wesentlich geringeren DOTAP-DNA-Verhältnissen, als zur DNA-Bindung nötig gewesen sind.

Für jede SLN-Formulierung wurden die DOTAP:DNA-Verhältnisse (m/m) von 10:1, 7,5:1, 5:1, 2,5:1 und 1,25:1 getestet. Jeder SLN-DNA-Komplex wurde in den nachfolgenden vier Medien (Tabelle 4.9) mit den Zellen inkubiert.

Tabelle 4.9: Zellkulturmedien, in denen die Zellen mit den SLN-DNA-Komplexen inkubiert wurden

DMEM-Medium	DMEM + 10% fetales Kälberserum (FCS)
DMEM + 100 µM Chloroquin (CQ)	DMEM + 10% FCS + 100 µM CQ

Für jede Formulierung erhielt man eine Übersicht über die Effizienz in fünf unterschiedlichen DOTAP-DNA-Massenverhältnissen und vier verschiedenen Inkubationsmedien. Die folgenden Abbildung 4.44 bis Abbildung 4.49 zeigen solche Übersichten.

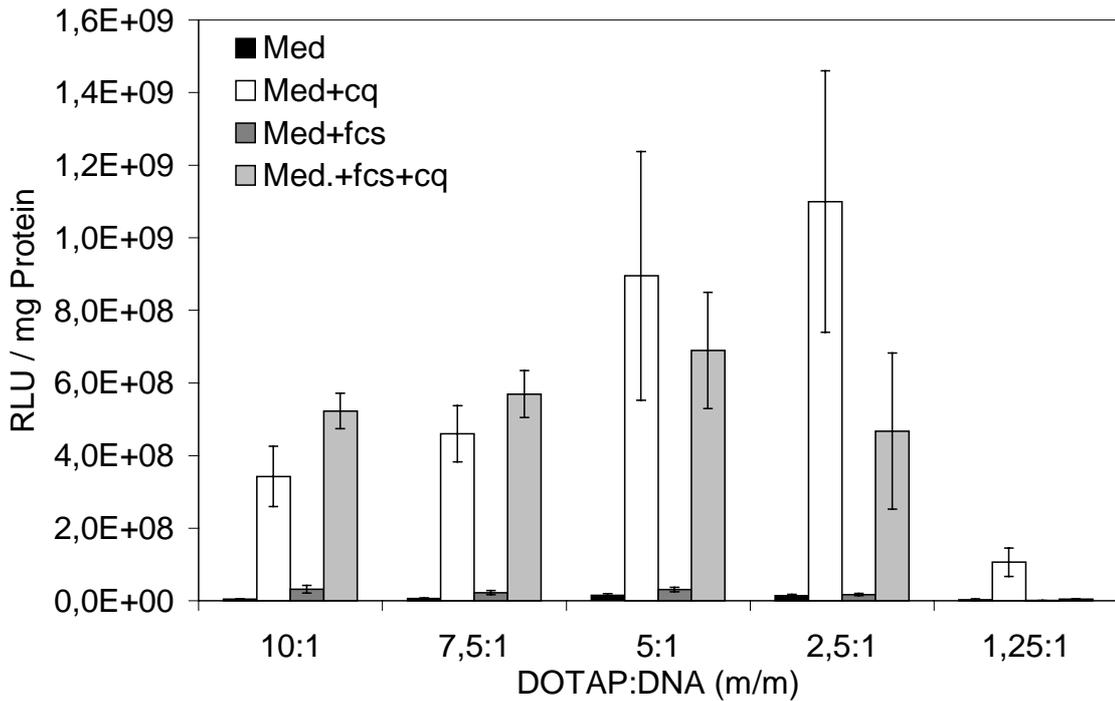


Abbildung 4.44: Übersicht über die Transfektionsaktivität (RLU/mg Protein) von S0,5 in fünf unterschiedlichen DOTAP-DNA-Massenverhältnissen und vier verschiedenen Inkubationsmedien (DMEM = Med., DMEM mit 100  $\mu$ M CQ = Med.+cq, DMEM mit 10 % FCS = Med.+fcs oder DMEM mit CQ und FCS = Med.+fcs+cq).

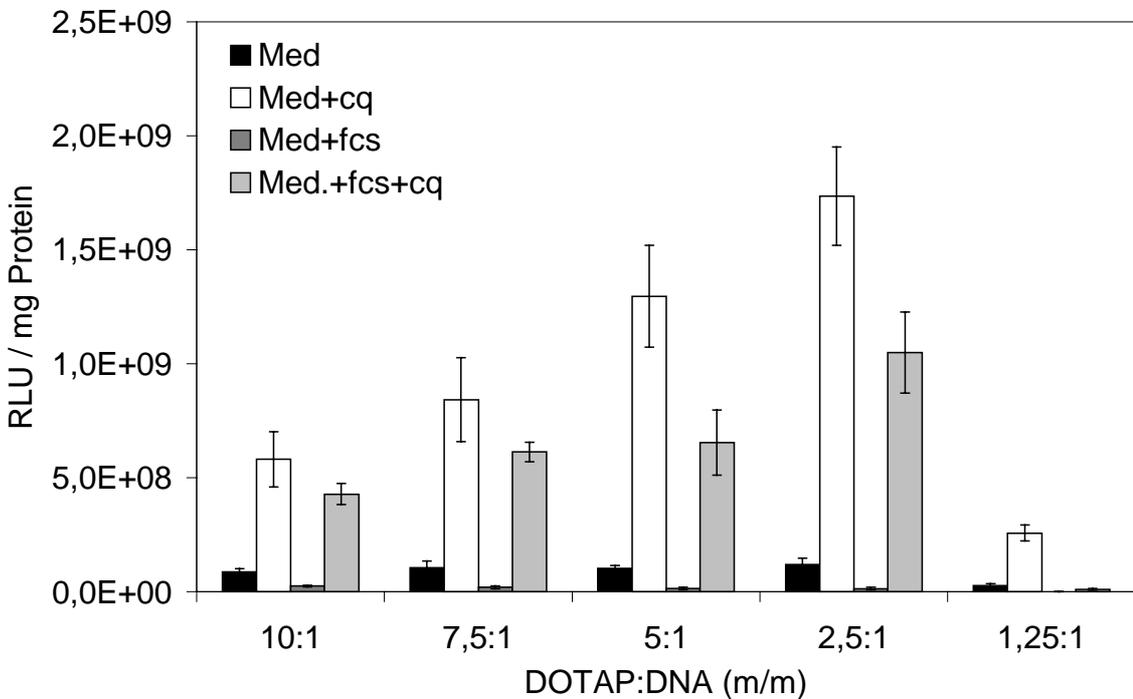


Abbildung 4.45: Übersicht über die Transfektionsaktivität (RLU/mg Protein) von S1 in fünf unterschiedlichen DOTAP-DNA-Massenverhältnissen und vier verschiedenen Inkubationsmedien (DMEM = Med., DMEM mit 100  $\mu$ M CQ = Med.+cq, DMEM mit 10 % FCS = Med.+fcs oder DMEM mit CQ und FCS = Med.+fcs+cq).

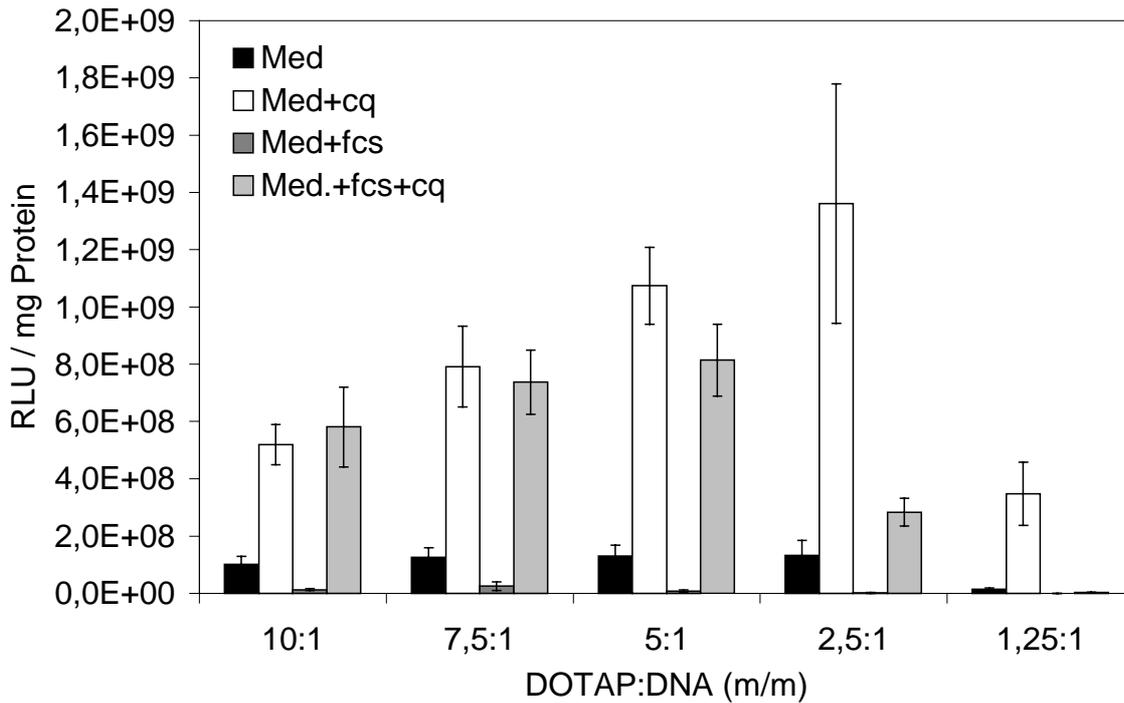


Abbildung 4.46: Übersicht über die Transfektionsaktivität (RLU/mg Protein) von S2 in fünf unterschiedlichen DOTAP-DNA-Massenverhältnissen und vier verschiedenen Inkubationsmedien (DMEM = Med., DMEM mit 100  $\mu$ M CQ = Med.+cq, DMEM mit 10 % FCS = Med.+fcs oder DMEM mit CQ und FCS = Med.+fcs+cq).

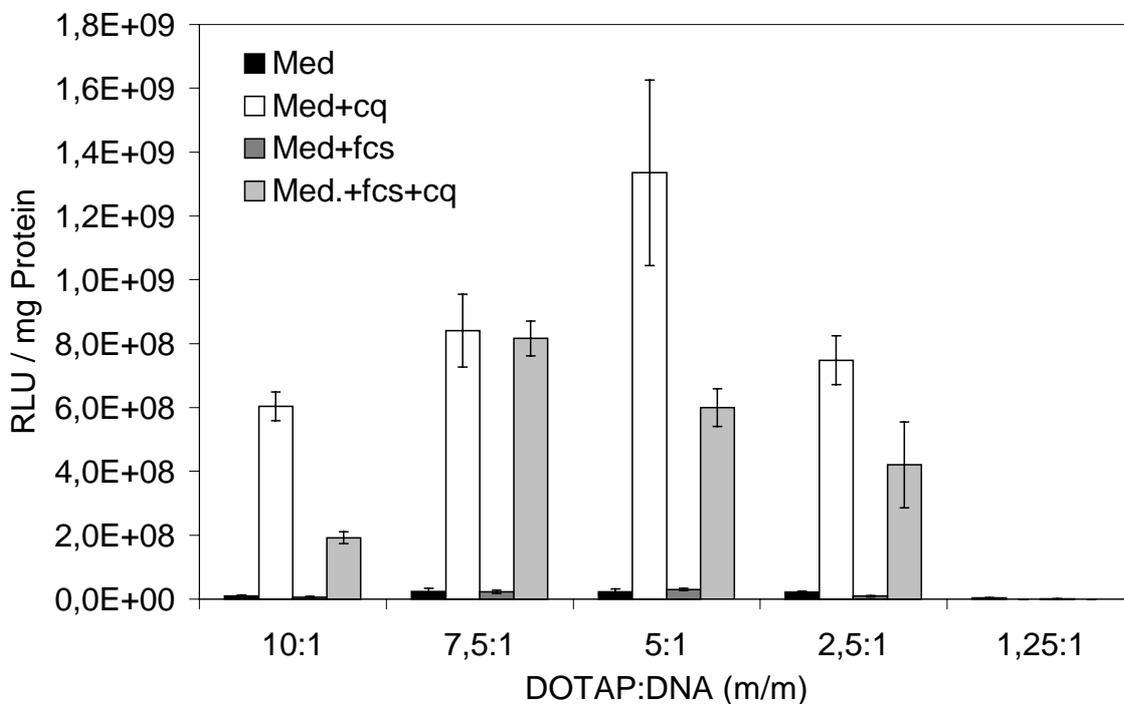


Abbildung 4.47: Übersicht über die Transfektionsaktivität (RLU/mg Protein) von S1:0,25 in fünf unterschiedlichen DOTAP-DNA-Massenverhältnissen und vier verschiedenen Inkubationsmedien (DMEM = Med., DMEM mit 100  $\mu$ M CQ = Med.+cq, DMEM mit 10 % FCS = Med.+fcs oder DMEM mit CQ und FCS = Med.+fcs+cq).

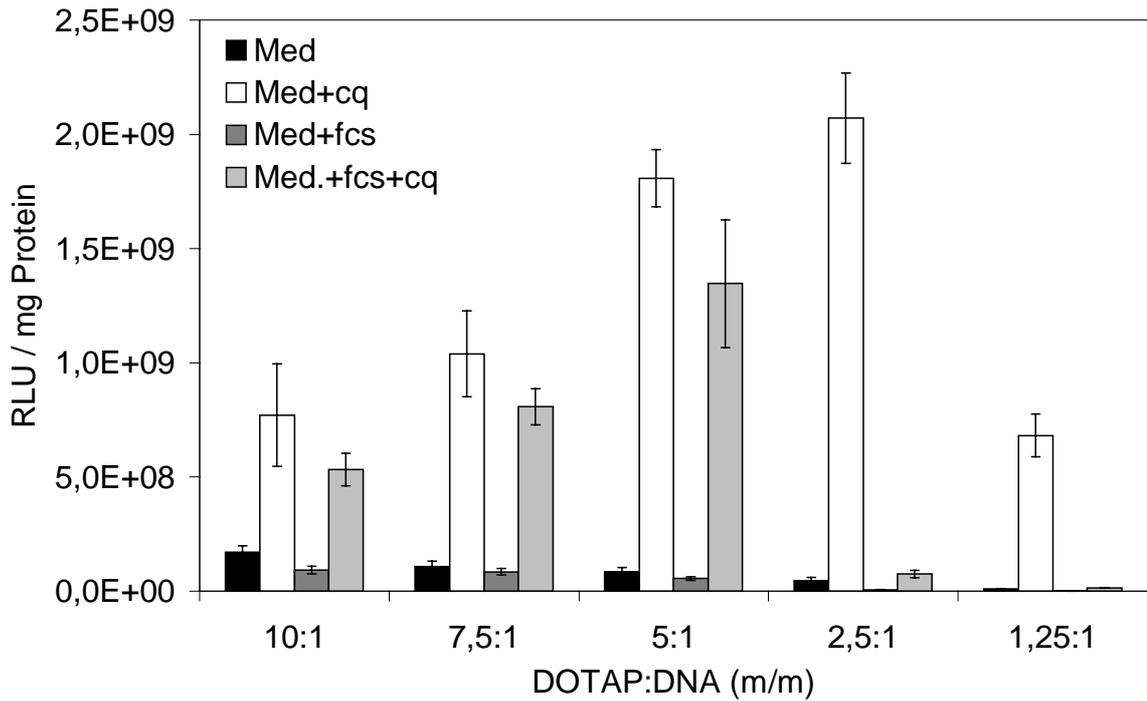


Abbildung 4.48: Übersicht über die Transfektionsaktivität (RLU/mg Protein) von S1:0,5 in fünf unterschiedlichen DOTAP-DNA-Massenverhältnissen und vier verschiedenen Inkubationsmedien (DMEM = Med., DMEM mit 100  $\mu$ M CQ = Med.+cq, DMEM mit 10 % FCS = Med.+fcs oder DMEM mit CQ und FCS = Med.+fcs+cq).

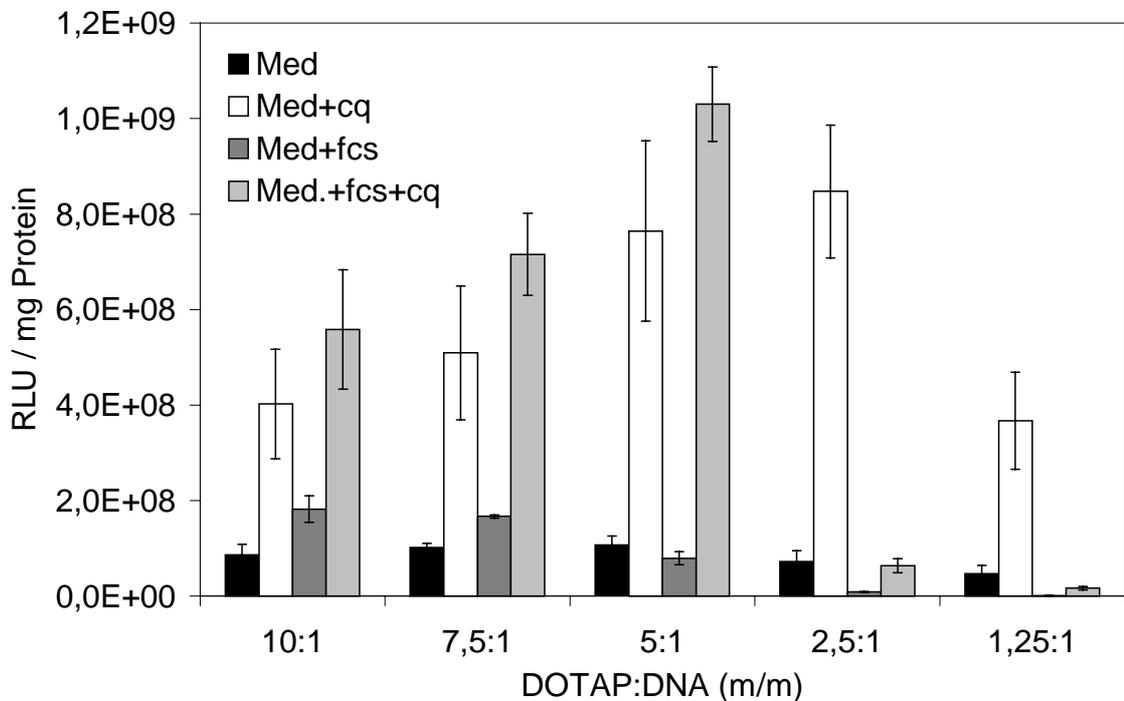


Abbildung 4.49: Übersicht über die Transfektionsaktivität (RLU/mg Protein) von S1:1 in fünf unterschiedlichen DOTAP-DNA-Massenverhältnissen und vier verschiedenen Inkubationsmedien (DMEM = Med., DMEM mit 100  $\mu$ M CQ = Med.+cq, DMEM mit 10 % FCS = Med.+fcs oder DMEM mit CQ und FCS = Med.+fcs+cq).

Für alle SLN wurde eine solche Übersicht angefertigt. Bei allen sechs Partikeln lag das effizienteste DOTAP-DNA-Verhältnis im Bereich von 2,5:1-7,5:1. Die eingesetzten Mengen waren für alle Partikel also richtig gewählt. Erstaunlicherweise zeigten auch die SLN mit nur 0,5 % DOTAP in diesem Bereich ihr Aktivitätsmaximum. Bei diesen Partikeln korrelierte das DOTAP:DNA-Verhältnis, ab dem die DNA vollständig immobilisiert war, nicht mit dem der maximalen Transfektionseffizienz. Die DNA-Immobilisierung trat bei 40:1 ein, die Transfektionseffizienz zeigte ihr Maximum bei 2,5:1-7,5:1. Diese Diskrepanz zeigte sich bei den 1 und 2 %-igen SLN nicht. Hier korrelierte das DOTAP-DNA-Verhältnis zur DNA-Immobilisierung im Gel in etwa mit dem Aktivitätsmaximum bei der Transfektion.

Um die Transfektionsaktivität aller untersuchten Systeme genau miteinander vergleichen zu können, wurden die Transfektionsraten der verschiedenen Formulierungen in den verschiedenen Medien im jeweils transfektionseffizientesten DOTAP:DNA-Verhältnis in Abbildung 4.50 gegenübergestellt.

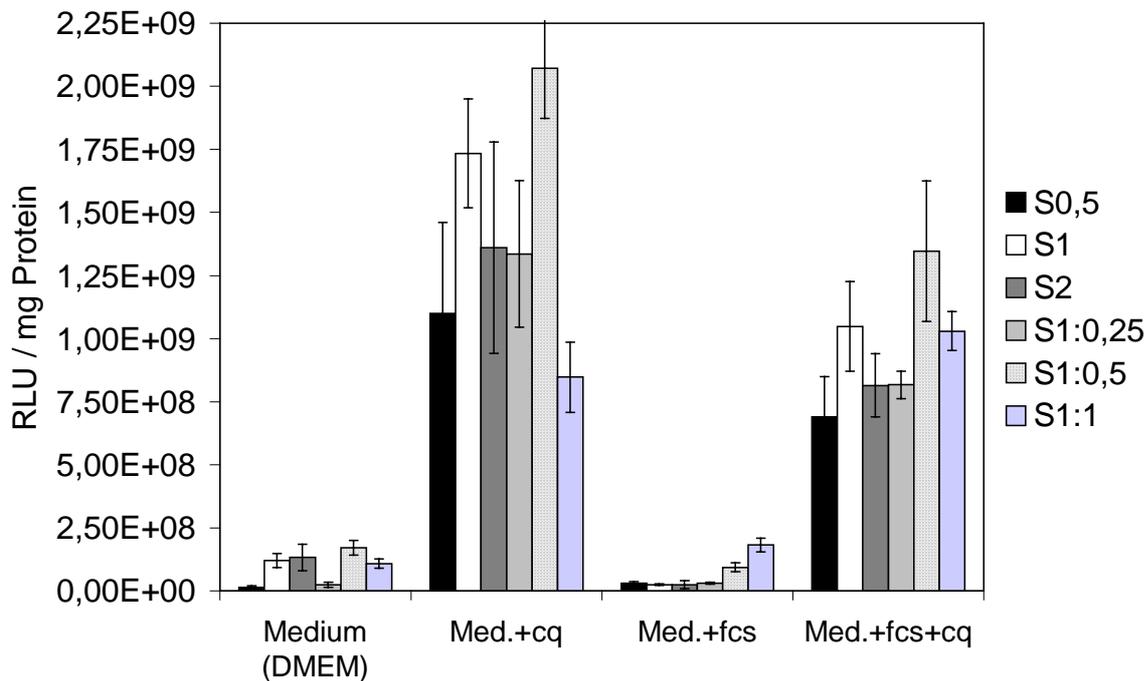


Abbildung 4.50: Übersicht über die Transfektionseffizienzen der verschiedenen SLN-Formulierungen im jeweils transfektionseffizientesten DOTAP:DNA-Verhältnis in Abhängigkeit vom verwendeten Medium (DMEM = Med., DMEM mit 100 µM CQ = Med.+cq, DMEM mit 10 % FCS = Med.+fcs oder DMEM mit CQ und FCS = Med.+fcs+cq). Die y-Achse ist linear skaliert.

Zunächst einmal läßt sich feststellen, das die Effizienz aller untersuchten SLN erfreulich hoch war. Die hohe Transfektionseffizienz von Cp(2)Dotap war also reproduzierbar. Um die gute Transfektionseffizienz der SLN weitergehend zu charakterisieren, wurden sie im Kapitel 4.4 mit liposomalen Zubereitungen verglichen.

Man erkennt sehr schön, den Effekt der unterschiedlichen Medien, in denen die Zellen während der Transfektion kultiviert worden sind. Die Zugabe von 100 µM CQ erhöhte bei allen Systemen die Effizienz. Wurde dem Medium 10 % FCS zugesetzt ging die Effizienz ein wenig zurück.

In Anwesenheit von CQ transfezierten alle SLN unabhängig davon, wie hoch der DOTAP-Gehalt war und ob DOPE in der Formulierung enthalten war oder nicht, in etwa gleich gut. Es war zu erkennen, daß die Effizienzsteigerung um so stärker ausgeprägt war, um so geringer der DOTAP-Gehalt der SLN war. Je geringer der DOTAP-Gehalt war, je stärker schienen die SLN-DNA-Komplexe vom lysosomalen Abbau betroffen zu sein. Dabei ist zu beachten, daß die zur Transfektion eingesetzte Menge an DOTAP immer gleich war.

Um die Transfektionsaktivitäten ohne CQ-Zusatz genauer beurteilen zu können, wurden in den nächsten beiden Abbildung 4.51 und Abbildung 4.52 nur die Ergebnisse ohne CQ Zusatz dargestellt.

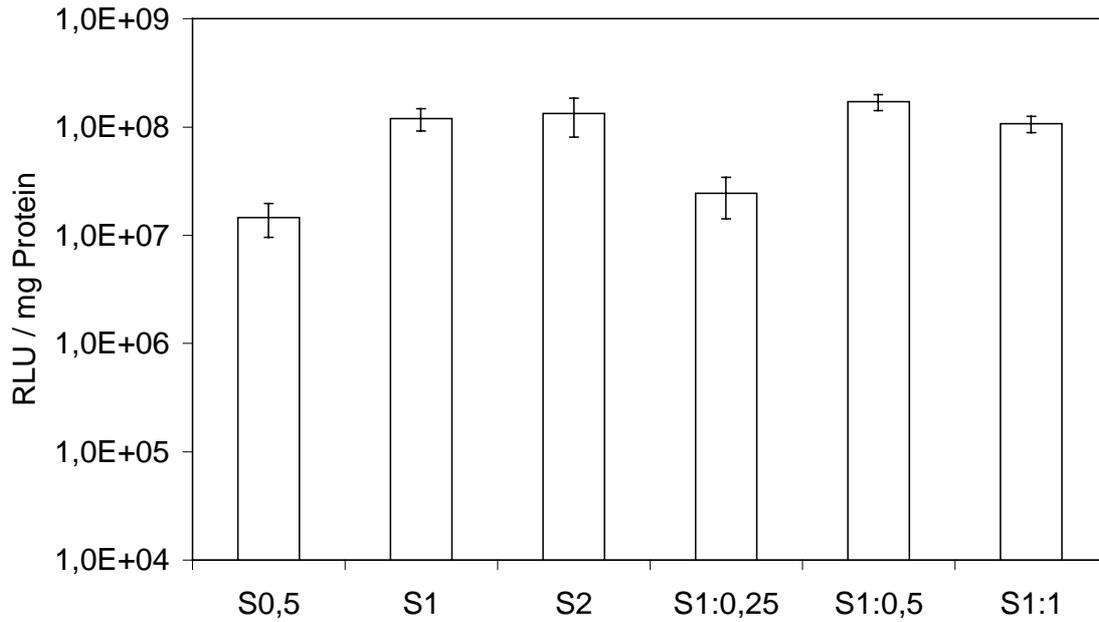


Abbildung 4.51: Übersicht über die Transfektionseffizienzen der verschiedenen SLN-Formulierungen im jeweils transfektionseffizientesten DOTAP:DNA-Verhältnis in DMEM ohne Zusätze. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert.

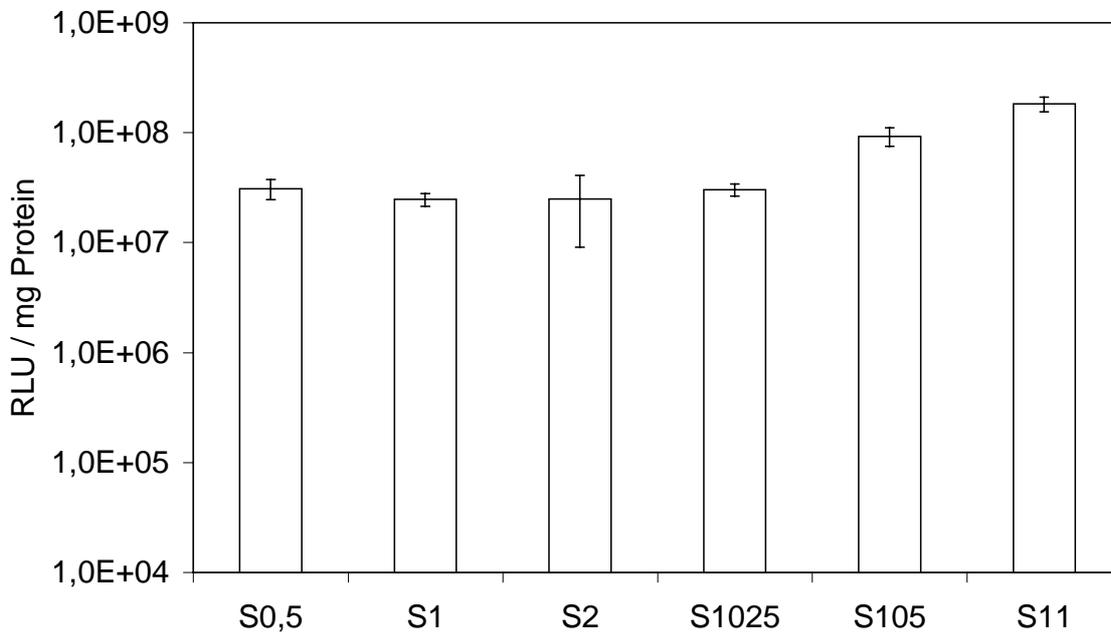


Abbildung 4.52: Übersicht über die Transfektionseffizienzen der verschiedenen SLN-Formulierungen im jeweils transfektionseffizientesten DOTAP:DNA-Verhältnis in DMEM mit 10 % FCS. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert.

Auf den vorausgegangenen Abbildungen ist zu erkennen, daß S1 und S2, die 1 und 2 % DOTAP enthielten, in reinem DMEM (ohne FCS und CQ) besser transfezierten als S0,5. S0,5 enthält nur 0,5 % DOTAP. In Medium mit FCS dagegen, wurde die Aktivität aller drei Formulierungen ein wenig verringert, und alle drei Formulierungen zeigten eine vergleichbare Aktivität. Dies könnte damit erklärt werden, das wie schon unter 4.3.3.3 vermutet, bei den 1- und 2 %-igen DOTAP-SLN das kationische Lipid nicht nur auf der Partikeloberfläche lokalisiert ist, sondern zu gewissen Teilen auch in mizellarer oder liposomaler Form vorliegt. Da Liposomen oft als wenig serumstabil beschrieben worden sind [Felgner et al. 1987], ließe sich vermuten, das diese nur in Abwesenheit von FCS die Effizienz zusätzlich erhöhen, in Anwesenheit von FCS aber inaktiviert werden.

Die Zugabe von DOPE zu den SLN bewirkte nur in Medium mit FCS bei den Formulierungen S1:1 und S1:0,5 eine geringe aber signifikante Steigerung der Transfektionseffizienz gegenüber S1. In reinem Medium ohne FCS konnte kein signifikanter Vorteil eines DOPE-Zusatzes gefunden werden.

Der Zusatz von 10 % FCS führte nur zu einem geringen Aktivitätsverlust. Das ist sehr erfreulich, da für viele liposomale Systeme starke Effizienzmindernungen beschrieben worden sind [Felgner et al. 1987].

Des weiteren wurde untersucht, ob die Herstellungsmethode (EmulsiFlex<sup>®</sup>-B3 versus Micron LAB 40) oder auch das verwendete Fett einen Einfluß auf die Transfektionseffizienz haben (Abbildung 4.53 bis Abbildung 4.55). Dazu wurden die Transfektionsaktivitäten der Formulierungen S0,5, Lab40 Cp0,5 und Lab40 Co0,5 miteinander verglichen. Alle drei Zubereitungen enthielten 0,5 % DOTAP. S0,5 und Lab40 Cp0,5 haben Cetylpalmitat als Matrixlipid. Lab40 Co0,5 enthielt Compritol. S0,5 wurde am EmulsiFlex<sup>®</sup>-B3 hergestellt, die beiden anderen Formulierungen am Micron LAB 40.

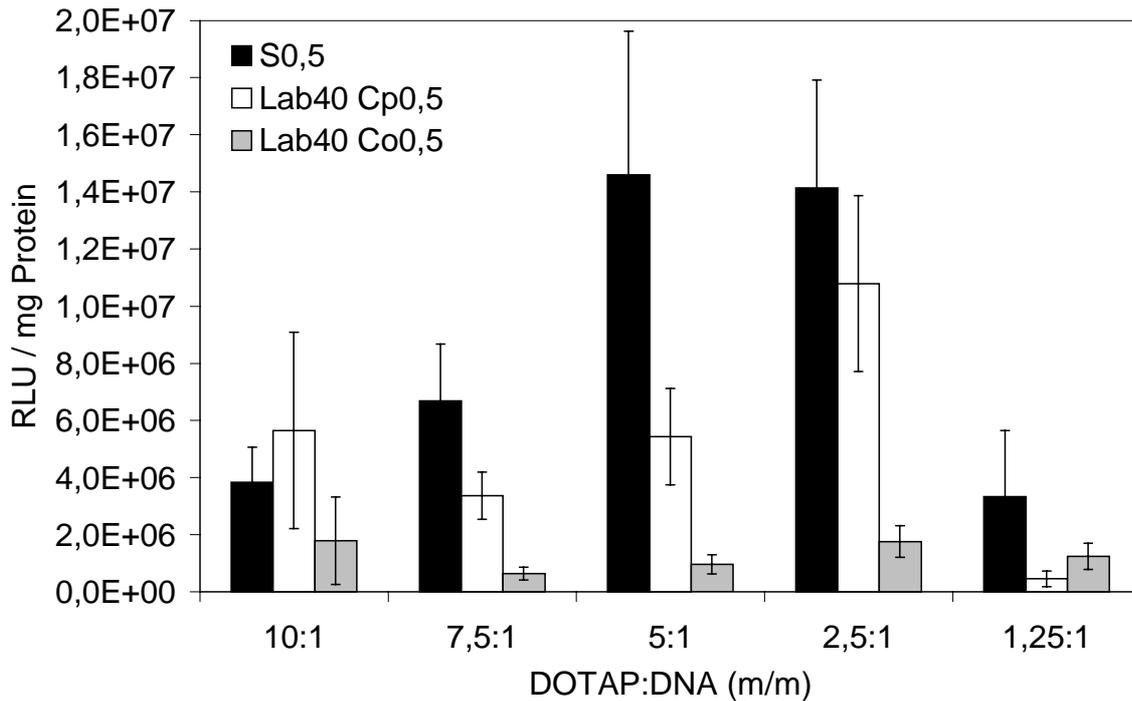


Abbildung 4.53: Vergleich der Transfektionseffizienzen von S0,5 mit Lab40 Co0,5 und Lab40 Cp0,5 in purem Medium (DMEM). Alle Formulierungen wurden in den DOTAP:DNA-Massenverhältnissen von 10:1, 7,5:1, 5:1, 2,5:1 und 1,25:1 getestet.

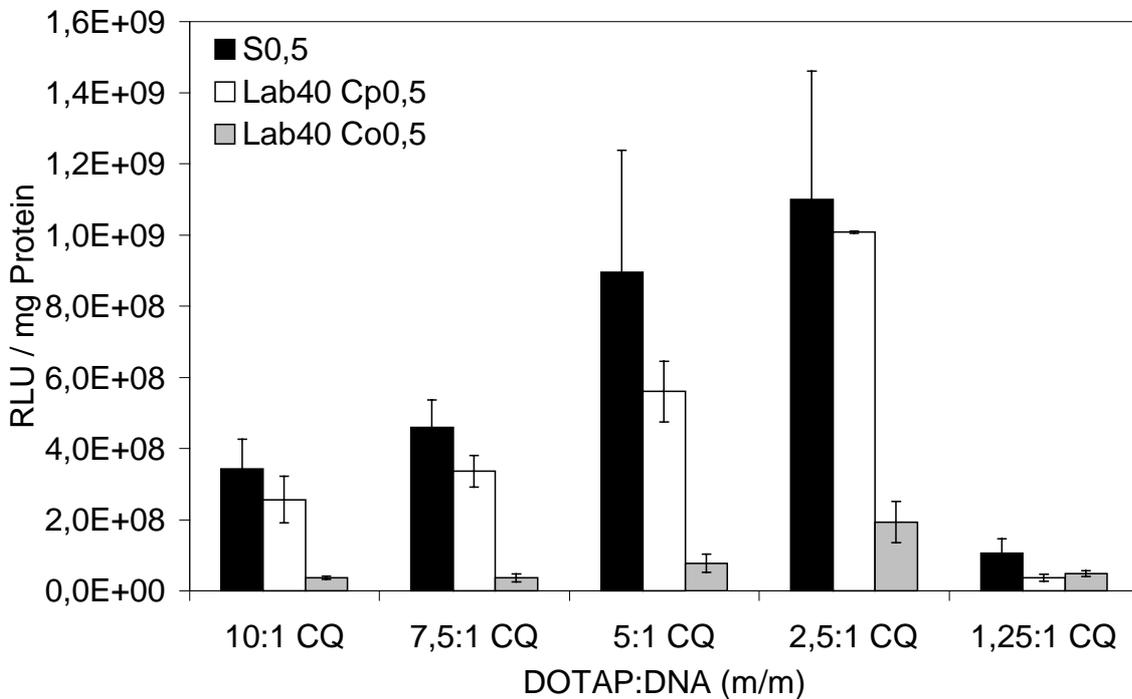


Abbildung 4.54: Vergleich der Transfektionseffizienzen von S0,5 mit Lab40 Co0,5 und Lab40 Cp0,5 in Medium (DMEM) unter Zusatz von 100  $\mu$ M Chloroquin. Alle Formulierungen wurden in den DOTAP:DNA-Massenverhältnissen von 10:1, 7,5:1, 5:1, 2,5:1 und 1,25:1 getestet.

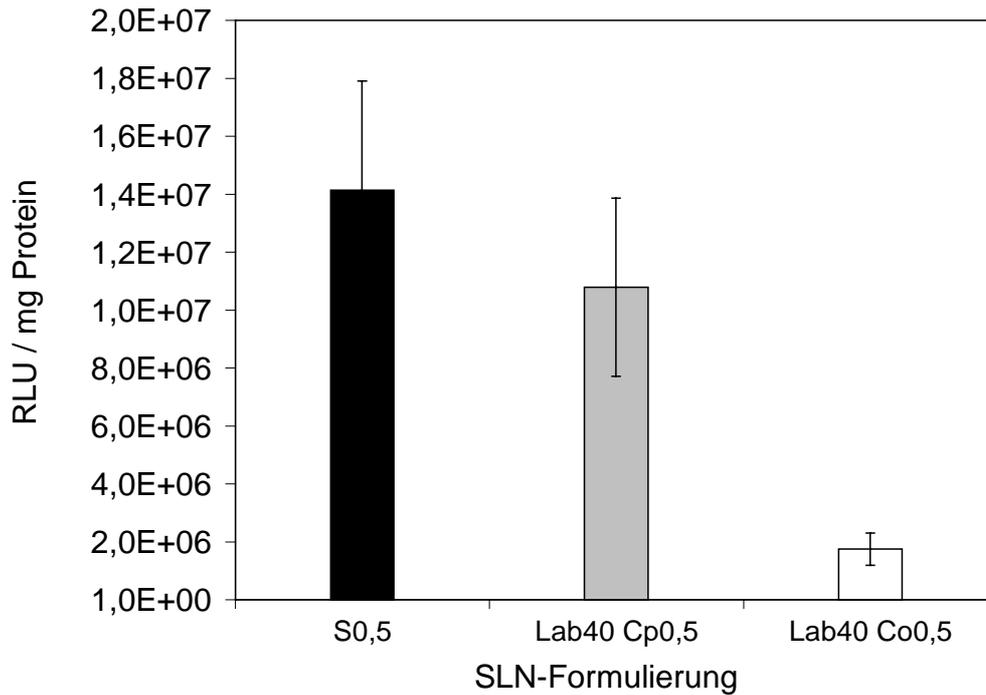


Abbildung 4.55: Vergleich der Transfektionseffizienzen von S0,5 mit Lab40 Co0,5 und Lab40 Cp0,5 in purem Medium (DMEM). Hier ist das bei allen drei Formulierungen effektivste Massenverhältnis von 2,5:1 dargestellt. Die y-Achse ist linear skaliert.

Die Transfektionseffizienz der DOTAP/Cetylpalmitat-SLN war auch diesmal signifikant höher als die der DOTAP/Compritol-SLN. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen aus der Untersuchung der ersten Reihe kationischer SLN (4.2.3.2). Auch hier waren die DOTAP/Cetylpalmitat-SLN besser als die DOTAP/Compritol-SLN. Bei diesen ersten Versuchen zeigten die DOTAP/Compritol-SLN aufgrund des Herstellungsverfahrens eine größere Partikelgröße (vgl. 4.2.2.1) als die transfektionseffektiveren DOTAP/Cetylpalmitat-SLN. Da bei dem zweiten hier abgebildeten Versuch die DOTAP/Compritol-SLN in etwa ähnliche Partikelgrößen wie die DOTAP/Cetylpalmitat-SLN zeigten (vgl. 4.3.3.1), ist nicht davon auszugehen, dass die Effektivitätsunterschiede durch die Partikelgröße hervorgerufen worden sind.

Die Transfektionseffizienz von kationischen SLN wird also von der Art des Matrixlipids beeinflusst.

Eine Erklärung könnte das etwas niedrigere Zetapotential der Compritol-SLN sein (vgl. 4.3.3.2 und 4.2.2.2). Die Affinität von DOTAP sich in die Grenzfläche von Compritol-SLN einzulagern, scheint geringer zu sein, als das Bestreben zur Einlagerung in die Grenzfläche von Cetylpalmitat-SLN. Selbst der größere Partikeldurchmesser der

DOTAP/Compritol-SLN der ersten Reihe und die daraus resultierende kleinere Oberfläche schien keinen Vorteil für die Besetzung mit DOTAP zu bringen.

Ein weiterer Erklärungsansatz könnten Unterschiede in der Kristallinität der Lipidmatrix sein. Um dieses Phänomen weitergehend zu untersuchen, wurden beide Partikel mittels Differential Scanning Calorimetrie (DSC) untersucht (siehe Kapitel 4.5).

Der Einfluß des zur Herstellung verwendeten Homogenisators (EmulsiFlex™-B3 versus Micron LAB 40) auf die Transfektionseffizienz der Cetylpalmitat-SLN war nicht signifikant.

## 4.3.4.2 Zytotoxizität

## 4.3.4.2.1 WST-1

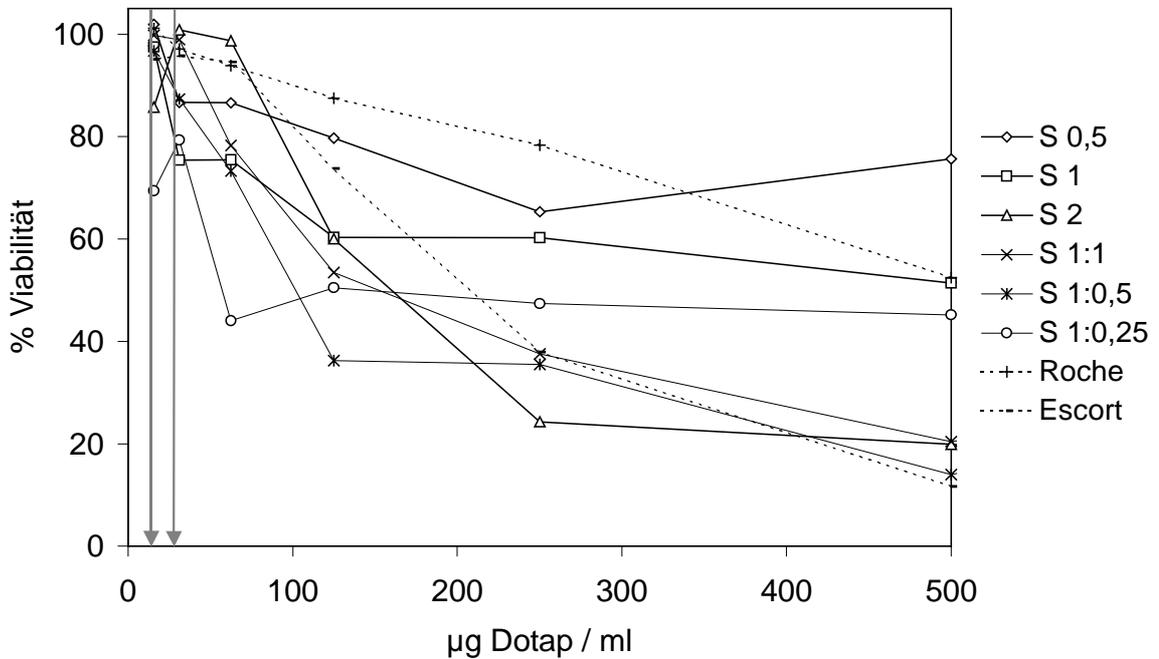


Abbildung 4.56: Vergleich der prozentualen Viabilität der Zellen nach Inkubation mit verschiedenen SLN-Zubereitungen und Liposomen-Vergleichen bezogen auf den Gehalt an DOTAP. Die senkrechten gestrichelten Linien kennzeichnen den zur Transfektion eingesetzten Konzentrationsbereich. Den Wert der 100 %-igen Viabilität lieferten Zellen, die nur mit DMEM inkubiert worden sind.

Auf obiger Abbildung 4.56 läßt sich erkennen, daß bei den zur Transfektion benötigten SLN-Konzentrationen keine Zytotoxizität mehr auftrat.

In höheren Konzentrationsbereichen zeigten DOPE-haltige SLN eine etwas höhere Toxizität als SLN, die nur DOTAP enthielten. Das gleiche ließ sich bei Escort<sup>TM</sup> und „Dotap liposomales Transfektionsreagens“ beobachten (vgl. Kapitel. 4.4). Escort<sup>TM</sup> enthält DOTAP und DOPE und ist in sehr hohen Konzentrationen toxischer als die andere nur DOTAP enthaltene liposomale Zubereitung. Weiterhin zeigten diese Ergebnisse, daß in hohen, für die Transfektion nicht relevanten, Konzentrationsbereichen die Toxizität um so geringer war, je geringer der DOTAP-Gehalt der SLN war ( $S_{0,5} < S_1 > S_2$ ). Dies wird in der folgenden Abbildung 4.57 nochmals verdeutlicht.

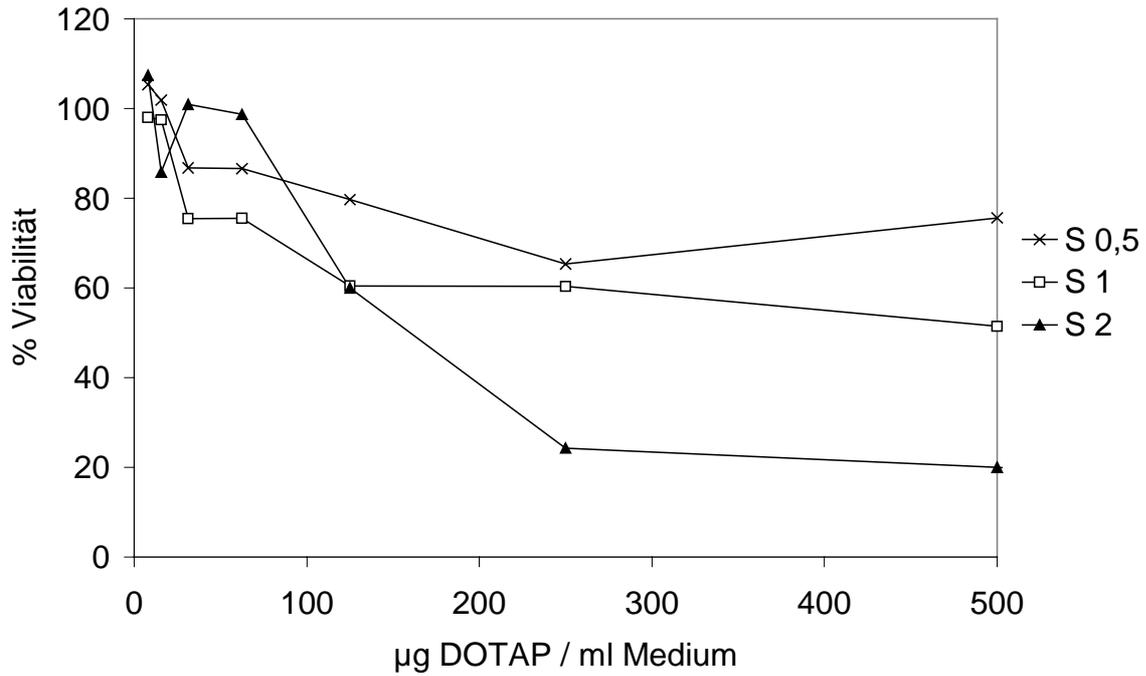


Abbildung 4.57: Vergleich der prozentualen Viabilität der Zellen nach Inkubation mit verschiedenen SLN-Zubereitungen bezogen auf die Konzentration von DOTAP im Inkubationsmedium. Den Wert der 100 %-igen Viabilität lieferten Zellen, die nur mit DMEM inkubiert worden sind.

#### 4.3.4.2.2 Proteingehalt nach der Transfektion als Maß für die Zytotoxizität

In Anschluß an die Transfektion wurde in jedem Well der Proteingehalt bestimmt. Dies diente der Standardisierung der Lumineszenz-Werte, die durch den Proteingehalt im jeweiligen Well dividiert werden. Zum anderen kann anhand der Proteinwerte nach der Transfektion auch eine Aussage über die Toxizität des Komplexes mit DNA gemacht werden. Durch Vergleich des Proteingehaltes nach Inkubation mit dem jeweiligen Transfektionsagens mit dem Proteingehalt von Zellen, die nur mit dem entsprechenden Medium kultiviert worden sind, erhält man eine Aussage über die Viabilität der Zellen (Abbildung 4.58).

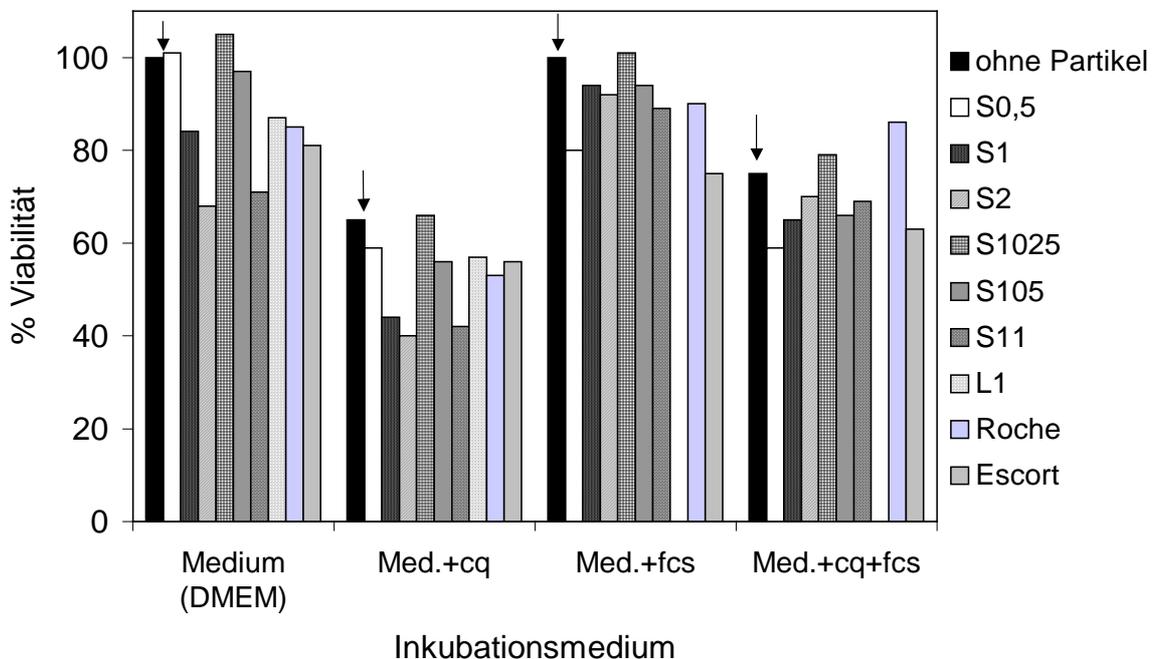


Abbildung 4.58: Viabilität der Zellen nach der Transfektion in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium (DMEM = Med., DMEM mit 100  $\mu$ M CQ = Med.+cq, DMEM mit 10 % FCS = Med.+fcs, DMEM mit CQ und 10 % FCS = Med.+fcs+cq) und dem eingesetzten Transfektionsagens. Die Viabilität ist bei allen Agenzien im DOTAP:DNA-Verhältnis von 5:1 dargestellt. Für die Werte in Med. und Med.+cq stellen Zellen, die in reinem DMEM kultiviert worden sind den 100 %-Viabilitäts-Wert und für Werte in Med.+fcs und Med.+fcs+cq stellen Zellen, die in Med.+fcs kultiviert worden sind den 100 %-Viabilitäts-Wert. Die mit dem Pfeil markierten schwarzen Balken geben die Viabilität der Zellen wieder, die nur im entsprechenden Medium ohne Transfektionsagens kultiviert worden sind.

Man erkennt auf obiger Abbildung, daß die Verträglichkeit stärker vom verwendeten Inkubationsmedium als vom eingesetzten Transfektionsagens abhing. Schon allein das Hinzufügen von 100  $\mu$ M CQ führte im Vergleich zu reinem Medium zu einer Viabilitätsabnahme

von durchschnittlich 35 %. Durch die Zugabe von Serum konnte dieser Viabilitätsverlust auf 25 % vermindert werden. Der Zusatz von Serum führte generell zu einer Zunahme der Verträglichkeit und der Viabilität.

Im reinen DMEM-Medium waren S0,5 und S1:0,25 am besten verträglich. Mit diesen Partikeln inkubierte Zellen zeigten Viabilitäten wie Zellen, die ohne Partikel inkubiert worden sind. S1 induzierte nur einen ganz geringen Viabilitätsrückgang. Bei S2 war dieser schon stärker ausgeprägt und betrug rund 30 %. Wäre nicht für alle Partikel das gleiche Zetapotential gefunden worden, so ließe sich diese Beobachtung durch die Zunahme der Ladungsdichte auf der Partikeloberfläche von S0,5 über S1 zu S2 hin erklären. Von S1:0,25 zu S1:0,5 zu S1:1 hin war der selbe Effekt zu erkennen. Die zum Vergleich angefertigten Liposomen L1 (vgl. Kapitel 4.4), „Dotap liposomales Transfektionsreagenz“ von Roche und Escort<sup>TM</sup> induzierten einen Viabilitätsrückgang um etwa 20 %.

Durch den Zusatz von 100 µM CQ wurde die Transfektionseffizienz zwar ganz erheblich gesteigert, doch leider induzierte das chloroquinhaltige Medium selber schon eine erhebliche Toxizität. Der Zusatz der Transfektionsagenzien verursachte einen Viabilitätsrückgang, der anteilmäßig dem in reinem Medium entsprach, doch leider schon von einem recht niedrigen Niveau ausging. Die Relationen waren im Vergleich zu reinem Medium gleich geblieben.

Der Zusatz von 10 % FCS verbesserte die Verträglichkeit der Systeme im Vergleich zu reinem Medium noch mehr, so daß die SLN-Formulierungen die Viabilität nur um durchschnittlich 10 % verminderten. Diese Toxizitätsabnahme ging einher mit einer in etwa der selben Größenordnung angesiedelten Aktivitätsabnahme. Einzig Escort<sup>TM</sup> zeigte noch eine Toxizität von 25 %.

### 4.3.5 Weitergehende Untersuchungen zum Chloroquin-Einfluß

Die Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Chloroquinphosphat pro Liter Medium (100  $\mu\text{M}$ ) führte zu einer intensiven Steigerung der Transfektionseffizienz. Doch leider war das Chloroquin selber zytotoxisch. In der Literatur findet sich, daß Chloroquin in Konzentrationen von 10–100  $\mu\text{M}$  einen endosomolytischen Effekt zeigt [Ciftci und Levy 2001]. Deshalb wurde in einem weiteren Versuch die Chloroquin-Menge von 100 über 50 auf 25  $\mu\text{M}$  reduziert. Dabei wurde die Abhängigkeit der Zellviabilität und der Transfektionsaktivität von der CQ-Konzentration im Medium untersucht (Abbildung 4.59).

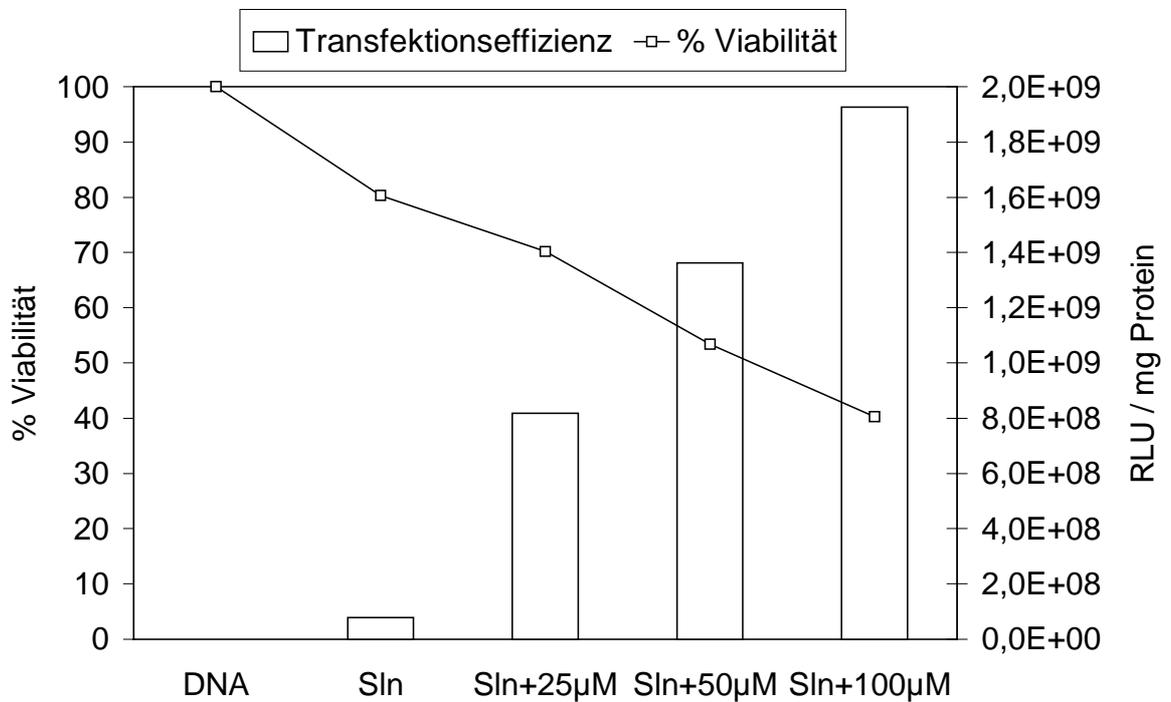


Abbildung 4.59: Steigerung der Transfektionsaktivität und Verminderung der Zellviabilität von S1:0,5-DNA-Komplexen (Sln) im DOTAP:DNA Massenverhältnis von 5:1 durch Zusatz von 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$  CQ zum Transfektionsmedium (DMEM) im Vergleich zu DNA alleine (DNA).

Es zeigte sich, daß im selben Maße, wie die Transfektionseffizienz anstieg, auch die Zytotoxizität zunahm. Ein Zusatz von nur 25  $\mu\text{M}$  CQ induzierte eine Abnahme der Viabilität um nur 12,5 % im Vergleich zu Zellen, die mit S1:0,5 ohne CQ inkubiert worden sind. Die Effizienz der Transfektion dagegen verzehnfachte sich sogar. Wurden 100  $\mu\text{M}$  CQ zugesetzt, nahm die Viabilität um 50 % ab und führte hier zu einer Steigerung um etwas mehr als das 24-fache.

Dies zeigt, daß es empfehlenswert ist, statt 100  $\mu\text{M}$  CQ nur noch 25  $\mu\text{M}$  CQ zur Erleichterung des endosomalen „Escapes“ einzusetzen, denn dieser geringere Zusatz zeigte ein viel günstigeres Verhältnis von Toxizität zu Effizienzsteigerung als die Zugabe höherer Mengen.

### 4.3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ziele der in diesem Kapitel beschriebenen Versuche waren, die hohe Effizienz und die gute Serumstabilität der Formulierung Cp(2)Dotap auf alle neuen Formulierungen zu übertragen, den Austritt aus den Endosomen zu erleichtern und den Einfluß des zur Herstellung verwendeten Homogenisators und der Art der Lipidmatrix auf die Transfektionseffizienz zu untersuchen. Des weiteren sollte das optimale Verhältnis des kationischen Lipids zum Matrixlipid gefunden werden.

Zu diesem Zweck wurden acht neue Formulierungen entwickelt. Alle enthielten DOTAP als kationisches Lipid. Sechs Zubereitungen wurden - in Anlehnung an Cp(2)Dotap - am EmulsiFlex<sup>TM</sup>-B3 produziert. Um den Einfluß des zur Herstellung verwendeten Homogenisators zu untersuchen, wurden zwei Zubereitungen am Micron LAB 40 hergestellt.

Für sieben dieser Formulierungen wurde das Matrixlipid Cetylpalmitat gewählt (so wie auch bei Cp(2)Dotap). Eine Formulierung enthielt Compritol. Diese Compritol-SLN wurden mit einer kleineren Partikelgröße hergestellt als beim vorausgegangenen Versuch. Dies diente dazu, zu untersuchen, ob die geringe Effizienz von kationischen SLN aus Compritol im verwendeten Matrixlipid begründet lag oder in der etwas größeren Partikelgröße, wie sie die Compritol-Partikel bei den vorhergehenden Versuchen zeigten.

Des weiteren wurde bei einem gleichbleibenden Matrixlipidgehalt von 4 % der Anteil des kationischen Lipids von 0,5 über 1 bis 2 % variiert. Zur Erleichterung des endosomalen Austritts wurde drei Formulierungen das in Liposomen etablierte Helferlipid DOPE in 1, 0,5 und 0,25 %-igen Anteilen zugesetzt.

Die Partikelgrößenbestimmung zeigte, daß alle am EmulsiFlex<sup>TM</sup>-B3 produzierten SLN PCS-Durchmesser im Bereich von 193-223 nm zeigten. Die am Micron LAB 40 produzierten SLN hatten PCS-Durchmesser von 170 (Cetylpalmitat) und 188 nm (Compritol); sie waren also etwas kleiner. Die Partikelgröße der Compritol-SLN war dieses Mal nicht wesentlich größer als die der Cetylpalmitat-SLN.

Die Zubereitungen wurden über einen Zeitraum von 100 Tagen gelagert. Dabei zeigten alle Formulierungen eine leichte Zunahme der mittleren Partikelgröße. Mikropartikuläre Aggregate konnten nicht gefunden werden. In Anbetracht des Zweckes sind solche leichten

Instabilitäten irrelevant. Die Stabilität der Formulierungen ließe sich beim Scaling-up (z. B. Produktion am kontinuierlichen LAB 60) noch steigern [Mehnert und Mäder 2001, Dingler und Gohla 2002].

Alle Formulierungen zeigten ein stark positives Zetapotential (4.3.3.2). Auffällig war, daß die Compritol-SLN wiederholt ein geringeres Zetapotential (+34,2 mV) als die Cetylpalmitat-SLN (+41,5 mV) zeigten.

Bei der Agarose-Gel-Elektrophorese zeigte sich, daß die zur vollständigen DNA-Immobilisierung notwendige Menge DOTAP bei den 1 und 2 %-igen SLN gleich war. Bei den 0,5 %-igen SLN dagegen war diese wesentlich höher. Da sich das Zetapotential der 0,5 %-igen nicht wesentlich von dem der 1 und 2 %-igen unterschied, müssen hierfür andere Gründe gesucht werden. Eine mögliche Erklärung wäre, daß bei den 1 und 2 %-igen SLN ein Maximum der Oberflächenbesetzung mit DOTAP erreicht ist und neben den SLN auch noch Mizellen oder Liposomen des kationischen Lipids vorliegen, was bei den 0,5 %-igen nicht oder nur im wesentlich geringeren Maße auftritt.

Alle untersuchten SLN-Formulierungen transfezierten erfreulich gut. Die hohe Transfektionseffizienz von Co(2)Dotap war reproduzierbar. Unabhängig vom DOTAP-Gehalt zeigten alle SLN-Zubereitungen bei DOTAP:DNA-Verhältnissen von 7,5–2,5:1 ein Transfektionsmaximum. Die Zugabe von 100 µM CQ steigerte die Transfektion in Abhängigkeit vom verwendeten Partikel im unterschiedlichen aber erheblichen Maße. Mit CQ zeigten alle Zubereitungen eine vergleichbar hohe Aktivität. Die Zugabe von 10 % FCS verringerte die Aktivität nur ein wenig. Für Liposomen sind z. T. sehr starke Effizienzminderungen beschrieben worden [Felgner et al. 1987].

In reinem Medium ohne CQ und FCS zeigten S1 und S2 mit 1 bzw. 2 % DOTAP eine bessere Effizienz als S0,5 mit nur 0,5 % DOTAP. Wurde dem Medium FCS zugesetzt war die Transfektionseffektivität vergleichbar. Dieses könnte ein weiterer Hinweis dafür sein, daß bei den 1 und 2 %-igen DOTAP-SLN auch noch liposomale oder mizellare Strukturen vorhanden waren, die bei der Zugabe von Serum weitestgehend deaktiviert worden sind.

Die Zugabe von DOPE zu den SLN bewirkte scheinbar nur in Medium mit FCS bei den Formulierungen S1:1 und S1:0,5 eine geringe aber signifikanten Steigerung der Transfektionseffizienz. In den anderen Medien war die Verbesserung der Transfektionseffizienz nicht signifikant. Bei der Formulierung S1:0,25 war kein Vorteil durch den DOPE-Zusatz

zu erkennen. Anscheinend hat die Inkorporation von DOPE in SLN nicht den gleichen transfektionssteigernden Effekt, wie er für Liposomen [Fasbender et al. 1997] und kationische Emulsionen [Kim et al. 2001] beschrieben worden ist. Vielleicht braucht es zur endosomolytischen Wirkung des DOPE eine fluide Lipid(-doppel)-schicht.

Am Micron LAB 40 wurden zwei SLN-Formulierungen produziert, die 0,5 % DOTAP enthielten. Das Matrixlipid der einen Zubereitung war Compritol und das der anderen Cetylpalmitat. Diese beiden wurden miteinander verglichen, um zu untersuchen, ob die höhere Effizienz der DOTAP/Cetylpalmitat-SLN gegenüber den DOTAP/Compritol-SLN reproduzierbar war. Zur Beurteilung des Einflusses des Herstellungsverfahrens wurden 0,5 %-ige DOTAP/Cetylpalmitat-SLN miteinander verglichen, die am EmulsiFlex™-B3 oder am Micron LAB 40 produziert worden sind. Die Transfektionseffizienz der DOTAP/Cetylpalmitat-SLN war auch diesmal signifikant höher (sowohl für S0,5 gegen Lab40 Co0,5 als auch für Lab40 Cp0,5 gegen Lab40 Co0,5) als bei den DOTAP/Compritol-SLN. Dies zeigt, daß die Transfektionseffizienz nicht nur vom kationischen Lipid, sondern auch vom Matrixlipid bestimmt wird. Der Unterschied zwischen den gleich zusammengesetzten, aber an unterschiedlichen Homogenisatoren hergestellten Formulierungen gleicher Partikelgröße war hingegen nicht signifikant.

Die Bestimmung der Zytotoxizität mit Hilfe des sogenannten WST-1 Tests zeigte, daß bei den zur Transfektion eingesetzten SLN-Konzentrationen keine Toxizität zu erkennen war. In höheren für die Transfektion nicht relevanten Konzentrationsbereichen zeigten DOPE-haltige SLN eine etwas höhere Toxizität als SLN, die nur DOTAP enthielten. Die Toxizität war um so geringer, je geringer der DOTAP-Gehalt in Relation zum Matrixlipidgehalt der SLN war. Die Untersuchung der beiden liposomalen Zubereitungen Escort™ und „Dotap liposomales Transfektions Reagens“ lieferte vergleichbare Ergebnisse.

Die Bestimmung des Proteingehaltes in jedem Well nach der Transfektion zeigte, daß die Verträglichkeit stärker vom verwendeten Inkubationsmedium als vom eingesetzten Transfektionsagens abhing. Durch das Hinzufügen von 100 µM CQ kam es im Vergleich zu reinem Medium zu einer Viabilitätsabnahme von durchschnittlich 35 %. Das Hinzufügen von Serum führte generell zu einer Zunahme der Verträglichkeit. S0,5 und S1:0,25 waren am besten verträglich und beeinträchtigten die Viabilität nicht. S1 induzierte nur einen ganz geringen Viabilitätsrückgang. Bei S2 war dieser schon stärker ausgeprägt und betrug rund 30 %. Von S1:0,25 über S1:0,5 zu S1:1 hin war der selbe Effekt zu erkennen. Unter Zusatz

von Serum war die Abhängigkeit der Toxizität vom DOTAP-Gehalt der SLN nicht mehr zu erkennen. Dies korrelierte damit, daß in Abwesenheit von Serum von S0,5 über S1 zu S2 hin eine Zunahme der Effektivität gefunden wurde, diese Abhängigkeit nach Zugabe von Serum aber verschwand. Dies könnte die Annahme stärken, daß neben den 1 und 2 %-igen SLN auch noch Liposomen oder Mizellen vorliegen, die in Anwesenheit von Serum inaktiviert werden. Die Vergleiche L1, Escort<sup>TM</sup> und „Dotap liposomales Transfektionsagens“ induzierten etwa einen Viabilitätsrückgang um 20 %.

Die Zugabe von 100 µmol Chloroquinphosphat pro Liter Medium (100 µM) führte zu einer intensiven Steigerung der Transfektionseffizienz. Leider ging vom Chloroquin selber eine gewisse Zytotoxizität aus. In der Literatur ist beschrieben, daß Chloroquin in Konzentrationen von 10–100 µM einen endosomolytischen Effekt zeigt [Ciftci und Levy 2001]. Deshalb wurde in einem weiteren Versuch die Chloroquin-Menge von 100 über 50 und 25 µM reduziert. Ein Zusatz von nur 25 µM induzierte eine Abnahme der Viabilität um nur 12,5 %. Die Effizienz der Transfektion mit S1:0,5 dagegen verzehnfachte sich sogar. Wurden 100 µM CQ zugesetzt, nahm die Viabilität um 50 % ab und führte hier zu einer Steigerung um etwas mehr als das 24-fache. Diese Ergebnisse zeigen, daß es empfehlenswert ist, statt 100 µM CQ nur noch 25 µM CQ zur Erleichterung des endosomalen „Escapes“ einzusetzen, denn dieser geringere Zusatz zeigte ein viel günstigeres Verhältnis von Toxizität zu Effizienzsteigerung als die Zugabe höherer Mengen.

## 4.4 Vergleich mit Liposomen

Die beste SLN-Formulierung S1 enthielt das kationische Lipid DOTAP. Dieses Lipid ist auch häufig Bestandteil von liposomalen Transfektionsagenzien. In den folgenden Versuchen wurde die Transfektionsaktivität von S1 mit liposomalen DOTAP-Formulierungen verglichen. Tabelle 4.10 enthält eine Übersicht über die eingesetzten Systeme.

Tabelle 4.10: Übersicht über Name, Hersteller, Zusammensetzung und Transfektionsprinzip der eingesetzten Vergleiche

Bezeichnung	Hersteller	Prinzip	Zusammensetzung
L1	Eigenherstellung	Liposomen	DOTAP 1% (10.000µg/ml), Tween/Span 2%
Dotap liposomales Transfektions-reagenz	Roche	Liposomen	DOTAP 0,1% (1.000µg/ml)
Escort <sup>TM</sup>	Sigma	Liposomen	DOTAP 0,1%, DOPE 0,1% (zusammen 2.000µg/ml)

L1 ist eine liposomale Zubereitung, die wie auch S1 durch Hochdruckhomogenisation am EmulsiFlex<sup>®</sup>-B3 hergestellt wurde. Analog zu S1 enthielt L1 2 % Tween/Span und 1 % DOTAP. Das Matrixlipid fehlte. Als weiterer Vergleich wurde das kommerziell erhältliche Transfektionsagens „Dotap liposomales Transfektionsreagenz“ von Roche gewählt. Das liposomale Transfektionsreagenz Roche besteht nur aus DOTAP. Escort<sup>TM</sup> enthält neben DOTAP auch noch das zwitterionische Helferlipid DOPE [Zhou und Huang 1994, Farhood et al. 1995]. Mit diesen Versuchen sollten Unterschiede und Ähnlichkeiten dieser verschiedenen Systeme untersucht werden. Ist die Transfektionseffizienz von S1 mit der von liposomalen Systemen zu vergleichen? Zeigen sich Ähnlichkeiten zwischen den Systemen, die auf das Vorhandensein von Liposomen neben den SLN in der Formulierung S1 schließen lassen? Auf den folgenden Abbildung 4.60 bis Abbildung 4.64 sind die Ergebnisse der Transfektion mit S1 und L1 dargestellt.

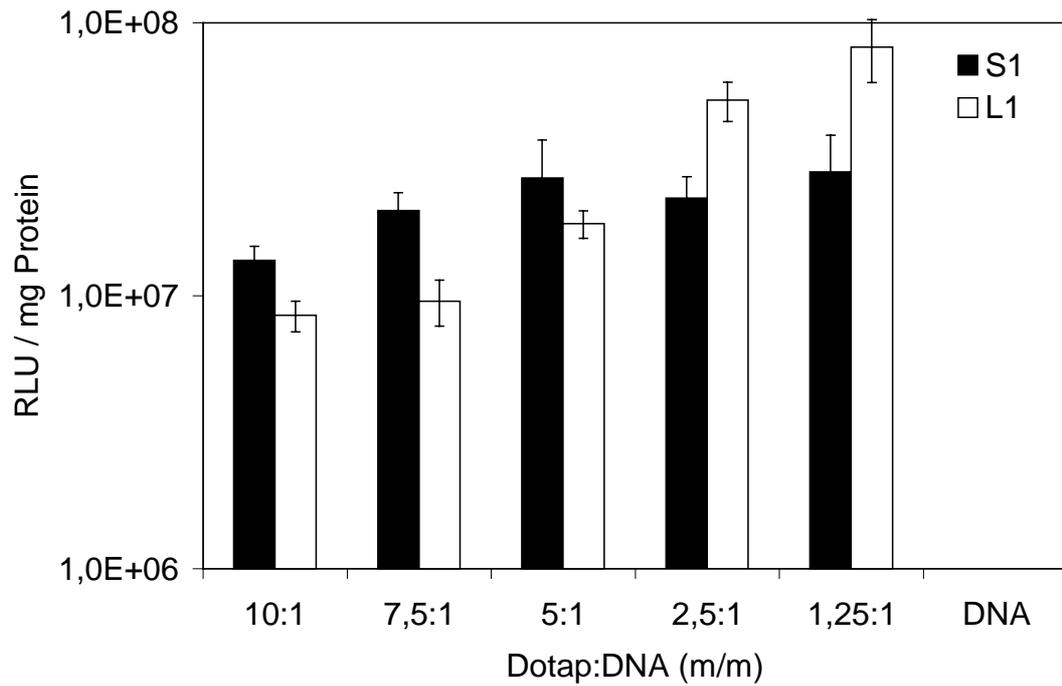


Abbildung 4.60: Ergebnisse der Transfektion mit S1 und L1 in DMEM ohne Zusätze in verschiedenen DOTAP:DNA-Verhältnissen. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert.

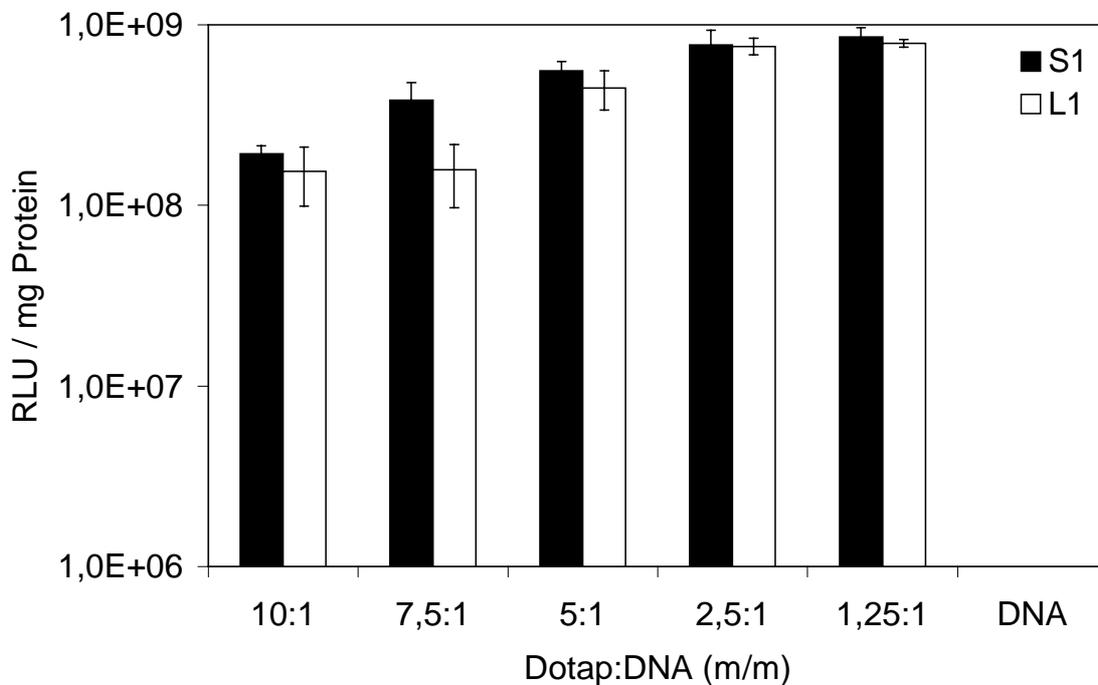


Abbildung 4.61: Ergebnisse der Transfektion mit S1 und L1 in DMEM mit 100 µM Chloroquin in verschiedenen DOTAP:DNA-Verhältnissen. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert.

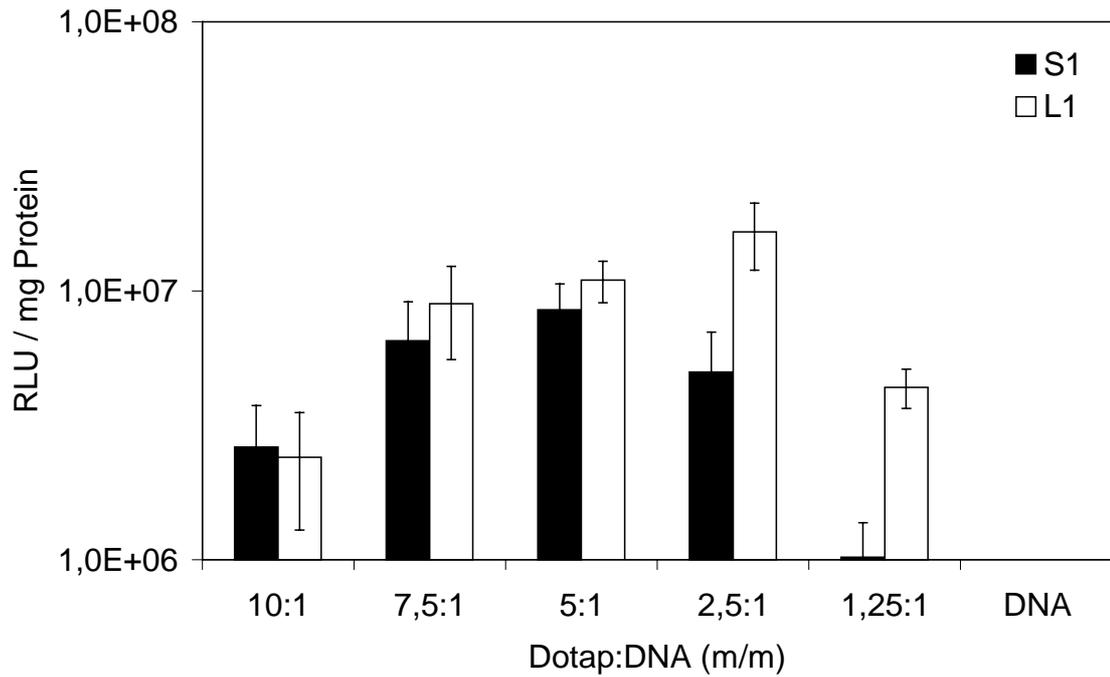


Abbildung 4.62: Ergebnisse der Transfektion mit S1 und L1 in DMEM mit 10 % FCS in verschiedenen DOTAP:DNA-Verhältnissen. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert.

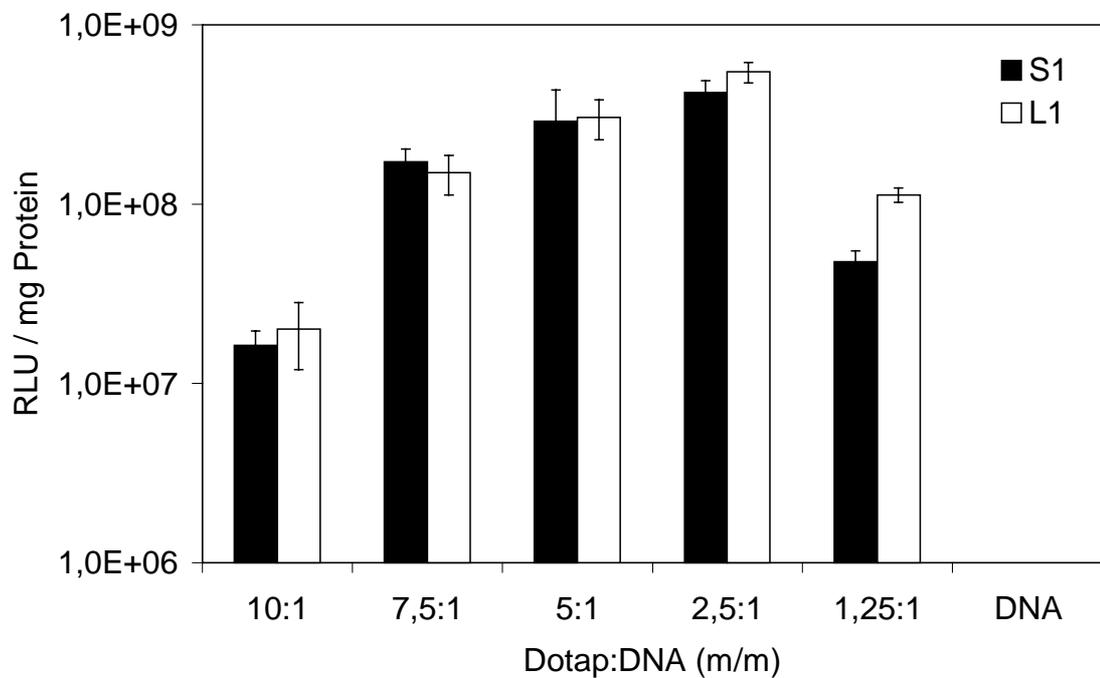


Abbildung 4.63: Ergebnisse der Transfektion mit S1 und L1 in DMEM mit 10 % FCS und 100  $\mu$ M Chloroquin in verschiedenen DOTAP:DNA-Verhältnissen. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert.

Die folgende Abbildung faßt die Ergebnisse zusammen. S1 und L1 sind in ihrem transfektionseffizientesten DOTAP:DNA-Massenverhältnis von 2,5:1 in Abhängigkeit vom verwendeten Medium dargestellt.

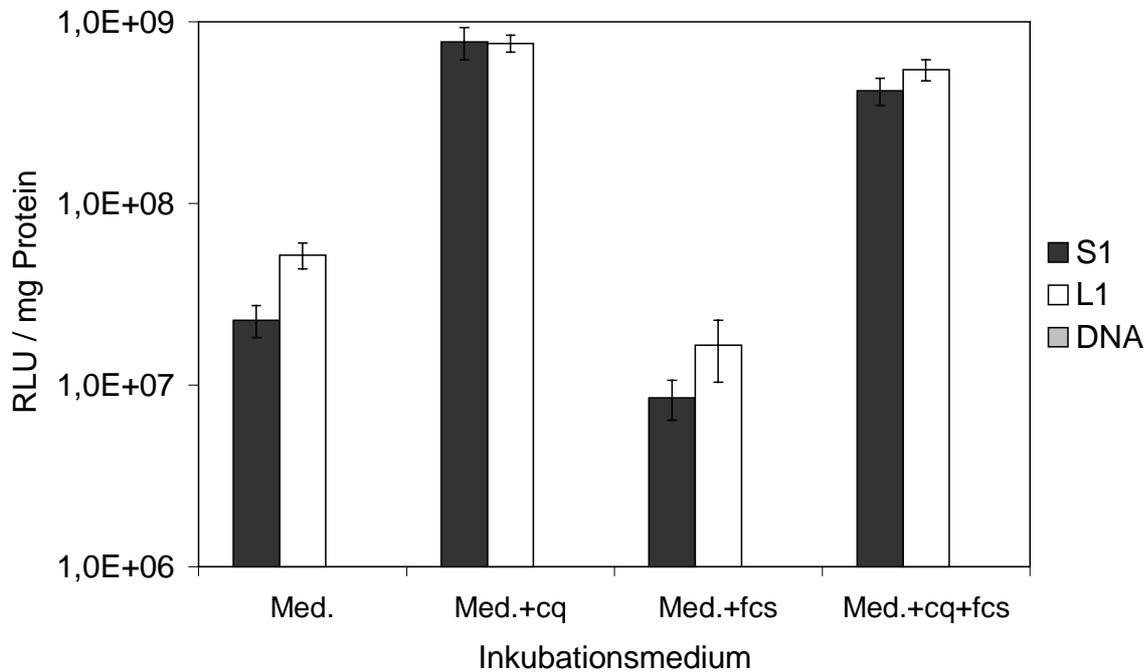


Abbildung 4.64: Ergebnisse der Transfektion mit S1 und L1 in verschiedenen Inkubationsmedien (DMEM = Med., DMEM mit 100µM Chloroquin = Med.+cq, DMEM mit 10 % FCS = Med.+fcs und DMEM mit 100µM Chloroquin und 10 % FCS = Med.+fcs+cq). Das Massenverhältnis von DOTAP zu DNA betrug 2,5:1. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert.

Man sieht sehr gut, daß sich die Transfektionseffizienz der liposomalen und der SLN-Formulierung kaum unterschied. Ein geringer signifikanter, aber praktisch irrelevanter Unterschied trat in DMEM, DMEM+FCS und DMEM+FCS+CQ auf. Zwischen den Transfektionseffizienzen in DMEM+CQ konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Der Zusatz von Chloroquin führte bei beiden Transfektionsagenzien zu einer Steigerung der Effizienz. Was ein Hinweis darauf sein kann, daß beide endosomal aufgenommen werden (siehe 4.2.3.2). Das Hinzufügen von 10 % FCS führte bei beiden Systemen zu einer leichten aber nicht dramatischen Abnahme der Transfektionsaktivität. Ohne den Zusatz von Chloroquin war die Transfektionseffizienz gegenüber nacktem Plasmids um etwa zwei Zehnerpotenzen gesteigert, mit Chloroquin um sogar drei bis vier Zehnerpotenzen.

Auf der folgenden Abbildung 4.65 wird S1 mit den kommerziellen liposomalen Transfektionsagenzien Escort™ und „Dotap liposomales Transfektionsagens“ verglichen.

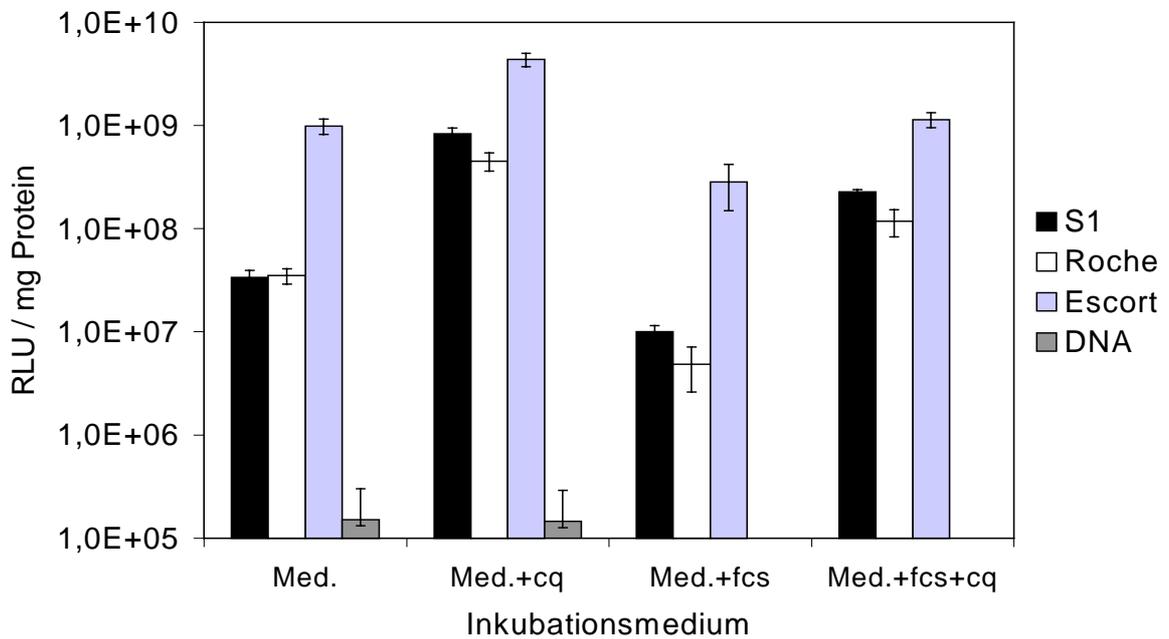


Abbildung 4.65: Ergebnisse der Transfektion mit S1, „Dotap liposomales Transfektionsreagenz“ und Escort™ in verschiedenen Inkubationsmedien (DMEM = Med., DMEM mit 100 µM Chloroquin = Med.+cq, DMEM mit 10 % FCS = Med.+fcs und DMEM mit 100 µM Chloroquin und 10 % FCS = Med.+fcs+cq). S1 wurde im DOTAP:DNA-Massenverhältnis von 2,5:1 (serumfreies Medium) und 5:1 (serumhaltiges Medium) eingesetzt. Die Transfektion mit „Dotap liposomales Transfektionsreagenz“ und Escort™ wurde in DOTAP:DNA-Verhältnissen entsprechend der Produktinformation (7,5:1 für das Roche-Produkt und 3:1 für Escort™) durchgeführt. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert.

Man sieht, daß S1 und die liposomale DOTAP-Formulierung von Roche sehr ähnliche Transfektionsaktivitäten zeigten. In DMEM trat kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Transfektionseffizienz auf. Dagegen zeigte S1 in DMEM unter Zusatz von CQ, FCS oder CQ und FCS sogar eine signifikant bessere Effizienz als das Roche-Produkt. Diese Unterschiede waren zwar signifikant, doch lagen diese Ergebnisse praktisch noch im selben Aktivitätsbereich und sollten deshalb nicht überbewertet werden. Beide Formulierungen enthielten nur DOTAP als kationisches Lipid. Escort™, welches noch zusätzlich das Helferlipid DOPE enthielt, zeigte eine signifikant höhere Effizienz als S1 und das Roche-Produkt. In purem DMEM war Escort etwa 28-mal effektiver als die beiden anderen nur DOTAP enthaltenen Formulierungen. Nach Zugabe von CQ war Escort™ nur noch etwa 5-mal besser. Diese Aktivitätsverstärkung ist sicherlich auf den DOPE-Gehalt zurückzuführen. Interessanter Weise zeigten SLN aus DOTAP und DOPE keinen Vorteil gegenüber

SLN, die nur DOTAP enthielten (vgl. Kapitel 4.3.4.1). Dieser Effekt scheint wohl auf liposomale Zubereitungen und kationische Emulsionen begrenzt zu sein.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß S1 und die beiden untersuchten liposomalen Zubereitungen L1 und „Dotap liposomales Transfektionsreagenz“ vergleichbare Transfektionsaktivitäten zeigten. Beide Liposomen enthielten nur DOTAP als kationisches Lipid. Da sich keine großen Unterschiede zwischen den SLN und den Liposomen zeigten, bleibt die Frage offen, inwiefern sich die verschiedenen Systeme überhaupt unterscheiden. Bei den SLN wird sicherlich nicht alles DOTAP in der Partikelgrenzfläche lokalisiert sein, sondern es dürfte ein Gleichgewicht zwischen liposomal und mizellar organisiertem und in der Grenzfläche eingelagertem DOTAP bestehen. Da die Effizienzen aber vergleichbar sind kann man davon ausgehen, daß sowohl liposomales DOTAP als auch DOTAP-SLN nach Komplexierung mit DNA transfezieren können. Wären nämlich nur Komplexe mit liposomalen DOTAP dazu in der Lage, dürfte S1 im Vergleich zu liposomalen DOTAP-Formulierungen nur eine geringere Effizienz zeigen. SLN stellen also eine alternative Plattformtechnologie zu liposomalen Transfektionsagenzien dar.

## 4.5 Weitergehende physikalische Charakterisierung

### 4.5.1 Differential Scanning Calorimetrie (DSC)

Reproduzierbar zeigten DOTAP/Cetylpalmitat-SLN eine signifikant höhere Effektivität als die DOTAP/Compritol-SLN. Beide Formulierungen wiesen ein vergleichbares DNA-Bindungsverhalten im Agarosegel auf. Durch die vorausgegangenen Versuche (4.3.4.1) konnte gezeigt werden, daß auch die Partikelgröße nicht die Ursache für die Aktivitätsunterschiede war. Der einzige bisher festgestellte Unterschied war das etwas höhere Zeta-potential der DOTAP/Cetylpalmitat-SLN im Vergleich zu den DOTAP/Compritol-SLN.

Um die unterschiedliche Performance der beiden Formulierungen weitergehend charakterisieren zu können, wurden die Zubereitungen mittels DSC untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß die DOTAP/Compritol-SLN einen Kristallinitätsindex von 103% zeigten, die DOTAP/Cetylpalmitat-SLN dagegen nur 33% bzw. 37%.

War dieser Unterschied zufällig, oder beeinflusst die Kristallinität der SLN wirklich die Transfektionseffizienz? Zur Beantwortung dieser Frage wurden auch die Formulierungen der ersten Reihe kationischer SLN vermessen (Tabelle 4.11).

Tabelle 4.11: Vergleich der Kristallinitätsindices von verschiedenen kationischen SLN

Formulierung	Kristallinitätsindex
S0,5	33,5 %
Lab40 Cp0,5	7,5 %
Lab40 Co0,5	106 %
Cp(2)Eq	55 %
Cp(4)Eq	85 %
Co(2)Eq	103 %
Cp(2)Ddab	76 %
Co(2)Cpc	76 %

Interessanterweise zeigte sich auch hier, daß die transfektionseffizientesten Formulierungen den geringsten Kristallinitätsgrad aufwiesen.

Es bestand also Grund zu der Annahme, daß sich eine geringe Kristallinität der SLN positiv auf die Transfektionseffizienz auswirkt. Um dies näher zu erforschen, wurden DDAB-SLN aus unterschiedlichen Fetten mit ganz verschiedenen Kristallinitätsgraden durch Hochdruckhomogenisation (vgl. 2.1.1) hergestellt. DDAB ist ein kationisches Lipid, welches in liposomalen Zubereitungen zur Transfektion vorkommt (vgl. 2.2.3) und wurde deshalb für diese Versuche eingesetzt, weil es in ausreichenden Mengen am Lehrstuhl vorlag und wesentlich kostengünstiger war als z. B. DOTAP. Bei der ersten Reihe kationischer SLN, die für diese Arbeit entwickelt worden sind, zeigte DDAB allerdings keine so gute Effizienz (vgl. 4.2.3.2). Die beiden dabei getesteten Formulierungen waren hoch kristallin. Die Zusammensetzungen und die Kristallinitätsgrade der für diesen Versuch hergestellten SLN sind in Tabelle 4.12 dargestellt.

Tabelle 4.12: Auflistung der Art des Matrixlipids, der Lagerungstemperatur und des Kristallinitätsgrades (Tag 21 nach der Herstellung) der DDAB-SLN bzw. DDAB-Nanoemulsionen. Alle Formulierungen enthielten 1 % DDAB und 2 % Tween 80/Span 85 (7:3).

Formulierung	Matrixlipid	Lagerungstemperatur	Kristallinitätsgrad
Co	Compritol 4 %	Raumtemperatur	112 %
Cp	Cetylpalmitat 4 %	Raumtemperatur	40 %
D114 KS	Dynasan 114 4 %	4°C	67 %
D114 RT	Dynasan 114 4 %	Raumtemperatur	18 %
D112	Dynasan 112 4 %	Raumtemperatur	0 %
Mig	Miglyol 4 %	Raumtemperatur	0 %
Lipof	Lipofundin 10 %	Raumtemperatur	0 %

Mit Hilfe des EmulsiFlex<sup>®</sup>-B3 wurden die DDAB-SLN aus verschiedenen Matrixlipiden und mit ganz unterschiedlichem Kristallinitätsgraden hergestellt. Zusätzlich wurden auch

noch zwei Nanoemulsionen eingesetzt. Die Nanoemulsion aus Miglyol wurde selbst produziert. Zu Lipofundin wurde DDAB zugegeben und die Mischung anschließend homogenisiert. Die Partikelgröße der SLN bzw. Nanoemulsionen lag für alle Systeme mit Ausnahme der Formulierung Co, deren PCS-Durchmesser bei ca. 500 nm lag, zwischen 190-270 nm. Die Ergebnisse der Transfektionsversuche mit den verschiedenen DDAB-Formulierungen sind in folgender Abbildung 4.66 dargestellt.

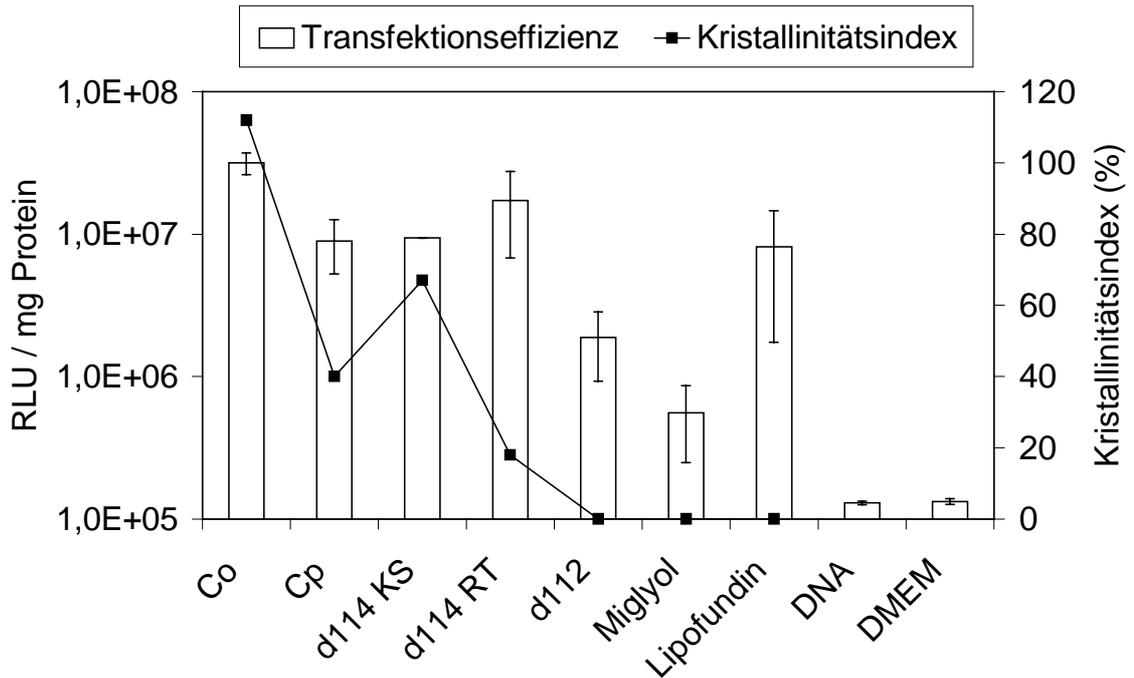


Abbildung 4.66: Transfektionseffizienzen von DDAB-SLN bzw. DDAB-Nanoemulsionen aus unterschiedlichen Matrixlipiden. Auf der primären y-Achse ist die Transfektionsaktivität logarithmisch dargestellt und auf der sekundären y-Achse ist der Kristallinitätsgrad linear aufgetragen. Auf der x-Achse ist das Matrixlipid der jeweiligen SLN bzw. Emulsionen aufgetragen. Als Vergleich dienten Zellen, die mit reinem Medium (DMEM) oder DNA in Medium (DNA) inkubiert worden sind. Das zur Transfektion eingesetzte DDAB:DNA-Verhältnis war bei allen Formulierungen 2:1. Die Transfektion erfolgte in DMEM ohne Zusätze.

Bei diesem Versuch konnte kein Zusammenhang zwischen der Kristallinität und der Transfektionseffizienz von SLN gefunden werden. Zwar hatte die Art des verwendeten Matrixlipids der DDAB-SLN einen Einfluß auf die Transfektionseffizienz, doch wurde dieser Einfluß anscheinend nicht durch die Kristallinität bestimmt. Es ist allerdings nicht klar, inwiefern diese Ergebnisse auch auf SLN mit anderen kationischen Lipiden übertragen werden können.

## 4.5.2 Sterilisation

Für die Arbeit mit Zellkulturen und erst recht für die parenterale Anwendung werden sterile Formulierungen benötigt. Die in dieser Arbeit zur Transfektion verwendeten SLN-Zubereitungen wurden nicht sterilisiert. Die Herstellung erfolgte auch nicht unter aseptischen Bedingungen. Die heißen Formulierungen wurden nur in autoklavierte Behältnisse abgefüllt. Dieses Vorgehen wurde bei den ersten Formulierungen damit gerechtfertigt, daß die Formulierungen 1 % kationisches Lipid bzw. Detergens enthielten. Die Zubereitungen wurden zur Anwendung stark verdünnt (bei S1 z. B. 1:400-800). Die Lagerkonzentration war also wesentlich höher als die Anwendungskonzentration. Da z. B. 0,01 % Benzalkoniumchlorid zur Konservierung eingesetzt wird [Burger und Wachter 1993], war ein mikrobiologisches Stabilitätsproblem bei einer Zubereitung mit 1 % Benzalkoniumchlorid als Lagerkonzentration nicht zu erwarten. Bei den unter aseptischen Bedingungen und ohne Antibiotikazusatz durchgeführten Zellkulturversuchen bestätigte sich diese Überlegung. Keine der getesteten Formulierungen verursachte eine sichtbare oder die Arbeit behindernde Verkeimung. Allerdings wurden die Zellkulturen von der Zugabe der SLN-Verdünnungen an bis zum Abschluß der Versuche nur 48 h lang beobachtet und anschließend verworfen.

Trotzdem ist es aber notwendig, die Zubereitungen mittels etablierten Methoden sterilisieren zu können. Die Sterilfiltration ist bei Formulierungen mit Partikelgrößen von  $< 220$  nm möglich aber recht aufwendig. Die mit Hilfe des EmulsiFlex<sup>®</sup>-B3 hergestellten Formulierungen waren zum Teil auch größer. Werden die SLN am Micron LAB 40 oder LAB 60 hergestellt, dürfte es aber kein Problem sein, die Partikelgröße ein wenig zu reduzieren (vgl. die Partikelgrößen von S0,5 und Lab40 Cp0,5, Kapitel 4.3.3.1), so daß eine Sterilfiltration möglich wäre. Einfacher ist aber die Dampfsterilisation.

Die Dampfsterilisation von SLN ist generell möglich. Inwiefern die Stabilität der Zubereitung davon beeinträchtigt wird oder nicht, hängt aber stark von der individuellen Formulierung ab [Schwarz 1995a, Schwarz et al. 1995b]. Bei manchen führt der Streß des Autoklavierens zu Aggregation und Partikelgrößenwachstum, andere Formulierungen überstehen die Sterilisation problemlos. Schwarz kam bei Ihren Untersuchungen zu dem Ergebnis, daß geladene Emulgatoren wie z. B. Lecithine besser zur Stabilisierung von SLN geeignet sind, die Autoklaviert werden sollen, als SLN, die mit sterischen Stabilisatoren wie z. B. Polox-

amer, formuliert worden sind. Erklärt wurde dies damit, daß bei sterischen Stabilisatoren mit Polyethylenglykol-Ketten die Hydratation der Polyethylenglykolabschnitte mit zunehmender Temperatur abnimmt und somit auch der stabilisierende Einfluß auf O/W-Systeme verringert wird [Liedtke et al. 1999].

Die zur Transfektion eingesetzten Formulierungen sind alle unter Einsatz von einer Mischung aus Tween 80 und Span 85 stabilisiert worden. Tween enthält Polyethylenglykol-Ketten. Basierend auf den Ergebnissen von Schwarz wären also Instabilitäten zu erwarten. Allerdings ist auch das kationische Lipid DOTAP enthalten, welches ebenfalls emulgierende Eigenschaften besitzt.

Die Partikelgrößen der Formulierungen S1 (=Cp(2)Dotap) und Lab40 Cp0,5 wurden kurz vor der Dampfsterilisation mittels PCS und LD bestimmt. Anschließend wurden sie in fest verschlossenen, mit 1 ml befüllten 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei 121°C 15 min lang autoklaviert [Ph. Eur. 1997 NT 2001]. Am Tag nach der Sterilisation wurden die Partikelgrößen nochmals gemessen (Abbildung 4.67 bis Abbildung 4.70).

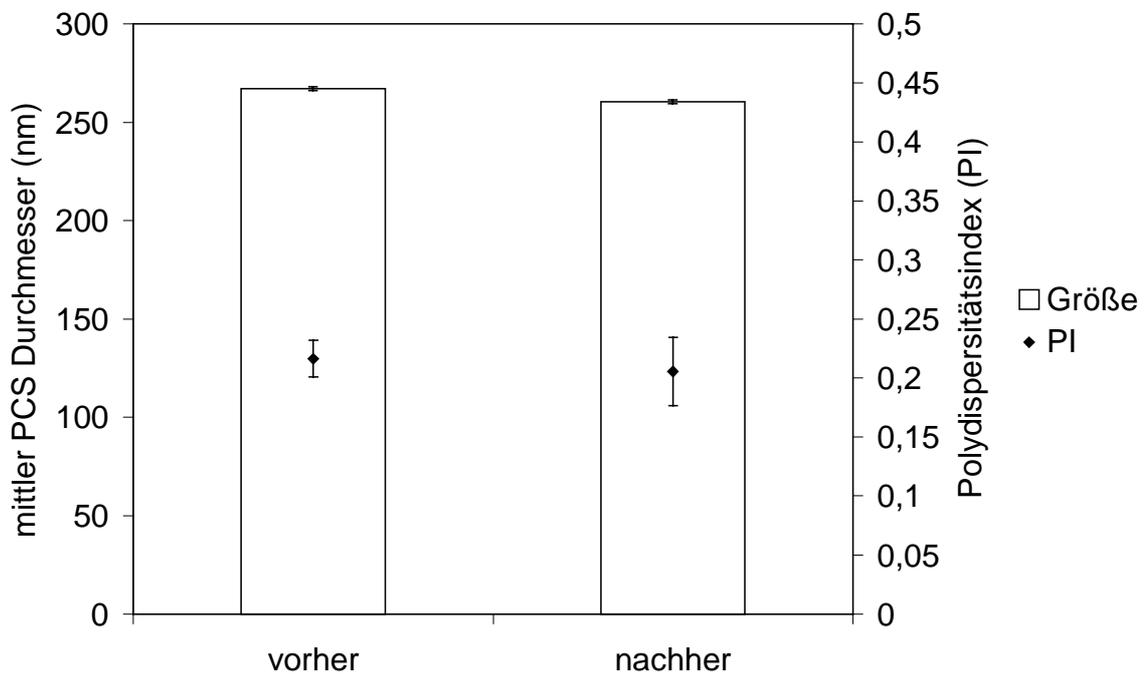


Abbildung 4.67: Mittlerer PCS-Durchmesser (nm) und Polydispersitätsindex der Formulierung S1 (=Cp(2)Dotap) am Tag vor und einen Tag nach der Dampfsterilisation

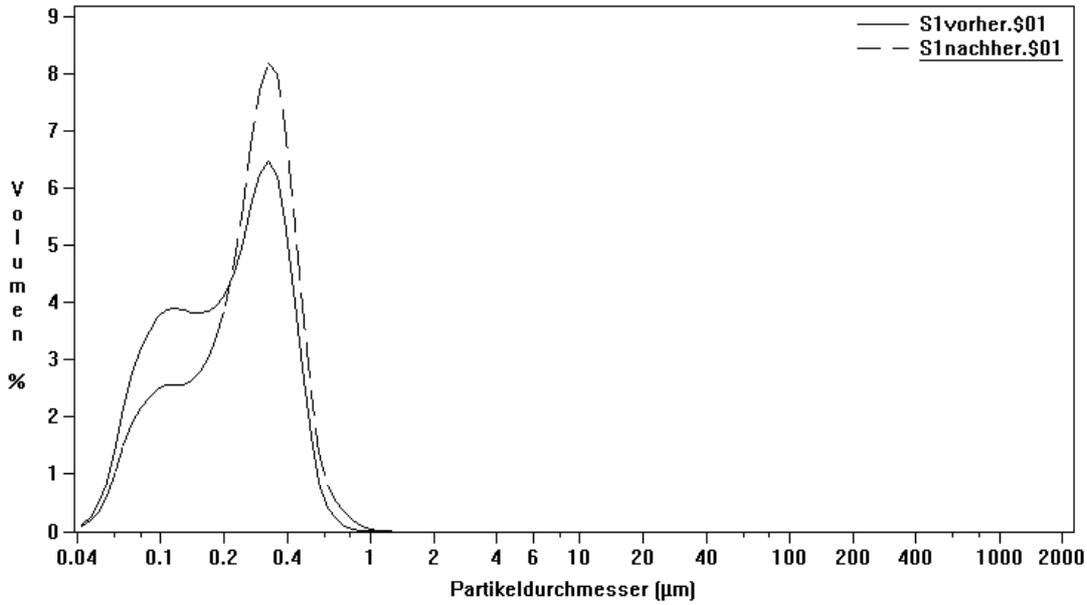


Abbildung 4.68: Laserdiffraktometrische Bestimmung der Partikelgrößen-Volumen-Verteilung von S1 (=Cp(2)Dotap) vor (S1vorher) und einen Tag nach (S1nachher) der Dampfsterilisation

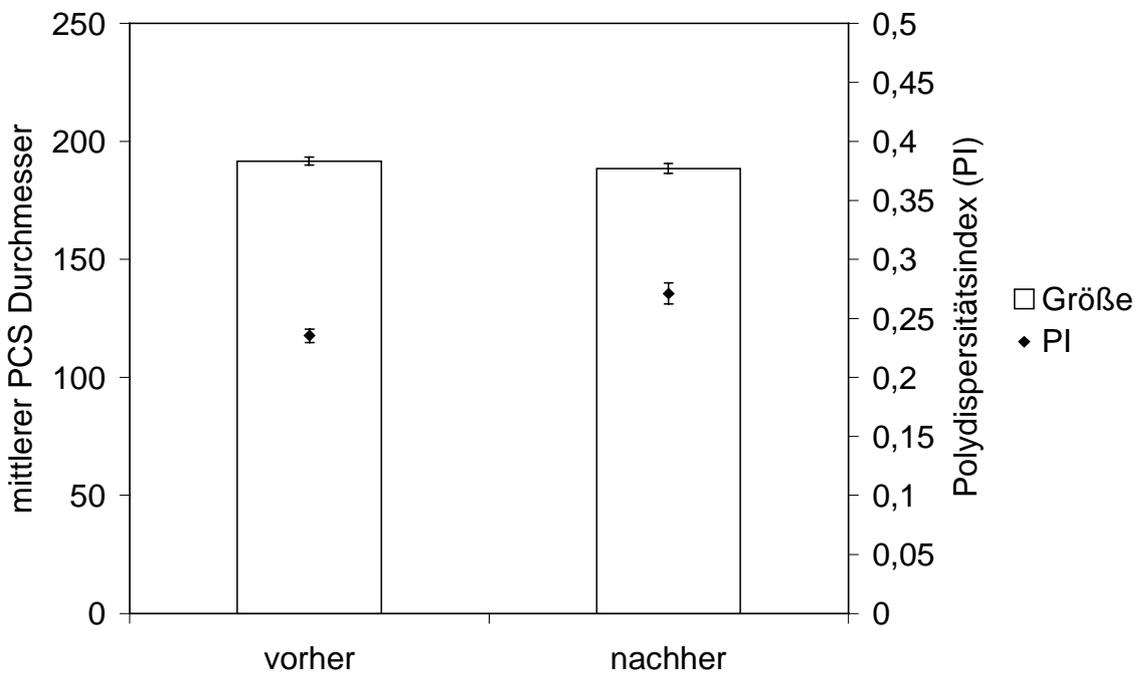


Abbildung 4.69: Mittlerer PCS-Durchmesser (nm) und Polydispersitätsindex der Formulierung Lab40 Cp0,5 am Tag vor und einen Tag nach der Dampfsterilisation

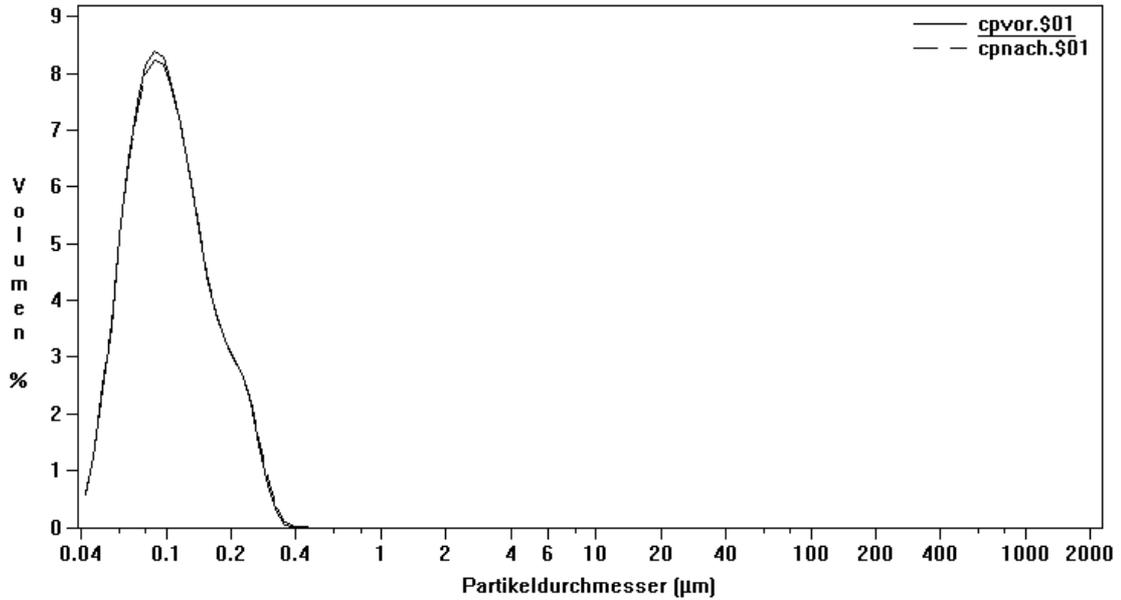


Abbildung 4.70: Laserdiffraktometrische Bestimmung der Partikelgrößen-Volumen-Verteilung von Lab40 Cp0,5 vor (cpvor) und einen Tag nach (cpnach) der Dampfsterilisation

Die Ergebnisse zeigten eine exzellente Stabilität der beiden Formulierungen auch nach der Dampfsterilisation. Die PCS-Durchmesser und PIs von S1 zeigten nach dem Autoklavieren sogar eine sehr geringe signifikante, praktisch aber irrelevante Abnahme der Partikelgröße. Die PIs unterschieden sich nicht signifikant. Bei Lab40 Cp0,5 nahm die Partikelgröße wiederum ganz leicht signifikant, aber praktisch irrelevant ab. Man erkannte nur eine leichte signifikante Zunahme des PI. Die LD-Messungen bestätigten Lab40 Cp0,5 allerdings eine nahezu unveränderte Partikelgrößenverteilung. Bei S1 erkannte man auch vor dem Autoklavieren zwei Partikelgrößensubpopulationen, die durch die Produktion am EmulsiFlex<sup>®</sup>-B3 bedingt waren. Nach dem Autoklavieren kam es nur zu einer leichten Zunahme bei den größeren Partikeln. Diese war aber nur bei der LD-Messung zu erkennen. Die beiden untersuchten Zubereitungen ließen sich problemlos Autoklavieren.

## 4.6 Steigerung der Transfektionseffizienz durch den Einsatz von Kernlokalisationssequenzen (NLS)

Kernlokalisationssequenzen (engl. nuclear localisation signals, NLS) sind Peptidsequenzen, die bestimmten Proteinen oder Nukleinsäuren den Transport in den Zellkern durch Interaktion mit Transportproteinen ermöglichen [Gorlich und Kutay 1999]. Der Transport zwischen Zellkern und Zytosol findet über die Zellkernporen statt. Die Kernporen bilden einen wassergefüllten Kanal. Kernporen, durch die Moleküle passiv diffundieren können, haben lediglich einen Durchmesser von 9 nm. Die Aufnahme durch passive Diffusion ist auf DNA-Fragmente von maximal 200 Basenpaaren und Proteine, die kleiner als 60 kDa sind, beschränkt [Ludtke et al. 1999]. Größere Moleküle werden durch einen aktiven und selektiven Mechanismus aufgenommen. Dafür bedarf es einer Kernlokalisationssequenz, die eine Bindung an die Kerntransporter induziert und die aktive Aufnahme ermöglicht [Keminer und Peters 1999]. Eine der größten Barrieren des nichtviralen Gentransfers stellt die Kernmembran dar. Der Transport der therapeutischen DNA vom Zytosol in den Kern wird als ein limitierender Schritt angesehen [Capecchi 1980, Escriou et al. 1998b]. Es läßt sich vermuten, daß Säugerzellen Mechanismen entwickelt haben, um die Aufnahme von Plasmid-DNA in den Kern zu unterbinden [Cartier und Reszka 2002]. Einzig Viren ist es möglich größere DNA-Fragmente effektiv in den Kern zu transportieren. Um diese Barriere zu überwinden, tendiert die Entwicklung nichtviraler Gentransferagenzien zu Multi-komponentensystemen. Diese bestehen aus polykationischen Molekülen oder kationischen Lipiden zur Kondensation der DNA kombiniert mit zusätzlichen Liganden wie zum Beispiel Kernlokalisationssequenzen [Cartier und Reszka 2002]. Diese Systeme werden als artifizielle virusähnliche Partikel (engl. artificial virus-like particles, AVPs) [Nahde et al. 2001] bezeichnet. Das arginin-reiche Motiv des HIV-1 TAT-Proteins (TAT-Sequenz, bestehend aus 11 Aminosäuren) ist eine Partikel- und Proteintransduktionsdomäne [Fawell et al. 1994, Lewin et al. 2000, Torchilin et al. 2001]. Neuerdings konnte auch gezeigt werden, daß die Kombination von nichtviralen Transfektionsagenzien (wie pEI, Dendrimeren oder Lipofectamin<sup>TM</sup>) mit der TAT-Sequenz zu einer erheblichen Steigerung der Transfektionseffizienz führt [Rudolph et al. 2002]. Dabei zeigte sich, daß die dimere TAT-Sequenz (TAT<sub>2</sub>) am effektivsten war. Dabei wurde das Plasmid mit einer zum vollständigen Ladungsausgleich unzureichenden Menge der kationischen TAT-Sequenz vorkomplexiert. Erst danach wurde die gewohnte Menge des Transfektionsagens zugesetzt.

Mit den folgenden Experimenten (Abbildung 4.71 und Abbildung 4.72) sollte untersucht werden, inwiefern sich die Gentransfereffizienz von kationischen SLN durch Kombination mit der TAT<sub>2</sub>-Sequenz steigern läßt. Die Transfektionsversuche wurden freundlicherweise von Dr. Carsten Rudolph am Dr. von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians Universität München durchgeführt. Die Versuche erfolgten wie unter 2.1.15.2 beschrieben an 16HBE14o-Zellen durchgeführt. Zur Herstellung der ternären Komplexe wurde zuerst das Plasmid mit der TAT<sub>2</sub>- Sequenz (Massenverhältnis DNA:TAT<sub>2</sub> = 1:0,65) oder poly-L-Arginin (Massenverhältnis DNA:pLA = 1:0,475) gemischt, 10 min inkubiert, die SLN-Verdünnung zugegeben und anschließend nochmals für 10 min inkubiert.

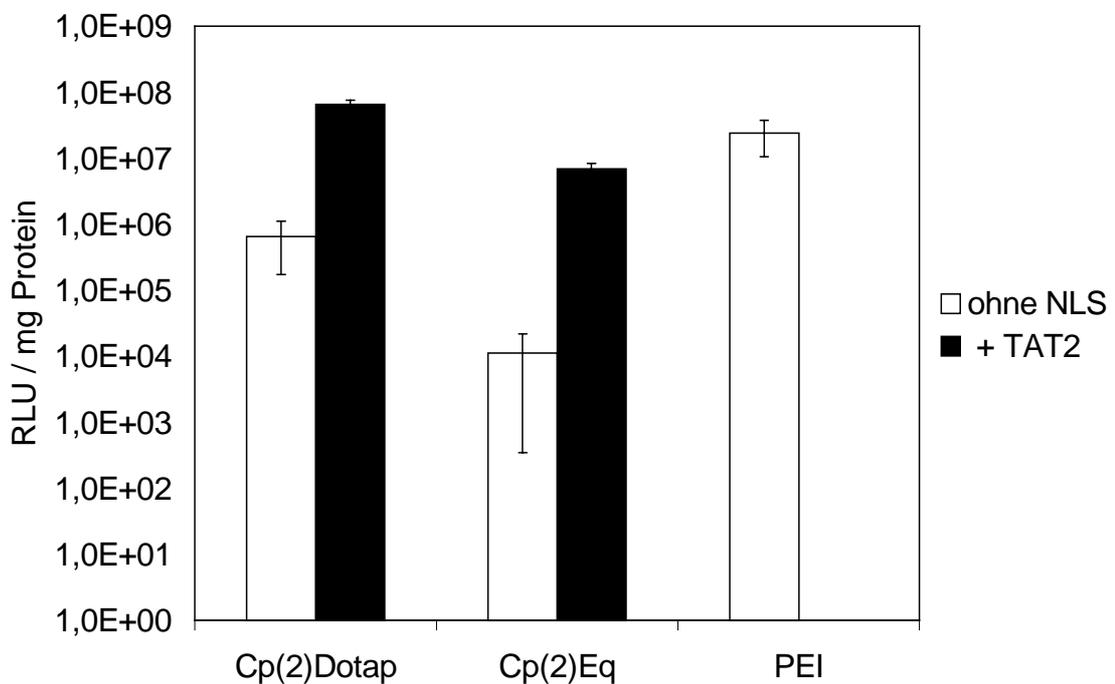


Abbildung 4.71: Vergleich der Transfektionseffizienz der einfachen Komplexe (ohne NLS) aus DNA und SLN (Cp(2)Dotap (=S1) oder Cp(2)Eq) mit der Effizienz der ternären Komplexe (+ TAT<sub>2</sub>) aus DNA, TAT<sub>2</sub> und SLN. Die Versuche wurden in reinem DMEM-Medium durchgeführt. Als Vergleich diente pEI. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert.

Auf Abbildung 4.71 erkennt man sehr gut, daß der Zusatz von TAT<sub>2</sub> eine sehr starke, signifikante Steigerung der Transfektionseffizienz von Cp(2)Dotap und Cp(2)Eq induzierte. Bei diesem Versuch wurden die SLN-Formulierungen Cp(2)Dotap und Cp(2)Eq mit pEI verglichen. In den vorausgegangenen Versuchen, hatte sich bereits gezeigt, daß die Transfektionseffizienz von Cp(2)Dotap gegenüber Cp(2)Eq um mindestens eine Zehnerpotenz erhöht ist. Diese Überlegenheit von Cp(2)Dotap zeigte sich auch bei diesem Versuch und betrug fast sogar zwei Zehnerpotenzen. pEI ohne CQ transfezierte besser als Cp(2)Dotap.

Durch die Integration von TAT<sub>2</sub> in die Transfektionskomplexe wurde die Effizienz der beiden SLN stark gesteigert. Die Transfektionsaktivität von Cp(2)Dotap wurde etwa einhundertfach erhöht. Auch die Aktivität des weniger effizienten Cp(2)Eq konnte durch den Zusatz von TAT<sub>2</sub> signifikant (um etwa drei Zehnerpotenzen) gesteigert werden, doch war die Effizienz noch immer signifikant geringer als die von Cp(2)Dotap+TAT<sub>2</sub>. Cp(2)Dotap+TAT<sub>2</sub> war sogar leicht aber signifikant effizienter als pEI.

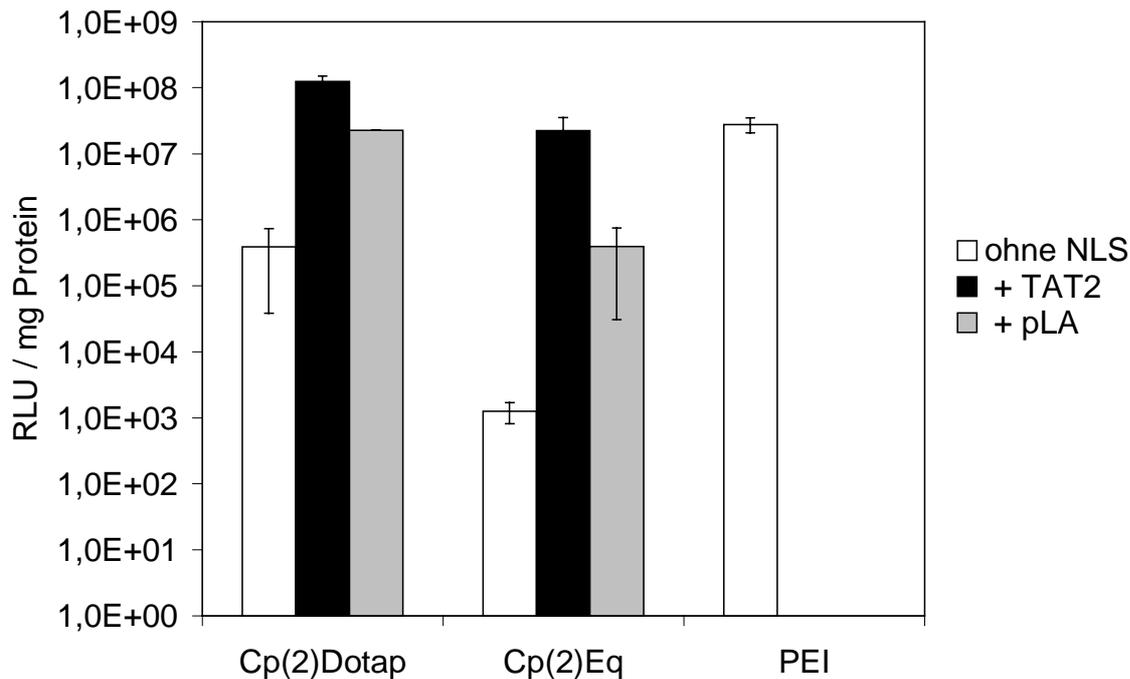


Abbildung 4.72: Vergleich der Transfektionseffizienz der einfachen Komplexe (ohne NLS) aus DNA und SLN (Cp(2)Dotap (=S1) oder Cp(2)Eq) mit der Effizienz der ternären Komplexe aus DNA, TAT<sub>2</sub> und SLN (+ TAT<sub>2</sub>) und der ternären Komplexe aus DNA, poly-L-Arginin (pLA) und SLN (+ pLA). Die Versuche wurden in reinem DMEM-Medium durchgeführt. Als Vergleich diente pEI. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert.

Auf Abbildung 4.72 ist die Wiederholung des vorherigen Versuches dargestellt. Zusätzlich wurden hier ternäre Komplexe aus DNA, poly-L-Arginin (pLA) und SLN getestet. TAT<sub>2</sub> ist ein stark arginin-reiches Peptid. Wegen dieser Struktur analogie des pLA zu TAT<sub>2</sub> sollte untersucht werden, ob sich auch durch ternäre Komplexe mit pLA eine Steigerung der Transfektionseffizienz erzielen lässt. Wie man sieht, war die starke Effizienzerhöhung der Transfektion durch den Zusatz von TAT<sub>2</sub> reproduzierbar. Cp(2)Dotap mit TAT<sub>2</sub> war sogar fast um eine Zehnerpotenz besser als pEI. Die Zugabe von pLA führte allerdings ebenfalls zu einer beachtlichen signifikanten Steigerung der Effizienz. Die Aktivitätszunahme war

geringer ausgeprägt als bei TAT<sub>2</sub>, doch scheint der pLA-Zusatz eine gute und preisgünstige Alternative zum Einsatz des relativ zytotoxischen Chloroquins darzustellen.

In einem weiteren Experiment sollte der Effekt von TAT<sub>2</sub> auf die Transfektion mit Liposomen untersucht und mit SLN verglichen werden (Abbildung 4.73 und Abbildung 4.74). Bei der Transfektion mit den einfachen Komplexen (Kapitel 4.4) konnte kein praktisch relevanter Unterschied zwischen der Performance der SLN-Zubereitung Cp(2)Dotap (=S1) und der liposomalen Formulierung L1 (analog zu S1 zusammengesetzt nur ohne Matrixlipid) gefunden werden.

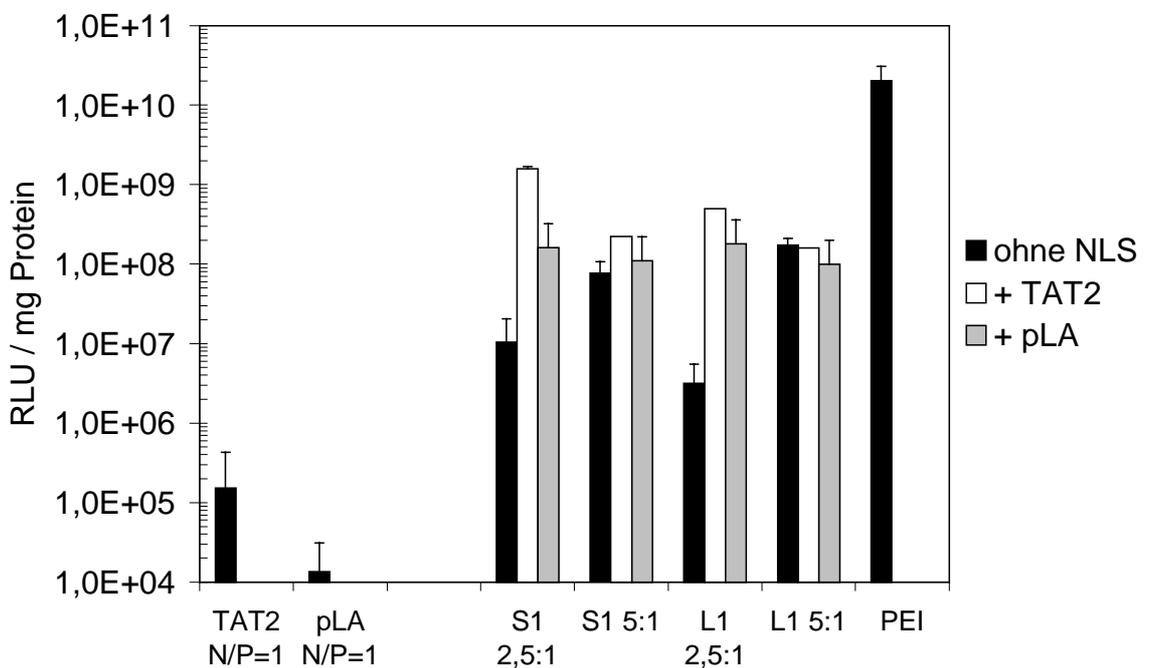


Abbildung 4.73: Vergleich der Transfektionseffizienz von SLN (S1) und Liposomen (L1) ohne Zusatz von TAT<sub>2</sub> (ohne NLS), unter Zusatz von TAT<sub>2</sub> (+TAT<sub>2</sub>) oder unter Zusatz von poly-L-Arginin (+ pLA). Als Vergleiche dienen die einfachen Komplexe aus pEI+DNA (PEI) und TAT<sub>2</sub>+DNA (TAT<sub>2</sub>) und pLA+DNA (pLA). Auf der x-Achse ist neben dem Namen der Formulierung die N/P-ratio (für TAT bzw. pLA) oder das Massenverhältnis (m/m) von kationischen Lipid zu DNA angegeben. Die Versuche wurden in reinem DMEM-Medium durchgeführt. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert.

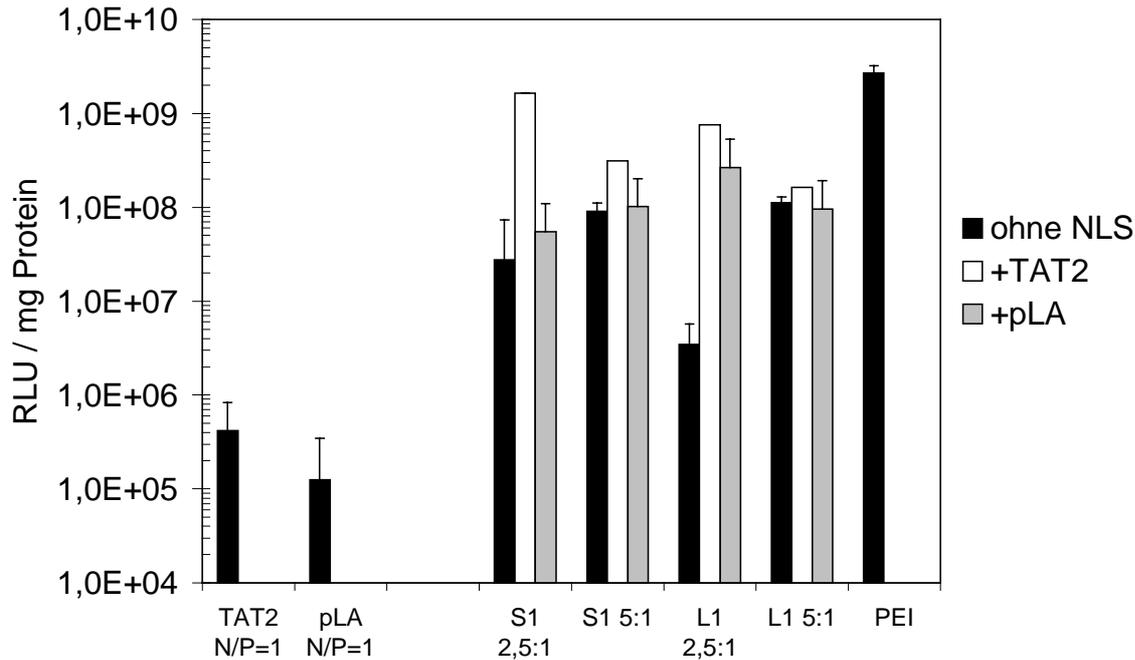


Abbildung 4.74: Wiederholung des vorherigen Versuchs. Vergleich der Transfektionseffizienz von SLN (S1) und Liposomen (L1) ohne Zusatz von TAT<sub>2</sub> (ohne NLS), unter Zusatz von TAT<sub>2</sub> (+TAT<sub>2</sub>) oder unter Zusatz von poly-L-Arginin (+ pLA). Als Vergleiche dienten die einfachen Komplexe aus pEI+DNA (PEI) und TAT<sub>2</sub>+DNA (TAT<sub>2</sub>) und pLA+DNA (pLA). Auf der x-Achse ist neben dem Namen der Formulierung die N/P-ratio (für TAT bzw. pLA) oder das Massenverhältnis (m/m) von kationischen Lipid zu DNA angegeben. Die Versuche wurden in reinem DMEM-Medium durchgeführt. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert.

Als Vergleiche wurden die Komplexe aus DNA und TAT<sub>2</sub> oder pLA im selben Verhältnis, wie sie auch zur Effektivitätssteigerung von SLN oder Liposomen verwendet werden, eingesetzt. Diese vermittelten zwar auch eine Transfektion, doch war diese um etwa zwei Zehnerpotenzen schwächer als z. B. die von S1. Wurden aber ternäre Komplexe aus DNA, TAT<sub>2</sub> und S1 oder L1 eingesetzt so war die Transfektionseffizienz wie schon in den vorherigen Versuchen erheblich gesteigert (um etwa den Faktor 100). Die Zugabe von pLA induzierte ebenfalls wieder eine Steigerung, die aber nicht so intensiv war (nur etwa 10-fach), wie die durch TAT<sub>2</sub>. Interessanterweise hing das Vermögen zur Transfektionssteigerung von TAT<sub>2</sub> und pLA stark von der eingesetzten Menge des kationischen Lipids ab. Bei einer Steigerung der Menge an kationischen Lipid (kationisches Lipid:DNA von 2,5:1 auf 5:1) erhöhte sich zwar die Effizienz der Transfektionsagenzien alleine, doch der steigernde Effekt von TAT<sub>2</sub> oder pLA ging merklich zurück. Ein Grund dafür könnte die Konkurrenz des kationischen Lipid mit dem kationischen TAT<sub>2</sub> bzw. pLA um die Bindung zur anionischen DNA sein. Bei einem Überangebot an kationischen Lipid wird das TAT<sub>2</sub> oder pLA

von der DNA verdrängt. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, daß bei einem kationischen Lipid:DNA-Verhältnis von 5:1 das Verhältnis von positiver zu negativer Ladung im Komplex ideal ist. Wird aber noch TAT<sub>2</sub> bzw. pLA zugegeben steigt der Anteil der positiven Ladungen im Komplex auf einen für die Transfektion ungünstigen Wert. Für diese These spricht, daß die Transfektionseffizienz von S1 bei kationischen Lipid:DNA-Verhältnissen von 7,5:1 und 10:1 auch geringer ist als bei 2,5:1 oder 5:1 (vgl. 4.2.3.2 und 4.3.4.1).

Durch die Bildung von ternären Komplexen aus DNA, TAT<sub>2</sub> oder pLA und SLN ließ sich die Effizienz der Transfektion mit SLN beachtlich steigern. TAT<sub>2</sub> induzierte eine Zunahme der Effizienz um etwa das 100-fache und das kommerziell erhältliche pLA um etwa das 10-fache. Beides geschah ohne eine merkliche Minderung der Verträglichkeit. Mit diesen beiden Verfahren kann auf den Zusatz des relativ zytotoxischen Chloroquins verzichtet und die Transfektionseffizienz sogar noch stärker erhöht werden. S1+TAT<sub>2</sub> zeigte eine beachtliche Effizienz.