

Entwicklung und Charakterisierung Triterpensaponin-optimierter Gentransfer-Systeme

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hardy Mitdank

2023

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01.10.2018 bis 27.02.2023 unter der Leitung von PD Dr. Alexander Weng am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Erster Gutachter: PD. Dr. Alexander Weng

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. Matthias F. Melzig

Datum der Disputation: 10.07.2023

Selbstständigkeitserklärung

Hierdurch versichere ich, dass ich meine Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Dissertation wurde nicht bereits in einem anderen Promotionsverfahren eingereicht.

.....

Datum

.....

Originalunterschrift

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Zusammenfassung.....	XI
Summary	XII
1 Einleitung.....	1
1.1 Gentherapeutika in der Evolution der Arzneistoffe.....	1
1.2 Gentransfer-Systeme	4
1.3 Transfektionsmethoden	7
1.4 Saponine als Transfektionsverstärker.....	15
1.5 Innovative Plasmid-DNA	18
1.6 Zielstellung.....	20
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Material	22
2.1.1 Geräte	22
2.1.2 Verbrauchsmaterial/Chemikalien	25
2.3 Methoden.....	32
2.3.1 Herstellung von Minicircle-DNA.....	32
2.3.1.1 Klonierung der RIP-Gene	33
2.3.1.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	38
2.3.1.3 DNA-Gelextraktion	38
2.3.1.4 Zwischenklonierung in pJET-Vektor.....	38
2.3.1.5 Plasmidpräparation	40
2.3.1.6 Glycerol-Stocks	40
2.3.1.7 Sequenzierung.....	41
2.3.1.8 Restriktionsverdau.....	41
2.3.1.9 Ligation der Inserts in MN501A1 und Transformation von <i>E. coli</i> Dh5 α	42
2.3.1.10 MC-Produktion mit dem „MC-Easy Minicircle DNA Production Kit“ von SBI	43
2.3.1.11 MC-Produktion ohne Kit.....	44
2.3.2 Zielgerichtete Nanoplexe mit Suizid-Nanoplasmiden.....	46
2.3.3 Nanopartikuläre DNA-Formulierungen	47
2.3.3.1 Polyplexe/Nanoplexe (PD).....	47
2.3.3.2 Lipoplexe (LD)	47

2.3.3.3	Lipid-Nanopartikel (LNP)	48
2.3.4	Partikelcharakterisierung.....	52
2.3.4.1	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	52
2.3.4.2	Agarosegel-Retentions-Assay	52
2.3.4.3	DLS/Zeta-Potential	52
2.3.5	DSC-Analyse von Modell-Liposomen	54
2.3.6	Transfektionsversuche in der Zellkultur.....	61
2.3.7	Suizid-Nanoplasmide zur Tumorthherapie im Tierversuch	63
2.3.8	Isolierung von AG1856.....	65
2.3.9	LC-Methoden & Massenspektrometrie	66
2.3.9.1	Analytische HPLC	66
2.3.9.2	Semipräparative HPLC	67
2.3.9.3	LC-ESI-MS.....	67
2.3.9.4	Q-TOF Direktinjektion.....	68
2.3.9.5	MALDI-MS.....	68
2.3.10	Synthese und Isolierung von Lipid-Linker-AG1856 Konjugaten	69
2.3.10.1	Synthese & Isolierung der Lipid-Linker Konjugate.....	71
2.3.10.2	Synthese & Isolierung der Lipid-Linker-AG1856 Konjugate.....	74
2.3.10.3	Bestätigung korrekter Konjugate durch Massenspektrometrie	75
3	Ergebnisse.....	76
3.1	Minicircle-Herstellung	76
3.1.1	Klonierungs-PCR	76
3.1.2	DNA-Extraktion.....	76
3.1.3	Zwischenklonierung in pJET-Vektor	77
3.1.4	Restriktionsverdau & Gelextraktion.....	78
3.1.5	Ligation in MN501A1 & Transformation von <i>E. coli</i> Dh5 α	79
3.1.6	MC-Produktion mit Kit	80
3.1.7	MC-Produktion ohne Kit.....	82
3.1.8	Wirksamkeit der Minicircle in der Zellkultur.....	86
3.2	Nanoplasmide – Tumorthherapie mit Suizidgenen	86
3.2.1	Partikelcharakterisierung.....	86
3.2.2	In-vitro-Wirksamkeit der Nanoplasmide.....	88
3.2.3	In-vivo-Wirksamkeit von Suizid-Nanoplasmiden.....	89
3.3	Isolierung des Saponins AG1856	97
3.3.1	Analyse des Rohextrakts	97
3.3.2	Größenausschlusschromatographie (SEC)	98
3.3.3	Finaler Schritt – Semipräparative HPLC.....	101
3.3.4	Kalkulation der Ausbeute an AG1856	104

3.4	Stabilität von AG1856.....	105
3.4.1	Lagerstabilität von AG1856.....	105
3.4.2	Stabilität von AG1856 in Abhängigkeit von pH-Wert und Temperatur	106
3.5	DSC-Analyse von Modell-Liposomen.....	108
3.6	Synthese und Isolierung der Lipid-KMUH-AG1856 Konjugate	115
3.6.1	Festphasenextraktion zur Isolierung der Lipid-Linker Konjugate.....	115
3.6.1.1	DC mit SPE-Fractionen der Synthese von DSPE-S-KMUH (DSK)	115
3.6.1.2	DC mit SPE-Fractionen der Synthese von DSPE-PEG-S-KMUH (DPSK).....	117
3.6.2	Synthese der Lipid-Linker-AG1856 Konjugate (DSKA bzw. DPSKA)	118
3.6.3	Festphasenextraktion zur Isolierung der Lipid-Linker-Saponin Konjugate	121
3.6.3.1	DC mit SPE-Fractionen der Synthese von DSPE-S-KMUH-AG1856 (DSKA)	121
3.6.3.2	DC mit SPE-Fractionen der Synthese von DSPE-PEG-S-KMUH-AG1856 (DPSKA)	122
3.6.4	Analyse der isolierten Konjugate mittels Massenspektrometrie.....	124
3.6.4.1	LC-ESI-MS mit DSKA.....	124
3.6.4.2	Q-TOF-MS Direktinjektion	124
3.6.4.3	MALDI-MS mit DSKA und DPSKA	125
3.7	Integration von AG1856 oder Lipid-AG1856-Konjugat in Lipid-DNA-Partikel	131
3.7.1	Einfluss von AG1856 auf Lipoplexe.....	131
3.7.2	Lipoplexe aus DOTAP/Konjugat-Liposomen.....	134
3.7.3	Einfluss von AG1856 und Lipid-AG1856-Konjugaten auf LNP	139
3.8	Konjugat-Stabilität	141
4	Diskussion	143
	Publikationsverzeichnis	154
	Lebenslauf.....	155
	Danksagung.....	156
	Literaturverzeichnis.....	157
	Abbildungsverzeichnis	167
	Tabellenverzeichnis	171
	Anhang	173

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AEC	„anion-exchange chromatography“ (dt. Anionenaustauschchromatographie)
ANOVA	„analysis of variance“ (dt. Varianzanalyse)
BLI	„bioluminescence imaging“ (dt. Biolumineszenz-Bildgebung)
(k)bp	„(kilo)base pair/s“ (dt. (kilo)Basenpaar/e)
CAR	„chimeric antigen receptor“ (dt. chimärer Antigenrezeptor)
Cas9	CRISPR-assoziierte Endonuklease 9
CCR5	C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5 (Synonym: CD195)
CHCl ₃	Chloroform
CpG	CpG-Dinukleotid (Cytosin mit Guanin über Phosphat verbunden)
CRISPR	„clustered regularly interspaced short palindromic repeats“
DC	Dünnschichtchromatographie
D _H	Hydrodynamischer Durchmesser
2,5-DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DLS	„dynamic light scattering“ (dt. Dynamische Lichtstreuung)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSC	„differential scanning calorimetry“ (dt. Dynamische Differenzkalorimetrie)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	„epidermal growth factor“ (dt. epidermaler Wachstumsfaktor)
eGFP	„enhanced green fluorescent protein“ (dt. verstärktes grün-fluoreszierendes Protein)
EMA	„European Medicines Agency“ (Europäische Arzneimittelagentur)
ESI	„electrospray ionization“ (dt. Elektrospray-Ionisation)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EtOH abs.	absolutes (nahezu 100%iges) Ethanol
FA	„formic acid“ (dt. Ameisensäure)
FDA	„U.S. Food and Drug Administration“ (US-amerikanische Arzneimittelbehörde)
GOI	„gene of interest“ (dt. das interessierende/gewünschte Gen)
GSK	GlaxoSmithKline
H ₂ O	Wasser
HCCA	α-Cyano-4-hydroxymizsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humane Leukozyten-Antigene
I.D.	„inner diameter“ (dt. innerer Durchmesser)
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
LB	„lysogeny broth“ (dt. lysogene Brühe, Komplexmedium zur Kultur von Bakterien)
LC	„liquid chromatography“ (dt. Flüssigkeitschromatographie)
LD	Lipoplexe
LDL	„low density lipoprotein“ (dt. Lipoprotein niedriger Dichte)
LM	Lösungsmittel
LNP	„lipid nanoparticles“ (dt. Lipid-Nanopartikel)
LPP	Lipopolyplexe
MALDI	„matrix assisted laser desorption/ionization“ (dt. Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation)
MC	Minicircle
MCS	„multiple cloning site“ (dt. Polylinker)

MeOH	Methanol
MLV	„multilamellar vesicles“ (dt. mehrschichtige Vesikel)
MS	Massenspektrometrie
MW	(Arithmetischer) Mittelwert
MWCO	„molecular weight cut-off“ (dt. Molekulargewichts-Ausschlussgrenze)
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NEB	New England Biolabs
OD ₆₀₀	Optische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm
org.	organisch(es)
ORI	„origin of replication“ (dt. Replikationsursprung)
PBS	„phosphate buffered saline“ (dt. phosphatgepufferte Salzlösung)
PC	Phosphatidylcholin
PCR	„polymerase chain reaction“ (dt. Polymerase-Kettenreaktion)
PD	Polyplexe
PEG	Polyethylenglykol
PDI	Polydispersitätsindex
pH	„potentia hydrogenii“ (dt. Kraft des Wasserstoffs)
PV	Probenvolumen
Q-TOF	Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometer
REM	Rasterelektronenmikroskopie
REN	Restriktionsendonuklease
RIP	Ribosomen-inaktivierendes Protein
rpm	„revolutions per minute“ (dt. Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
s.c.	subcutan
SA	Sinapinsäure
SCID	„severe combined immunodeficiency“ (dt. schwere kombinierte Immundefizienz)
SD	„standard deviation“ (dt. Standardabweichung)
SEC	„size-exclusion chromatography“ (dt. Größenausschlusschromatographie)
siRNA	„small interfering RNA“ (dt. kleine interferierende RNA)
SOB	„super optimal broth“ (komplexes Nährmedium, zur Transformation verwendet)
SOC	SOB-Medium mit Glucose
SPE	„solid phase extraction“ (dt. Festphasenextraktion)
SUV	„small unilamellar vesicles“ (dt. kleine einschichtige Vesikel)
TA ₃₃	(33% ACN / 0.1% TFA)
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TB	„terrific broth“ (dt. großartige Brühe, reichhaltiges Medium für große Zelldichte)
TE	TRIS-EDTA
TEA	Triethylamin
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	„total ion current“ (dt. Gesamtionenstrom)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Syn. Trometamol)
ü. N.	über Nacht (ca. 16 h)
Z-Average	„Kumulantenmittel“ (mittlerer hydrodynamischer Partikeldurchmesser)

Zusammenfassung

Die Gentherapie ist eine Utopie in der Medizin, die langsam Einzug in die Wirklichkeit hält. Immer mehr Gentherapeutika werden mit Erfolg in klinischen Studien geprüft und auch zugelassen, v. a. zur Therapie von monogenetischen Krankheiten sowie Krebserkrankungen. In der Mehrzahl kommen virale Vektoren zum Einsatz, aber auch nicht-virale Gentransfer-Systeme haben ihre Vorzüge und sind gefragt. Bei ihnen gilt es, Nachteile durch eine Immunogenität der verwendeten Nukleinsäure sowie eine geringe Transfektionseffizienz durch fehlendes „Targeting“, rasche systemische Clearance und insbesondere geringe Freisetzung aus den Endosomen zu überwinden. Mit der Lipid-Nanopartikel-Technologie steht heute ein effektiver nicht-viraler Vektor für spezielle klinische Anwendungen zur Verfügung. Einer breiteren Verwendung steht jedoch weiterhin das Fehlen eines effektiven, adaptierbaren „Targetings“ sowie ein sehr geringer „Endosomal Escape“ entgegen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zum einen zwei innovative Formen von Plasmid-DNA untersucht, Minicircle und Nanoplasmide, wobei sich Nanoplasmide aus praktischen Gründen als geeigneter für die therapeutische Verwendung erwiesen. Zum anderen wurde das Ziel verfolgt, ein spezifisches bidesmosidisches Triterpensaponin (AG1856) aus *Agrostemma githago* L. als Verstärker des „Endosomal Escape“ in lipidbasierte Gentransfer-Systeme - Lipoplexe und Lipid-Nanopartikel - zu integrieren. Zu diesem Zweck wurden erfolgreich Lipid-AG1856-Konjugate hergestellt, die sich jedoch hinsichtlich der gewünschten Freisetzung des Saponins unter schwach sauren Bedingungen unerwartet stabil zeigten. DSC-Messungen von Modell-Liposomen bestätigten eine Integration von AG1856 in DPPC-Liposomen nur, wenn diese auch Cholesterol enthielten. Lipid-AG1856-Konjugat war in DPPC/DOTAP-Membranen integrierbar, während AG1856 scheinbar nur adsorbiert wurde.

Sowohl AG1856 als auch Lipid-AG1856-Konjugat störten die Formulierung von Lipoplexen und Lipid-Nanopartikeln und senkten deren Transfektionseffizienz z. T. erheblich. Bei Lipid-Nanopartikeln scheint die Adsorption des Saponins deren Endozytose zu blockieren. Nur reine DOTAP-Lipoplexe zeigten nach Zugabe von AG1856 verbesserte Partikelparameter und gesteigerte Transfektionseffizienz *in vitro*. Inwieweit die bloße Adsorption von AG1856 an DOTAP-Lipoplexe unter physiologischen Bedingungen erhalten bleibt, und ob sie schließlich ausreicht, um die Transfektionseffizienz zu steigern, ist es wert, eingehender untersucht zu werden. Eine Integration von Lipid-Saponin-Konjugat in Lipid-Nanopartikel funktioniert nicht. Ihre Lipid-Komposition ist bereits komplex und die Interaktion zwischen den Lipiden und dem ebenfalls amphiphilen Saponin stört die Partikelassemblierung. Sinnvoller erscheint für die Zukunft der Versuch, das Saponin durch Konjugation in hydrophile Gentransfer-Systeme zu integrieren, beispielsweise basierend auf Polylysin, PAMAM oder Chitosan.

Summary

Gene therapy is a utopia in medicine that is slowly becoming reality. More and more gene therapy drugs are being successfully tested in clinical trials and are also being approved, especially for the treatment of monogenetic diseases and cancer. Viral vectors are used in the majority of cases, but non-viral gene delivery systems also have their advantages and are in demand. Their disadvantages like immunogenicity of the nucleic acid used and low transfection efficiency due to lack of targeting, rapid systemic clearance and especially low release from the endosomes need to be overcome. With lipid nanoparticle technology, an effective non-viral vector is now available for specific clinical applications. However, the lack of an effective and adaptable "targeting" and a very low "endosomal escape" still stand in the way of a broader use.

In the present work, two innovative forms of plasmid DNA were investigated, Minicircle and Nanoplasmids, whereby Nanoplasmids are more suitable for therapeutic use for practical reasons. Secondly, the aim was to integrate a specific bidesmosidic triterpene saponin (AG1856) from *Agrostemma githago* L. as an enhancer of "endosomal escape" into lipid-based gene delivery systems (lipoplexes and lipid nanoparticles). To this end, lipid-AG1856 conjugates were successfully prepared, but were unexpectedly stable with respect to the desired release of the saponin under weak acidic conditions. DSC measurements of model liposomes confirmed an integration of AG1856 in DPPC liposomes only if they also contained cholesterol. Lipid-AG1856 conjugate was integrable into DPPC/DOTAP membranes, whereas AG1856 appeared to be adsorbed only.

Both AG1856 and lipid-AG1856 conjugate interfered with the formulation of lipoplexes and lipid nanoparticles and in some cases significantly reduced their transfection efficiency. In lipid nanoparticles, the adsorption of saponin seems to block their endocytosis. Only pure DOTAP lipoplexes showed improved particle parameters and increased transfection efficiency *in vitro* after addition of AG1856. The extent to which the mere adsorption of AG1856 to DOTAP lipoplexes is maintained under physiological conditions, and whether it is ultimately sufficient to enhance transfection efficiency, is worthy of further investigation. Integration of lipid-saponin conjugate into lipid nanoparticles does not work. Their lipid composition is already complex and the interaction between the lipids and the also amphiphilic saponin interferes with particle assembly. It seems more sensible for the future to try to integrate the saponin into hydrophilic gene transfer systems by conjugation, for example based on polylysine, PAMAM or chitosan.

1 Einleitung

1.1 Genterapeutika in der Evolution der Arzneistoffe

„Small Molecules“

Auf dem Fachgebiet der Pharmazie wird seit jeher die Natur zum Vorbild genommen. So ist ein Großteil der klassischen chemisch/synthetischen Arzneistoffe („Small Molecules“) von Pflanzeninhaltsstoffen abgeleitet. Unter diesen nach Leitstrukturen zu suchen ist erfolgversprechend, weil wir Menschen als Folge der Co-Evolution von Pflanzen und Tieren häufig sowohl über passende Zielstrukturen (v. a. Rezeptoren und Enzyme) für einen pharmakologischen Effekt als auch über einen kompatiblen Metabolismus verfügen. Darüber hinaus ist die strukturelle Vielfalt unter den Naturstoffen verbunden mit einer teilweise großen Komplexität (z. B. durch diverse Zucker in einem Molekül) unübertroffen. Auch von Substanzen mikrobiologischen (v. a. fungalen und bakteriellen) sowie tierischen Ursprungs wurden zahlreiche Wirkstoffe (z. B. Penicillin, Lovastatin oder Captopril) abgeleitet. „Small Molecules“ werden i. d. R. peroral appliziert und müssen, zumindest bei chronischen Leiden, regelmäßig und fortlaufend eingenommen werden. Meist beeinflussen sie nur die Symptome einer Krankheit, weniger deren Ursache.

„Biologicals“

Tiefergehende Erkenntnisse über die Ätiologie von Krankheiten führten gemeinsam mit zeitgleich entwickelten neuen Fähigkeiten auf dem breiten Feld der Biotechnologie, das auch Molekularbiologie und Gentechnik umfasst, zur neuen Wirkstoffgruppe der „Biologicals“ bzw. Biopharmazeutika. Dabei handelt es sich um Wirkstoffe biologischen Ursprungs, v. a. Proteine, aber auch Nukleinsäuren. Angefangen mit der biotechnologischen Produktion von Humaninsulin seit den 1980er Jahren über die Herstellung rekombinanter Impfstoffe, Zytokine, Gerinnungsfaktoren, Enzyme und Hormone bis zur Entwicklung rekombinanter Antikörper gegen Autoimmun- und Krebserkrankungen wurden zahlreiche Krankheiten adressiert, die zuvor nur schlechter oder gar nicht therapiert werden konnten. Biologika müssen aufgrund ihrer Natur parenteral injiziert werden. Sie zeigen eine begrenzte chemisch-physikalische Stabilität und können biologische Membranen meist nicht überwinden [1]. Zudem ist ihre Herstellung hochkomplex und wesentlich aufwändiger (und teurer) als die der „kleinen Moleküle“ [2]. Es besteht außerdem die Gefahr von teils gefährlichen Immunreaktionen in Folge der Injektion therapeutischer Proteine [3]. Offensichtlich überwiegen aber die Vorteile bzw. Chancen und so liegt der Anteil der Biopharmazeutika, zu denen neben zahlreichen Proteinwirkstoffen auch Genterapeutika sowie die nicht als Genterapeutika definierten mRNA- und Vektorimpfstoffe zählen [4], an den neu zugelassenen Wirkstoffen in Deutschland seit 2015 jährlich bei ca. 40 % und es sind weiterhin zahlreiche Produkte in der Pipeline: 669 im Jahr 2021

(267 in Phase I, 271 in Phase II und 131 in Phase III), wovon 442 (66 %) auf rekombinante Antikörper entfielen sowie 45 (6,8 %) auf Gentherapeutika [5].

Im Jahr 2022 wurden in der EU vier neue Gentherapien als ATMP zugelassen, zwei CAR-T-Zelltherapien gegen Krebs (Breyanzi® und Carvykti®) und zwei Therapien für die Erbkrankheiten Hämophilie A (Roctavian®) und Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase-Mangel (Upstaza®) [6]. ATMP steht für „Arzneimittel für neuartige Therapien“ (Advanced Therapy Medicinal Products), die in der EU zentral auf Empfehlung der EMA zugelassen werden und neben Gentherapeutika auch somatische Zelltherapeutika sowie biotechnologisch bearbeitete Gewebeprodukte einschließen [7]. Ende 2022 waren in der EU insgesamt 13 Gentherapien zugelassen.

Gentherapeutika

Die weltweit erste Zulassung eines Gentherapie-Produkts erfolgte für Gendicine® (Shenzhen SiBiono GeneTech) 2003 in China zur Krebsbehandlung. Genutzt wird dabei ein onkolytisches rekombinantes Adenovirus zur Übertragung eines humanen p53-Gens. Das erste Gentherapie-Produkt in den „westlichen Staaten“ war Glybera® (UniQure), das 2012 auf Empfehlung der EMA zur Behandlung der Lipoprotein-Lipase-Defizienz (LPLD) zugelassen wurde [8]. Glybera® enthielt einen AAV1-Vektor mit einer humanen LPL-Variante, von dem viele Injektionen erforderlich waren [9]. Während europaweit nur max. 200 Patienten für eine Behandlung in Frage kamen und sich die Kosten einer Therapie auf ca. 1 Mio. Euro summierten [10], scheiterte Glybera® an mangelnder Bereitschaft zur Kostenübernahme vor dem Hintergrund begrenzter Wirksamkeit und wurde 2017 wieder vom Markt genommen.

Obwohl die Gentherapie insgesamt derzeit noch von geringer Bedeutung ist, kann sie dennoch als weitere Revolution auf dem Gebiet der Medizin angesehen werden, weil sie noch grundlegender auf die Ursachen von Krankheiten abzielt: dysfunktionale Gene. Diese sind für ca. 80 % der sogenannten „Seltene Erkrankungen“ verantwortlich. Eine seltene Erkrankung betrifft in der EU definitionsgemäß weniger als 5 von 10.000 Menschen. Bei einer Gesamtbevölkerung der EU von ca. 450 Mio. können so dennoch über 220.000 Menschen betroffen sein. Insgesamt sind in der EU bis zu 36 Mio. Menschen von seltenen Erkrankungen betroffen, von denen über 6.000 verschiedene bekannt sind [11]. Dies offenbart ein großes Potential für die Entwicklung entsprechender Gentherapeutika. Gleiches gilt für die anhaltend große Anzahl von Krebserkrankungen, für die ebenfalls in großem Maß gentherapeutische Behandlungen erforscht werden. Neben dem genauen Verständnis der genetischen Ursachen der Erkrankungen sind sowohl kreative Konzepte hinsichtlich der Art des gentherapeutischen Eingriffs als auch neue Technologien für den erfolgreichen Gentransfer in die zu behandelnden Zellen notwendig.

Grundsätzlich muss bei Gentherapie zwischen der Manipulation von Körperzellen (Somatische Gentherapie) und der von Geschlechtszellen (Keimbahntherapie) unterschieden werden. Letztere ist sowohl technisch als auch ethisch kompliziert, unter unvorhergesehenen Fehlern könnten auch alle Nachkommen leiden. Deswegen ist die Keimbahntherapie in Deutschland (gemäß § 5 des Embryonenschutzgesetzes) wie in den meisten anderen Ländern verboten. So führte die Erschaffung der ersten „CRISPR-Babys“ 2018 (Knock-out des CCR5-Gens in Zwillingsembryos mittels CRISPR/Cas 9 mit dem vorgeblichen Ziel der HIV-Prophylaxe) durch den chinesischen Forscher He Jiankui zu weltweiter Kritik aus der wissenschaftlichen Community [12]. In der vorliegenden Arbeit ist also stets von Somatischer Gentherapie die Rede.

Somatische Gentherapie

Die folgende Definition stammt von der Homepage des Paul-Ehrlich-Instituts: „Ein Gentherapeutikum ist ein biologisches Arzneimittel, dessen Wirkstoff eine Nukleinsäure (Träger der Erbinformationen) enthält oder daraus besteht. Es wird eingesetzt, um eine Nukleinsäuresequenz zu regulieren, zu reparieren, zu ersetzen, hinzuzufügen oder zu entfernen. Die therapeutische, prophylaktische oder diagnostische Wirkung steht in unmittelbarem Zusammenhang mit der rekombinanten Nukleinsäuresequenz, die es enthält oder mit dem Produkt, das auf Basis dieser genetischen Information gebildet wird.“ [13].

Den grundlegenden Nachweis für die Möglichkeit der Gentherapie erbrachten 1962 Waclaw und Elisabeth Szybalski mit ihrer Publikation über die genetische Modifizierung von Säugerzellen durch das Einbringen fremder DNA [14]. Die erste autorisierte Gentransfer-Studie fand 1989 am “National Institute of Health (NIH)” als Markerstudie statt, bei der tumorinfiltrierende T-Lymphozyten geerntet, mittels eines retroviralen Vektors markiert (Übertragung eines bakteriellen Neomycin-Resistenzgens) und reinfundiert wurden, um anschließend die Verteilung, das Überleben sowie die Fähigkeit dieser Zellen zu untersuchen, den Tumor aufzuspüren. Auf diese Weise wurde zum ersten Mal gezeigt, dass menschliche Zellen genetisch modifiziert und wieder in den Patienten injiziert werden können, ohne Schaden anzurichten [15, 16]. Bereits 1990 folgte eine erste Gentherapie-Studie zur Behandlung von ADA-SCID (Ursache der schweren kombinierten Immundefizienz (SCID) ist ein mutiertes Adenosin-Desaminase-Gen) [17]. Auch dabei wurden autologe periphere T-Lymphozyten mit einem gammaretroviralen Vektor transduziert und reinfundiert. In seiner weiterentwickelten Form ist das Produkt unter dem Namen Strimvelis® (GSK) seit 2016 in der EU zugelassen. Bis heute nutzen viele Therapiekonzepte die Möglichkeit, Zellen *ex vivo* einer Gentherapie zu unterziehen und sie anschließend zu reinfundieren (CAR-T- und Stammzelltherapien). Der alternative Ansatz ist, Zielzellen *in vivo* zu erreichen.

1.2 Gentransfer-Systeme

In jedem Fall, noch mehr jedoch bei einer *in vivo* Gentherapie, kommt dem verwendeten Gentransfer-System große Bedeutung zu, denn die effiziente „Lieferung“ (engl. Gene Delivery) der Nukleinsäure an ihren Wirkort (Zytosol bei RNA, Zellkern bei DNA) ist grundlegende Voraussetzung für die Wirksamkeit einer Gentherapie und beinhaltet eine stabile Transportform, effektive Endozytose (optimalerweise zielgerichtet), endosomale Freisetzung („Endosomal Escape“) und ggf. Translokation in den Kern. Für den Gentransfer kommen virale und nicht-virale Vektoren in Frage. Die Genübertragung durch Viren in ihre Zielzellen bezeichnet man als Transduktion, während der nicht-virale Gentransfer mit Hilfe geeigneter physikochemischer Verfahren als Transfektion bezeichnet wird.

Virale Vektoren

Viren sind perfekte natürliche Genfähren. Nachdem ihnen durch gentechnische Veränderungen ihre Pathogenität genommen wurde, können ihre spezifischen Mechanismen für Zelleintritt, „Endosomal Escape“ und ggf. Translokation der DNA in den Zellkern für einen effektiven Gentransfer genutzt werden. Beispielsweise vermittelt Hämagglutinin, ein Glykoprotein in der Hülle von Influenza A-Viren sowohl deren Bindung an sialinsäuretragende Glykoproteine auf der Oberfläche der Zielzellen und die darauffolgende Endozytose als auch die Freisetzung aus den Endosomen infolge der Wirkung als fusogenes Protein nach proteolytischer Spaltung und pH-Wert-bedingter Konformationsänderung [18]. Die bedeutendsten viralen Vektoren basieren auf Retroviren (Gammaretroviren, Lentiviren), Adenoviren sowie adeno-assoziierten Viren (AAV). Hinsichtlich der Expression von Transgenen, die mit Hilfe solcher Vektoren übertragen werden, muss grundsätzlich zwischen persistierend (durch stabile chromosomale Integration der DNA) und transient (durch Bildung eines Episoms) unterschieden werden. Bei einem Episom handelt es sich um extrachromosomale DNA, die normalerweise nicht während der Zellteilung repliziert wird. Entsprechend ist der therapeutische Effekt in diesem Fall von begrenzter Dauer (transient). Die Integration von Episomen, die z. B. infolge der Applikation von Adenovirus- oder AAV-Vektoren entstehen, in das Wirtsgenom ist selten, aber durch heterologe Rekombination möglich [19]. Adenoviren sind unbehüllte dsDNA-Viren und werden meist als nicht integrierende und nicht replizierende Vektoren konstruiert, z. B. im Covid-19-Impfstoff Vaxzevria® (AstraZeneca). AAV (ssDNA) heißen so, weil sie für ihre Vermehrung auf eine Co-Infektion der Wirtszelle mit Adenoviren angewiesen sind. Sie sind weder selbst-replizierend noch humanpathogen. Allerdings ist bei ihnen die mögliche Transgengröße auf < 5 kbp begrenzt [20]. Durch Nutzung verschiedener AAV-Varianten werden in klinischen Studien hauptsächlich Auge, Leber, Muskeln und ZNS adressiert [21]. Retroviren (ssRNA) zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, stabil in das Wirtsgenom zu integrieren, also zu persistieren. Interessanterweise wurden durch Infektionen der Keimbahn in vor-prähistorischer Zeit zahlreiche

Retroviren zu einem Teil des menschlichen Genoms (ca. 8 %) und werden seither (inzwischen stark verändert) als endogene Retroviren weitervererbt, die sowohl negative Auswirkungen haben als auch grundlegende Funktionen erfüllen können [22-24]. Die somatische Gentherapie mit retroviralen Vektoren ermöglicht theoretisch die Heilung einer Krankheit durch einmalige Applikation eines entsprechenden Gentherapeutikums. Bei Verwendung gammaretroviraler Vektoren kam es allerdings in der Nachbeobachtung früherer klinischer Studien zu Fällen von Kanzerogenese, die bis heute als Argument für Sicherheitsbedenken bei der Verwendung viraler (insbesondere retroviraler) Vektoren dienen, weshalb jene Fälle im Folgenden ausführlicher beschrieben werden.

Im Rahmen zweier vergleichbarer klinischer Studien in den Jahren 1999-2002 in Paris und darauffolgend in London wurden je 10 Jungen, die unter SCID-X1 (X-linked SCID) litten und für die kein passender Knochenmarkspender gefunden wurde mit gammaretroviralen Vektoren der ersten Generation (konventionelles amphotropes murines Leukämievirus (MLV) in Paris bzw. Gibbon-Affen-Leukämievirus (GALV) – pseudotypisiert in London [25]) behandelt. Damit wurden autologe hämatopoetische Stammzellen (CD34+) transduziert, um ein mutiertes Interleukin-Rezeptor- γ -Gen, welches für eine gemeinsame Kette mehrerer Interleukin-Rezeptoren kodiert, zu ersetzen. Dieses dysfunktionale Gen ist die Ursache für 50 % aller SCID-Erkrankungen. Es führt zum Funktionsverlust der Interleukin-Rezeptoren und dadurch zu einer Blockade der Entwicklung von T-Lymphozyten und NK-Zellen, was sowohl die zelluläre wie auch die humorale Immunantwort (fehlende T-Helferzellen) außer Gefecht setzt [26]. Die meisten Patienten zeigten eine langanhaltende Herstellung fehlender Immunfunktionen bei einer Gesamtüberlebensrate von 90 % (beide Studien zusammen) [27]. Allerdings entwickelten sechs Probanden (fünf in Paris, einer in London) 2-14 Jahre nach der Gentherapie eine T-Zell-Leukämie, die für einen davon tödlich ausging, während die anderen durch eine Chemotherapie gerettet werden und weiterhin von der durch die Therapie vermittelten Immunfunktion profitieren konnten. Als Ursache für die Leukämieentwicklung wird eine Aktivierung von Protoonkogenen infolge von Insertionsmutagenese durch die verwendeten Gammaretroviren angenommen [27]. Bei der Beurteilung dieser Studienergebnisse sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass Jungen mit SCID-X1 normalerweise in ihrem ersten Lebensjahr an Infektionen sterben. Die konventionelle Therapie ist die Knochenmarkspende. Bekanntlich ist es aber schwer, einen passenden Spender zu finden und die Mortalitätsrate beträgt min. 10 % bei einem HLA-identischen Spender aus der Familie und ca. 30 % bei einem nicht HLA-identischen Spender [28].

Den viralen Vektoren inhärent ist ihre Immunogenität, d.h. die mögliche Provokation von angeborener wie erworbener Immunantwort [29]. Bei wiederholter Gabe des gleichen Serotyps ist mit deutlich reduzierter Wirksamkeit infolge der Entwicklung einer sogenannten Vektorimmunität zu rechnen (z. B. Inaktivierung durch spezifische Antikörper). Ein trauriges Beispiel für eine fatale

Immunantwort auf einen überdosierten adenoviralen Vektor ist der Tod von Jesse Gelsinger 1999 im Rahmen einer klinischen Studie [30].

Gentherapie-Studien der letzten Jahre

In der Vergangenheit scheiterte die Mehrzahl der klinischen Studien zu Gentherapien daran, dass eine unzureichende Anzahl von Zellen modifiziert wurde, um einen therapeutischen Effekt zu erreichen [15]. Erst in den letzten Jahren gibt es zunehmend erfolgreiche klinische Studien und Zulassungen von Gentherapien, insbesondere zur Behandlung von Krebserkrankungen und monogenetischen Erkrankungen. Die meisten Gentherapie-Studien finden in den USA und China statt (2010-2020: 53 % (n=811) in den USA, 24 % (n=437) in China) [31].

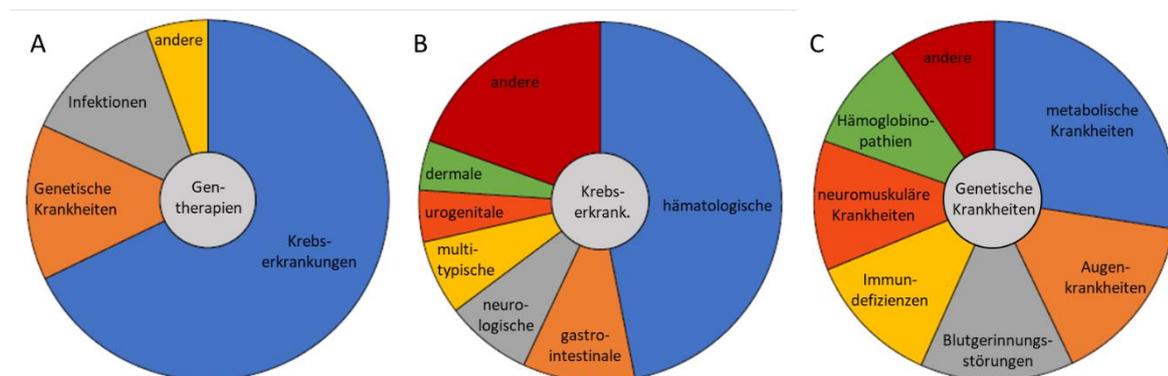


Abb. 1 Klinische Studien mit Gentherapien von 2010-2020

A) nach Hauptindikation; B) Gentherapien für Krebserkrankungen nach Typ der Krebserkrankung; C) Gentherapien für genetische Krankheiten nach Krankheitscluster Anzahl der ausgewerteten Studien in jeder Kategorie: 2010 (78), 2011 (80), 2012 (80), 2013 (87), 2014 (99), 2015 (149), 2016 (165), 2017 (235), 2018 (270), 2019 (1186), 10 Monate von 2020 (289), Krebs (1087), genetische Krankheiten (283) und Infektionen (244). *

Nicht-virale Gentransfer-Systeme

Auch auf dem Gebiet der nicht-viralen Gentransfer-Systeme, die über chemische Transfektionsmethoden funktionieren, wurde unermüdlich weitergeforscht, um die im Vergleich zu viralen Vektoren niedrigere Wirksamkeit zu erhöhen. Insbesondere Polyplexe und Lipoplexe stehen dabei im Fokus. Ein großer Fortschritt ist mit der Entwicklung der Lipid-Nanopartikel (LNP)-Technologie gelungen, die heute in mRNA-Impfstoffen und RNA-Therapeutika Verwendung findet, jedoch ebenso mit Plasmid-DNA durchführbar ist [32, 33].

Nicht-virale Vektoren, z. B. LNP mit mRNA oder Plasmid-DNA führen zu transienter Expression, die nicht nur bei der Anwendung von Impfstoffen und Oligonukleotiden gewünscht ist. Unter anderem bei der Erzeugung induzierter pluripotenter Stammzellen (iPSC) und der Steuerung ihrer Differenzierung ist eine transiente Expression der kodierten Transkriptionsfaktoren sowie die Vermeidung einer Insertionsmutagenese durch die Verwendung von mRNA [34] oder Minicircle-

DNA [35] (anstelle von viralen Vektoren) vorteilhaft, gleiches gilt in Bezug auf zukünftige Anwendungen der CRISPR/Cas9-Technologie oder anderer Endonukleasen. In 30 % der zwischen 2010 und 2020 durchgeführten Gentherapie-Studien wurden nicht-virale Vektoren verwendet.

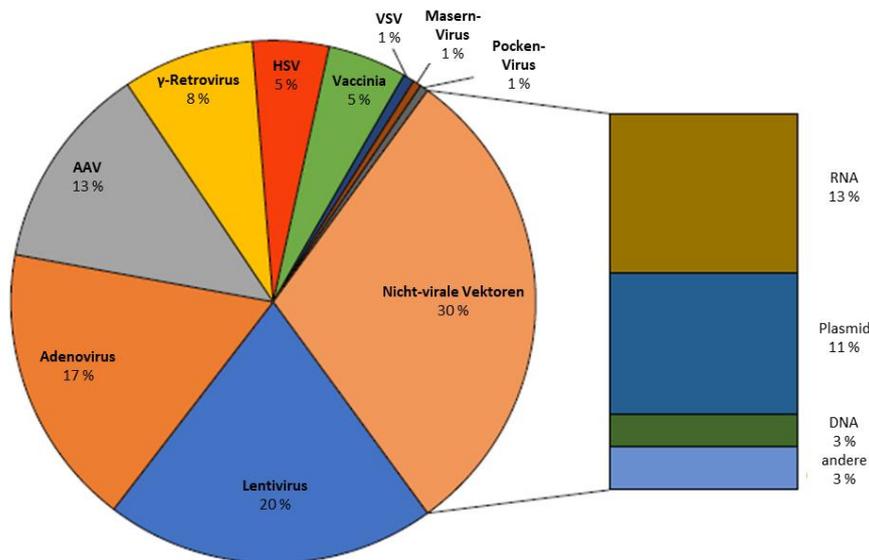


Abb. 2 In Gentherapie-Studien verwendete Vektoren (2010-2020)

Anteilig nach Art der viralen und nicht-viralen Vektoren. HSV=Herpes-simplex-Virus, VSV=Vesicular Stomatitis Indiana Virus. *

*Abbildungen 1 und 2 übernommen (modifiziert) von Arabi et al. [31].

1.3 Transfektionsmethoden

Nicht-virale Vektoren sind i. d. R. auf physikochemische Transfektionsmethoden angewiesen. Nukleinsäuren sind im Vergleich zu klassischen Arzneistoffen riesige Moleküle, die zudem hydrophil und vielfach negativ geladen sind. Sie können i. d. R. keine Zellmembranen überwinden. Außerdem sind sie biologisch instabil. Physikalische Methoden wie Mikroinjektion, „Genkanone“, Elektroporation u. a. sind nur sehr eingeschränkt oder gar nicht *in vivo* anwendbar [36].

Die erfolgreichste Strategie besteht in der Formulierung selbst assemblierender positiv geladener Nanopartikel durch Komplexierung (und gleichzeitig Kondensierung) der polyanionischen Nukleinsäuremoleküle durch polykationische Polymere (zu Polyplexen/ Nanoplexen) oder durch präformulierte kationische Liposomen (zu Lipoplexen). Auch Mischformen, sogenannte Lipopolyplexe, sind möglich. Ausgehend von Lipoplexen wurde über experimentelle Methoden zur Erzeugung liposomal verpackter DNA wie der „Detergenz-Dialyse unter Verwendung von Octylglucopyranosid (OGP)“ oder „Ethanol-destabilisierte kationische Liposomen“ die Lipid-Nanopartikel-Technologie entwickelt [37].

Die erste Publikation zur verstärkten Transfektion durch Poliovirus-RNA in Anwesenheit von DEAE-Dextran (Diethylaminoethyl-Dextran) stammt von Vaheri und Pagano aus dem Jahr 1965 [38]. Polylysin ist eines mehrerer basischer Polypeptide, das sich zur Formulierung von Polyplexen eignet. Auch Chitosan (Poly-D-Glucosamin), das durch Deacetylierung aus Chitin (Poly(N-Acetyl-1,4- β -D-Glucosamin) gewonnen wird, kann für die Komplexierung von Nukleinsäuren zur Transfektion eingesetzt werden [39].

Die größte Einschränkung für den effektiven Gentransfer mittels der genannten Polymere ist ein großes Maß an endo-/lysosomalem „Entrapment“. Das bedeutet, dass von den endozytierten Nanopartikeln nur wenige aus den Endosomen in das Zytosol freigesetzt werden. Stattdessen werden sie großteils exozytiert oder abgebaut. Dadurch kann nur wenig Nukleinsäure ihren Wirkort erreichen, was die Transfektionseffizienz klein hält. Bei Verwendung von Plasmid-DNA spielt auch der intravesikuläre Transport entlang von Mikrotubuli zum Zellkern sowie dessen Zugänglichkeit eine entscheidende Rolle [36] für die Transfektionseffizienz.

Besonders große Transfektionseffizienzen konnten durch Komplexierung von Nukleinsäuren mit PEI (Polyethylenimin) oder PAMAM (Poly(amidoamin)) erreicht werden, was mit dem sog. „Proton-Sponge“-Effekt (dt. Protonenschwamm-Effekt) erklärt wird. Beide Polymere verfügen über zahlreiche Aminogruppen, die bei physiologischem pH-Wert nicht alle protoniert sind (dennoch genug zur Komplexierung der Nukleinsäure). Mit einsetzender Azidifizierung durch die Aktivität der V-ATPase in der Membran der reifenden Endosomen werden diese Aminogruppen protoniert. Der pH-Wert in späten Endosomen sinkt bis auf 5 [40]. Die Protonen, die zusätzlich für die Protonierung der Polymere in die Endosomen gepumpt werden, ziehen einen größeren Chloridionen-Einstrom nach sich. Dieser ist mit einem Einstrom von Wasser verbunden. Die späten Endosomen bzw. Endolysosomen schwellen an und werden destabilisiert. Aufgeklärt wurde dieser Mechanismus durch die Erforschung der destabilisierenden Wirkung von Chloroquin auf Endosomen, nachdem festgestellt wurde, dass die Transfektionseffizienz von DEAE-Dextran-komplexierter DNA durch Chloroquin deutlich gesteigert wurde [36, 41]. Allerdings spielen auch direkte Interaktionen zwischen kationischen (protonierten) Polymeren mit der Endosomenmembran eine Rolle für den „Endosomal Escape“ [42]. Beleg dafür ist der hemmende Einfluss auf die endosomale Freisetzung durch Pegylierung der Polyplexe (oder Lipoplexe) [43, 44]. PEI oder PAMAM sind zwar effizient in der Transfektion, jedoch auch bei zunehmender Molekülgröße mit steigender Toxizität assoziiert [45, 46]. PAMAM ist im Gegensatz zu PEI *in vivo* abbaubar und daher weniger toxisch. Polylysin ist ebenso abbaubar und noch weniger toxisch (je länger das Polymer, desto toxischer), allerdings ohne zusätzlichen Transfektionsverstärker in der Funktion eines „Endosomal Escape Enhancers“ weit weniger effizient.

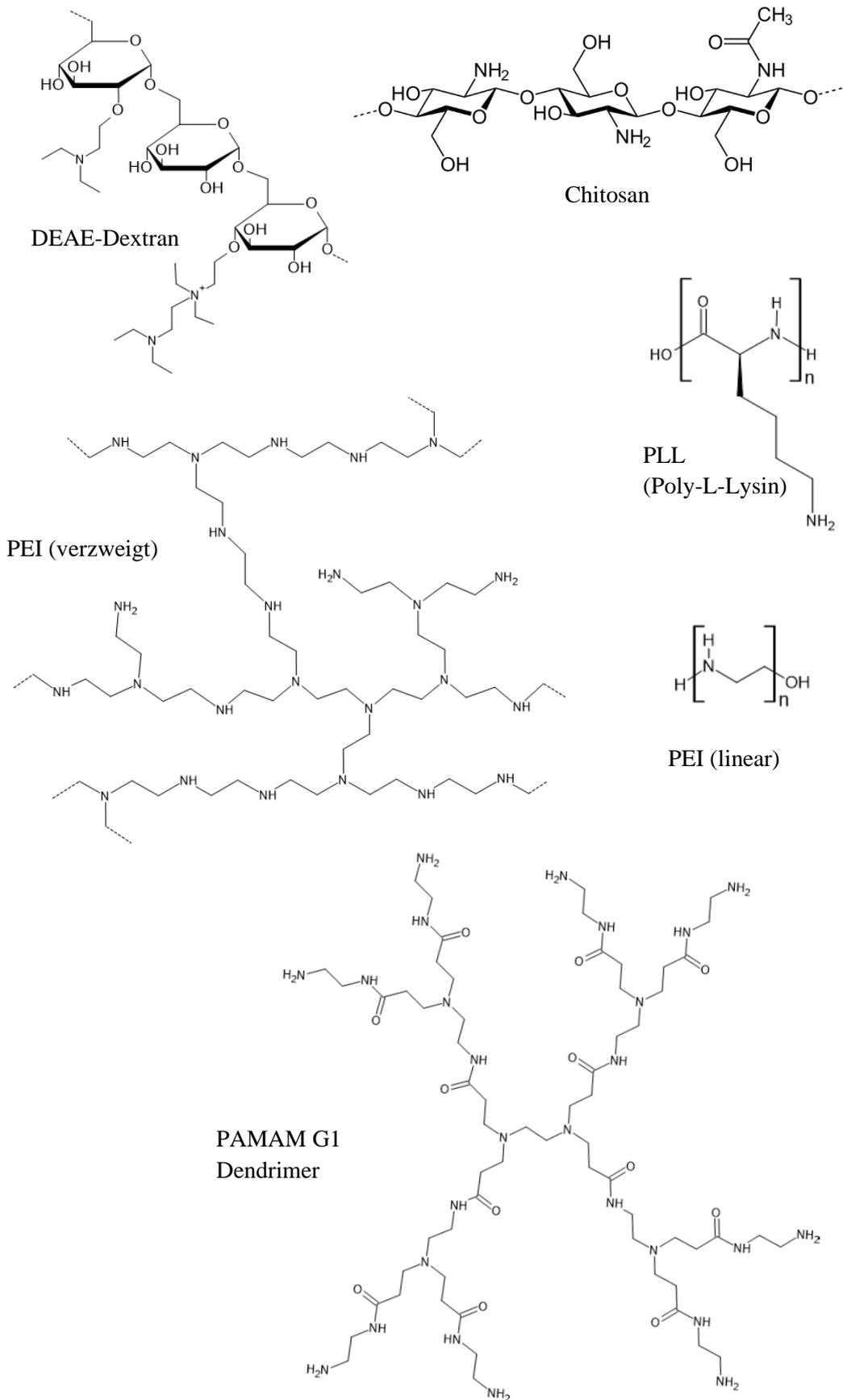


Abb. 3 Strukturformeln kationischer Polymere als Transfektionsreagenzien
 Proton-Sponge-Effekt nur mit PEI (Polyethylenimin) oder PAMAM (Poly(amidoamin)).

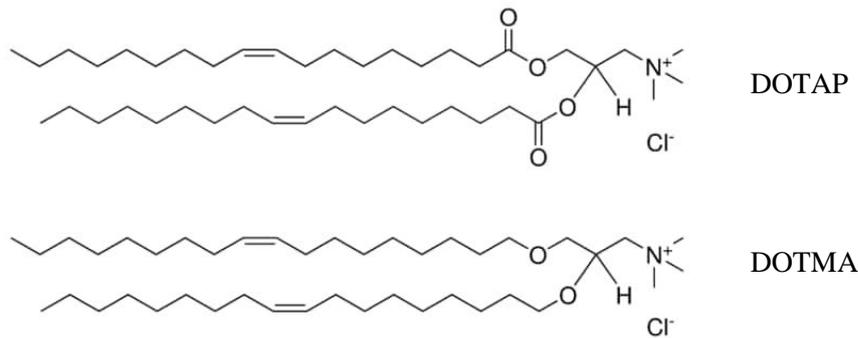


Abb. 4 Strukturformeln der liposomalen Transfektionsreagenzien DOTAP und DOTMA

DOTAP: 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan (Chlorid);

DOTMA: 1,2-Di-O-octadecenyl-3-trimethylammoniumpropan (Chlorid).

Es wurden diverse chemische Modifizierungen an den Transfektionsreagenzien erprobt, um z. B. die Endozytose (Konjugation von Targeting-Liganden) oder die Freisetzung aus den Endosomen zu verstärken, oder um die systemische Zirkulation zu verlängern, indem die rasche Clearance der Nanopartikel infolge einer Aktivierung von Komplementsystem und Retikuloendotheliales System (RES) gehemmt wird. Die verlängerte systemische Zirkulation wird am einfachsten durch einen „PEG-Schild“ um die Partikel erreicht, womit jedoch gleichzeitig die endosomale Freisetzung, wie zuvor bereits ausgeführt, behindert wird. Dies führt dazu, dass die Transfektionseffizienz durch eine stärkere Pegylierung i. d. R. *in vitro* abnimmt, während sie *in vivo* steigt.

Wichtige Parameter von Nanopartikeln als nicht-virale Vektoren:

- N/P-Verhältnis (Verhältnis von Stickstoff zu Phosphor im Sinne von pos. zu neg. Ladung)
- Partikelgröße und -homogenität
- Zetapotential
- Ausmaß der Pegylierung (falls gegeben)

Für das N/P-Verhältnis existiert für jede Methode ein Optimum eines mehr oder weniger großen Überschusses positiver Ladungen. Dies soll die vollständige Nukleinsäure-Komplexierung sowie eine ausreichende Partikelstabilität gewährleisten. Ist das N/P-Verhältnis zu groß, können zum einen toxische Effekte resultieren, zum anderen kann zumindest bei Lipoplexen die Dissoziation in den Endosomen gehemmt werden, was zur Verminderung der Transfektionseffizienz führt [47, 48]. Das N/P-Verhältnis beeinflusst auch die Partikelgröße und das Zetapotential. Letztgenanntes sollte zur Vermeidung von Partikelaggregation während der Lagerung nicht zu klein sein. Bei Verwendung kationischer Polymere bzw. Lipide ist das Zetapotential stets positiv, was zur Adsorption negativ geladener Serumproteine und zu einer Aktivierung des Komplementsystems [49] inkl. einer Opsonierung der Partikel für die darauffolgende Clearance durch das RES führt [50].

Die Partikelgröße ist bedeutsam für die Endozytose, die systemische Zirkulationsdauer (Clearance durch das RES) sowie eine Akkumulation in bestimmten Geweben, beispielsweise Tumoren. Optimal für eine lange Zirkulation im Blutkreislauf und die Akkumulation im Tumorgewebe ist eine Größe von 50-150 nm, bei der die Nanopartikel über das stark fenestrierte Endothel der tumorversorgenden Gefäße den Blutkreislauf verlassen und das Tumorgewebe infiltrieren können [51]. Dieser EPR-Effekt („enhanced permeability and retention“) wird als passives „Targeting“ bezeichnet. Dennoch können Nanopartikel im genannten Größenbereich durch fenestriertes Endothel auch in die Leber gelangen, wo sie von Kupffer-Sternzellen phagozytiert werden, die Teil des RES sind und 80-90 % der Makrophagenpopulation ausmachen [52]. Ein PEG-Schild schirmt v. a. die positive Ladung der Nanopartikel ab und reduziert dadurch die Adsorption von Serumproteinen. Somit wird auch die Opsonierung durch das Komplementsystem reduziert, was schließlich die Clearance durch phagozytierende Zellen des RES minimiert und folglich die systemische Zirkulationszeit der Partikel verlängert.

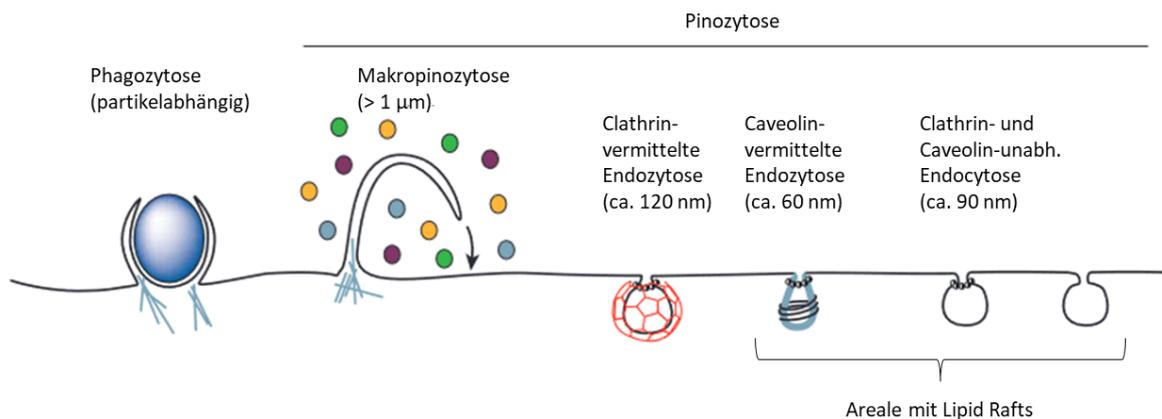


Abb. 5 Unterschiedliche Möglichkeiten des Eintritts in eine Säugetierzelle

Die Endozytosewege unterscheiden sich in der aufgenommenen Fracht, der Größe der Endozytose-Vesikel und deren Entstehungsmechanismus (sowie im intrazellulären Schicksal des endozytierten Materials). Die Größe endozytierter Partikel kann die angegebene durchschnittliche Größe der Membraneinbuchtungen deutlich übersteigen. Über Phagozytose werden große, feste Partikel aufgenommen (> 250 nm), über Pinozytose membrannaher Flüssigkeitsportionen (inkl. Nanopartikel entsprechender Größe). Bei Clathrin-vermittelter E. (rezeptorvermittelt) werden die entstehenden Vesikel von Clathrinmolekülen umhüllt, deren Untereinheiten eine Triskelstruktur ausbilden. Diese Strukturen fügen sich in der Umhüllung zu einem Netzwerk aus Penta- und Hexameren zusammen. „Lipid Rafts“ (Lipidflöße) sind durch einen hohen Gehalt an Cholesterol und Sphingomyelin gekennzeichnet. Zusätzlich sind sie reich an unterschiedlichen Membranproteinen mit verschiedenen Funktionen, wie z. B. Endozytose (Caveolin, Endophilin, Flotilin). *

*Abbildung modifiziert, von Conner und Schmid (2003) [53].

Der Zelleintritt erfolgt bei Lipoplexen und Polyplexen v. a. via Clathrin- und Caveolin-vermittelter Endozytose, aber auch via Makropinozytose. Zum Teil werden mehrere Endozytosewege parallel genutzt, abhängig von Größe und Material der Nanopartikel und v. a. auch vom Zelltyp. Speziell für DOTAP/DNA-Lipoplexe wurde als Hauptroute die Clathrin-vermittelte Endozytose bestimmt, für PEI/DNA-Polyplexe hingegen sowohl Clathrin- als auch Caveolin-vermittelte Endozytose [54]. Für siRNA/Lipid-Nanopartikel wurde eine initiale Clathrin-vermittelte Endozytose nachvollzogen, die im Anschluss eine bedeutende Aufnahme der Partikel über Makropinozytose zu induzieren schien [55]. Da Lipid-Nanopartikel aktuell das nicht-virale Gentransfersystem mit der größten Bedeutung in der klinischen Anwendung darstellen, soll an dieser Stelle im Detail auf ihre Entwicklung und Charakteristika eingegangen werden.

Die Entwicklung der Lipid-Nanopartikel (LNP) -Technologie

Der Begriff Lipid-Nanopartikel ist unpräzise. Teilweise werden so auch lipidbasierte Nanopartikel bezeichnet, die als Arzneistoffträger für lipophile Wirkstoffe dienen, obwohl diese i. d. R. als „Solid Lipid Nanoparticles“ (SLN) benannt werden. Auch mit ionisierbaren Wirkstoffen unter Ausnutzung eines pH-Gradienten beladene Liposomen werden zum Teil als Lipid-Nanopartikel bezeichnet. In dieser Arbeit ist jedoch mit LNP ausschließlich das Gentransfer-System gemeint, das eine spannende Weiterentwicklung auf dem Gebiet der Lipofektion darstellt. Während der Corona-Pandemie 2020/2021 kam diese Technologie in Form der in Rekordzeit entwickelten LNP-basierten mRNA-Impfstoffe millionenfach zum Einsatz.

Die wissenschaftliche Basis für die Erforschung dieses lipid-basierten Gentransfer-Systems wurde bereits in den 80er Jahren von Professor Pieter Cullis und seinen Mitarbeitern in ihrem Labor an der Universität von British Columbia (UBC) gelegt. Nach seiner Promotion in Physik begann Cullis sich als Postdoc in Oxford mit Biochemie zu beschäftigen. Gemeinsam mit Ben de Kruijff, einem Postdoc aus Utrecht, untersuchte er mittels ^{31}P -NMR strukturelle Eigenschaften von Lipiden aus biologischen Membranen. Er interessierte sich zunehmend für den Polymorphismus von Lipiden, einschließlich besonderer Membranlipide, die Non-Bilayer-Strukturen wie die invers-hexagonale H_{II} -Phase ausbilden konnten. Daraufhin beschäftigte er sich mit Lipid-Asymmetrie von Biomembranen und ihren funktionalen Folgen. Durch Einbringen ionisierbarer Lipide in Membran-Vesikel mit pH-Gradient konnte Lipid-Asymmetrie erreicht werden, weil sich die ionisierbaren Lipide bevorzugt in den Monolayer verteilten, der dem niedrigen pH-Wert zugewandt lag, sodass ihre hydrophile Kopfgruppe protoniert vorliegen konnte. Darauffolgend entstand zunächst die Idee, mit Hilfe eines pH-Gradienten geeignete Zytostatika in Membranvesikel zu laden. Um auf diese Weise liposomale Antikrebs-Medikamente zu entwickeln, beteiligte er sich zusammen mit vier seiner alten Postdocs an der Gründung des Unternehmens Inex Pharmaceuticals [56].

Mitte der 90er Jahre kam im Unternehmen die Idee auf, sich mit Gentherapie zu beschäftigen. Zum Komplexieren der negativ geladenen DNA sollten jedoch nicht die zur Lipofektion etablierten permanent kationischen Lipide verwendet werden, denn sie wirkten *in vivo* toxisch. Stattdessen wurde mit den ionisierbaren kationischen Lipiden aus den Studien zur Lipid-Asymmetrie experimentiert. Sie fanden heraus, dass sich bei niedrigem pH-Wert auch mit ihnen die DNA komplexieren ließ. Der Komplex blieb nach Erhöhung des pH-Werts auf physiologisches Niveau bestehen und war wesentlich weniger toxisch [56].

Es war Ende der 90er Jahre wohl bekannt, dass die zur Lipofektion verwendeten kationischen Lipide nicht nur der Komplexierung der DNA dienen, sondern zusätzlich die intrazelluläre Freisetzung (den „Endosomal Release“) verstärken. Cullis erforschte mit seinem Team den zugrundeliegenden Mechanismus und bediente sich dabei seiner Erfahrungen aus der Untersuchung des Lipidpolymorphismus¹. Sie konnten zeigen, dass die kationischen Lipide zusammen mit anionischen Lipiden, die in Endosomen v. a. in der inneren Membranschicht liegen, bevorzugt die invers-hexagonale H_{II}-Phase annehmen, die als Non-Bilayer disruptiv auf die Endosomenmembran wirkt [57]. Zudem konnte gezeigt werden, dass zusätzliches DOPE (Diolelylglycerophosphoethanolamin) oder Cholesterol (häufig als sogenannte Helferlipide bei der Transfektion eingesetzt) die Ausbildung der H_{II}-Phase erleichtert [58]. In Kooperation mit Alnylam Pharmaceuticals, einem Unternehmen, das 2002 gegründet wurde und an der klinischen Anwendung der RNA-Interferenz arbeitet, wurden zwischen 2005 und 2012 ausgehend von DODMA (1,2-Diolelyoxy-3-dimethylaminopropan) über 300 Arten ionisierbarer Lipide synthetisiert und damit die Potenz von siRNA-LNP-Systemen zum „Gene Silencing“ in der Leber um mehr als 3 Größenordnungen verstärkt. Die Optimierung erfolgte dabei v. a. hinsichtlich des pKa der synthetisierten Aminolipide (als optimal erwies sich ein pKa im Bereich 6,2-6,6), sodass diese im Blut möglichst neutral, in den Endosomen dagegen positiv geladen sind, aber auch hinsichtlich der Alkylketten, weil mehr Doppelbindungen leichter zur Ausbildung der H_{II}-Phase führen [57].

Zur Weiterentwicklung der LNP-Technologie gründete Cullis mit zwei seiner Kollegen aus seinem UBC-Labor 2009 Acuitas Therapeutics. Acuitas und das UBC-Labor entwickelten in Zusammenarbeit mit Alnylam ein optimiertes LNP-System für das Produkt Onpattro® (Wirkstoff: Patisiran). Nachdem 2012 klinische Studien mit Onpattro® starteten, verfolgte man bei Acuitas die Idee, mRNA anstelle von siRNA zur Gen-Expression in Leberzellen einzusetzen, was auch funktionierte. 2014 meldete sich schließlich Drew Weissman von der Universität von Pennsylvania mit der Idee dieses System als Impfstoff anzuwenden. Es funktionierte hervorragend und der Weg zur Entwicklung der mRNA-Impfstoffe war frei [56].

Mit Blick auf die mRNA/LNP-Impfstoffe zur Prävention von Covid-19 muss konstatiert werden, dass diese Impfstofftechnologie die ideale Simulation einer Infektion mit einem ssRNA-Virus (Coronaviridae) darstellt, dessen RNA im Falle einer Infektion in der Wirtszelle direkt als mRNA

für die Proteinbiosynthese dient. Im Gegensatz dazu wird die mRNA im Falle der Vektorimpfstoffe zunächst in DNA umgeschrieben (die verwendeten Adenoviren gehören zu den dsDNA-Viren) und in das virale Genom integriert, um vom viralen Vektor in den Zellkern der Zielzellen geschleust zu werden, wo diese DNA-Sequenz zunächst wieder transkribiert werden muss, bevor die entstehende mRNA den Zellkern verlassen kann, um im Zytosol an den Ribosomen translatiert zu werden. Nach heutigem Forschungsstand sind die zwar seltenen, aber gravierenden Impfschäden, die durch Vaxzevria® verursacht wurden, zumindest teilweise im alternativen Spleißen der gebildeten mRNA begründet. In der Folge wurden nicht nur membranverankerte, sondern auch lösliche Spikeproteine synthetisiert, die für die oft tödliche Kombination von Sinusvenenthrombose und Thrombozytopenie verantwortlich gemacht werden [59].

Obwohl LNP nahezu ideale nicht-virale Vektoren darzustellen scheinen, ist auch ihre Transfektionseffizienz durch einen insgesamt sehr kleinen „Endosomal Escape“ von 1-2 % limitiert [55], während sie generell von einer verstärkten Endozytose über LDL-Rezeptoren nach Adsorption von Apolipoprotein E an die LNP abhängt [60]. Daher sind LNP nur in den Zellen sehr wirksam, die reich an LDL-Rezeptoren sind (insbesondere Leber- und Muskelzellen).

1.4 Saponine als Transfektionsverstärker



Abb. 6 Die Kornrade (*Agrostemma githago* L.), eine Caryophyllaceae
Entwicklung von der Blüte (1) bis zur Samenernte (4).

Lange Zeit wurde angenommen, dass für die Toxizität der Samen der Kornrade (*Agrostemma githago* L.) die enthaltenen Saponine direkt verantwortlich sind. Der Saponingehalt der Samen ist jedoch mit 0,25 bis 0,75 % sehr gering [61]. Tatsächlich handelt es sich um eine synergistische Wirkung von enthaltenen Ribosomen-inaktivierenden Proteinen vom Typ I (RIP-I) und speziellen bidesmosidischen Triterpensaponinen, wie Phillip Hebestreit bereits als Diplomand zeigen konnte [62]. Der Synergismus ist heute aus mehreren Vertretern der Caryophyllaceen bekannt, zumindest RIP-I kommen auch in anderen Pflanzenfamilien vor. Wahrscheinlich entspricht diese synergistische Toxizität also einem allgemeineren Prinzip.

RIP-I bestehen nur aus der Untereinheit (A-Kette), die eine N-Glycosylase-Aktivität (EC 3.2.2.22) vermittelt. Durch die Entfernung eines Adenins an Position 4324 in einer konservierten Region der 28S rRNA wird die Proteinbiosynthese irreversibel gehemmt. Allein sind RIP-I jedoch kaum toxisch, weil ihnen im Unterschied zu RIP-II eine weitere Untereinheit (B-Kette) zur Zelladhäsion und Internalisation fehlt. Die B-Kette erfüllt die Funktion eines Lektins, weil sie an spezifische Kohlenhydrate auf der Zelloberfläche bindet. RIP-II sind sehr toxisch [63].

Beispiele für RIP-I: Saporin, Dianthin, Agrostin, Gypsophilin, Gelonin

Beispiele für RIP-II: Ricin, Viscumin, Abrin

Als Wirkungsmechanismus der speziellen Saponine, die zur synergistischen Toxizität mit RIP-I führen, wurde später die Verstärkung des „Endosomal Escape“ ausgemacht. Demnach wird auch RIP-I mit geringerer Effizienz durch Clathrin-vermittelte Endozytose von den Zellen aufgenommen, jedoch anschließend nicht mehr aus den Endosomen entlassen und nach deren Fusion mit Lysosomen abgebaut. Die Saponine bewirken durch einen bis heute unbekanntem Mechanismus eine zumindest teilweise Freisetzung der gefangenen RIP-I-Moleküle aus den Endosomen und dadurch eine enorme Steigerung ihrer Zytotoxizität. Da es sich bei RIP-I aufgrund ihrer großen enzymatischen Aktivität um hochwirksame Toxine handelt, genügt theoretisch die Freisetzung eines Moleküls in das Zytosol, um den Zelltod zu bewirken [64].

Es handelt sich vermutlich um einen spezifischen Wirkungsmechanismus der Saponine, da die eingesetzte Saponinkonzentration (1,08 μM bei 2 $\mu\text{g/mL}$ AG1856) weit unterhalb jener liegt, die permeabilisierende Effekte auf Zell- und Lysosomenmembran hätte. Diese wurden für Saponine vom Oleanan-Typ bei Konzentrationen von $\geq 6 \mu\text{M}$ registriert (Hämolyse bei $\geq 3 \mu\text{M}$) [65]. Es gibt zusätzlich Hinweise für eine Steigerung der Clathrin-vermittelten Endozytose der RIP-I durch das Saponin [66, 67].

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurde ein 2020 erstbeschriebenes Saponin (AG1856) aus den Samen von *Agrostemma githago* L. isoliert, das sowohl *in vitro* [68], als auch *in vivo* eine geringe Toxizität zeigte [69]. Es vereint alle Charakteristika, die in der Vergangenheit als notwendig oder förderlich für eine Wirkung als „Endosomal Escape Enhancer“ (EEE) identifiziert wurden [70, 71]:

- Molmasse $> 1600 \text{ g/mol}$
- Quillajasäure als Aglykon (Aldehydfunktion an C-4, Säurefunktion an C-28)
- bidesmosidisch mit Zuckerketten verknüpft an C-3 (über Glucuronsäure) sowie C-28 (über Fucose)
- verzweigtes Trisaccharid an C-3 (D-Glucuronsäure, D-Galactose, D-Xylose)
- verzweigtes Pentasaccharid an C-28 (D-Fucose, D-Chinovose, L-Ramnose, D-Glucose, D-Xylose), Chinovose doppelt acetyliert (zusätzlich doppelte Acetylierung der Glucose)

Mit dem Ziel der Entwicklung neuer Krebstherapeutika wurden Immunotoxine (z.B. Fusionsproteine aus Saporin und EGF) kreiert und mit EEE kombiniert eingesetzt [72]. Die Wirkung als EEE lässt sich jedoch z. B. auch zur Steigerung der Transfektionseffizienz von Polylysin-basierten Polyplexen nutzen. Simko Sama et al. prägten dafür den Begriff „Sapofektion“ und verliehen einem dazu erfolgreich verwendeten EEE das Synonym „Sapofectosid“ [73]. Verwendet wird dabei die für RIP-I kodierende Gensequenz auf einem Plasmid im Sinne eines Suizid-Gens [74].

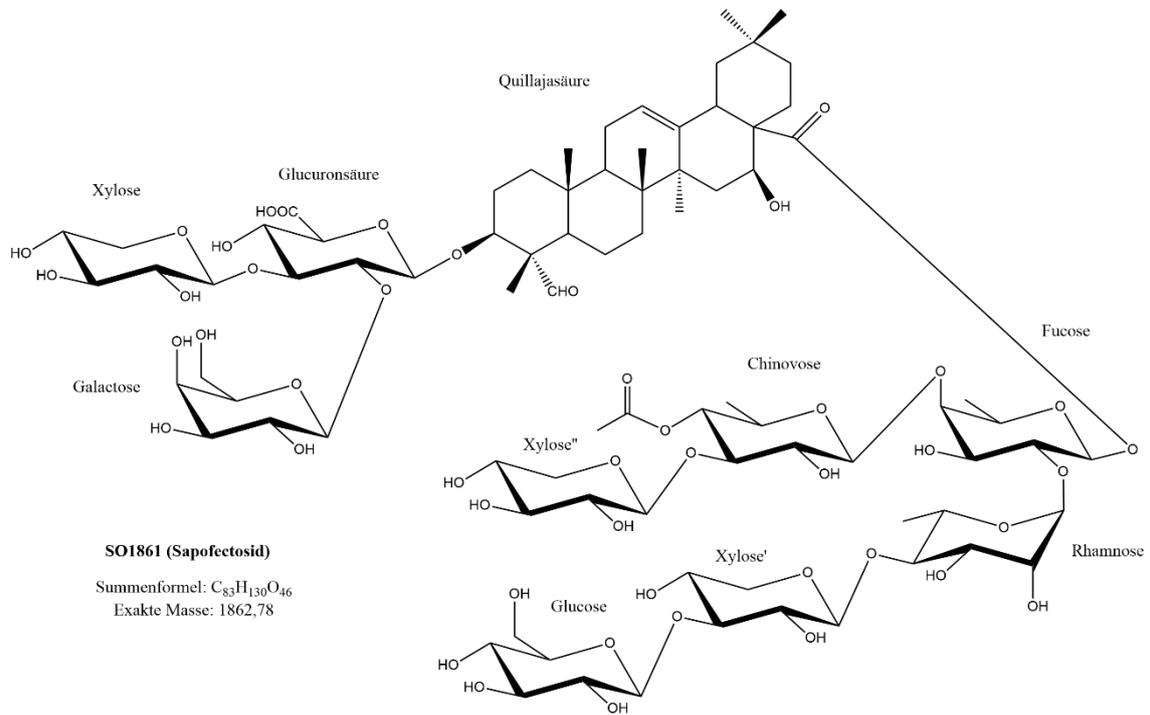


Abb. 7 Strukturformel von SO1861 (Sapofectosid)

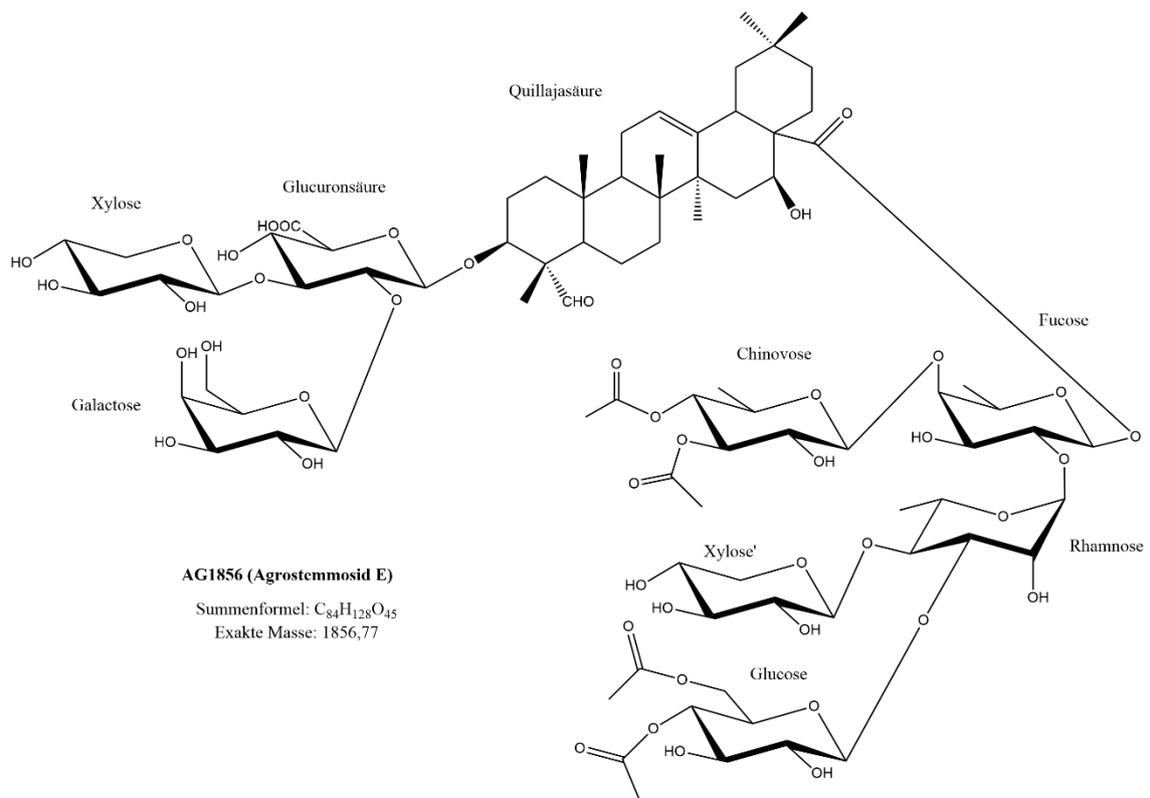


Abb. 8 Strukturformel von AG1856 (Agrostemmosid E)

1.5 Innovative Plasmid-DNA

Minicircle

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine optimierte Plasmid-DNA, sogenannte Minicircle (MC) hergestellt und getestet werden. Zur Herstellung solcher Minicircle stand ein kommerzielles Kit mit 5 Präparationen zur Verfügung.

Die MC-Technologie hat zum Ziel, die Größe der verwendeten Plasmide zu reduzieren, indem deren bakterielles Rückgrat entfernt wird. Dies führt zu gesteigerter Transfektionseffizienz [75] durch erleichterten intrazellulären Transport in den Kern [76] sowie gesteigerter Expressionsdauer durch Abtrennung des bakteriellen (CpG-reichen) Rückgrats von der eukaryotischen Expressionskassette [77, 78]. Gleichzeitig wird durch die Entfernung der bakteriellen DNA das Potential für immunologische Reaktionen im menschlichen Organismus reduziert, die ansonsten durch unmethylierte CpG-Muster des bakteriellen Plasmid-Rückgrats über die Aktivierung von TLR9 (Toll-Like Rezeptor 9) hervorgerufen werden [79]. Schließlich werden gleichzeitig Antibiotika-Resistenzgene entfernt, was auch regulatorisch forciert wird [80], weil sie sonst bei therapeutischer Anwendung zur bakteriellen Resistenzproblematik beitragen könnten. Pionierarbeit bei der Entwicklung der Minicircle-Technologie wurde von Darquet et al. geleistet [81]. Die Herstellung der MC mit Hilfe des o. g. Kits entspricht der kommerziellen Anwendung der von Kay et al. 2010 in Nature Communications vorgestellten Methodik [82].

Für die Herstellung von Minicircle-DNA mittels Kit ist sowohl ein spezieller, sogenannter Parental-Plasmid, als auch ein modifizierter *E. coli* Stamm namens ZYCY10P3S2T erforderlich. Das zu übertragende Gen wird in die MCS („Multiple Cloning Site“) des Parental-Plasmid-Präkursors (MN501A1) kloniert, wo es dann flankiert von den „Anhaftungsstellen“ (engl. attachment sites) einer Phagen-Integrase (attB – „bacterial attachment site“ & attP – „phage attachment site“) vorliegt. Nach dem Klonieren des zu übertragenden Gens in den Parental-Plasmid-Präkursor, muss der o.g. *E. coli* Stamm mit dem so erzeugten Parental-Plasmid transformiert werden.

Nach einer Amplifikationsphase, in der sich sowohl die Bakterien als auch die Plasmide vermehren, wird die Bildung der Minicircle durch die Zugabe von L-Arabinose gestartet. Der *E. coli* Stamm ZYCY10P3S2T wurde gentechnisch verändert, indem die Gene für zwei Enzyme stabil in die chromosomale DNA integriert wurden. Die beiden Enzyme PhiC31-Integrase und I-SceI-Endonuklease werden nur bei Vorhandensein von L-Arabinose exprimiert und führen wie unter Abb. 1 dargestellt und beschrieben zur Bildung der Minicircle sowie der Miniplasmide - wie das zyklisierte bakterielle Rückgrat der ursprünglichen Parental-Plasmide auch genannt wird. Vor der Verwendung der I-SceI-Endonuklease scheiterten Versuche, die entstandenen Miniplasmide im Anschluss mit Hilfe verschiedener säulenchromatographischer Methoden (Anionenaustausch-

chromatographie, hydrophobe Interaktionschromatographie, Größenausschlusschromatographie von den Minicirclen abzutrennen aufgrund sehr ähnlicher physikochemischer Eigenschaften (Mayrhofer und Iro, 2012 [83]; zitiert nach Alves, 2014 [84]). Der Durchbruch zur Überwindung dieses Problems gelang Chen et al. mit der *in vivo* Restriktion der Miniplasmide durch die im MC-Herstellungsprozess zusätzlich zur Φ C31-Integrase exprimierte I-SceI Endonuklease und die Ausstattung des bakteriellen Rückgrats des Parental-Plasmids mit zahlreichen Erkennungsstellen für diese Endonuklease [85]. So werden parallel zur Bildung der Minicircle die gleichzeitig entstehenden Miniplasmide direkt zu kleinen Fragmenten degradiert, die leicht mit den üblichen Methoden der Plasmidpräparation von den Minicirclen abgetrennt werden können (Anionenaustauscher-Säulchen). Die Wahl fiel auf I-SceI, weil die 18 bp große Erkennungssequenz dieses Enzyms nicht im Genom von *E. coli* vorkommt [84].

Nanoplasamide

Sogenannte Nanoplasamide stellen eine weitere Form verkleinerter Plasmide ohne Antibiotikaresistenzgen dar. Sie wurden von Jeremy Luke, Aaron E. Carnes, Clague P. Hodgson and James A Williams (NTC: Nature Technology Corporation, Lincoln, NE, USA) entwickelt [86] und werden in Zusammenarbeit mit dem Unternehmen Aldevron (Fargo, ND, USA) hergestellt und vertrieben. Im Unterschied zu Minicircle-DNA ist die Herstellung der Nanoplasamide (auch in großen Mengen) wesentlich einfacher und damit kostengünstiger. Um dies zu ermöglichen, bleibt ein sehr kleiner Teil des bakteriellen Rückgrats mit seiner Funktion als ORI (Reduktion von 1000 bp auf 300 bp) erhalten. Zunächst werden im Herstellungsprozess die Bakterien bei 30 °C vermehrt (bei geringer Plasmid-Amplifikation). Im Anschluss kommt es durch Temperaturerhöhung auf 42 °C zur Hitze-induzierten Expression von chromosomal kodierten Replikationsproteinen und infolgedessen zur massenhaften Amplifikation der Nanoplasamide. Durch die optimierte Fermentation in Kombination mit einem patentierten Lyse-Prozess (HyperGRO™) werden beachtliche Ausbeuten von > 2g/L erzielt. Antibiotikaresistenzgene werden nicht nur aus dem Endprodukt verbannt, um regulatorischen Anforderungen zu entsprechen, sondern sind auch für die Bakterienkultur nicht nötig, da die Selektion über Sucrose und Levansucrase/RNA_{out} erfolgt, was umweltfreundlich und kostengünstig ist [87].

Diese Technik beruht auf dem chromosomal im Wirtstamm kodierten Enzym Levansucrase, welches ursprünglich aus *Bacillus subtilis* stammt und Sucrose in seine Bestandteile Glucose und Fructose spaltet, während es gleichzeitig die Polymerisierung der Fructose-Monomere (nach einer einzelnen initialen Glucose) zu einem Polysaccharid, dem sogenannten Levan, katalysiert. In *Bacillus subtilis* ist Levan Bestandteil der Glykokalyx [88]. Bei der Nutzung als Selektionssystem wird der Umstand ausgenutzt, dass es sich bei Biosynthese in Gram-negativen Bakterien wie z. B. *E. coli* im periplasmatischen Spalt ansammelt und toxisch wirkt [89]. Demzufolge muss die Expression der Levansucrase in den Bakterien, die erfolgreich mit dem Nanoplasamid-Konstrukt

transformiert wurden, verhindert werden (Selektion). Dies wird durch RNA-Interferenz (RNA-Silencing) realisiert. Der RNA_{out}-Abschnitt des Nanoplasmid-Rückgrats führt zur Bildung einer siRNA. Die RNA_{in}-Sequenz in der chromosomalen DNA des Wirtsstamms steht in Verbindung zur Levansucrase-kodierenden Gensequenz. Sie werden in eine gemeinsame mRNA transkribiert. Der aus RNA_{in} resultierende Anteil kann dann mit der siRNA aus RNA_{out} hybridisieren, wodurch eine Expression der Levansucrase unterbunden wird. Folglich überleben nur die mit Nanoplasmid-Konstrukt transformierten Wirtsstamm-*E. coli* einen Sucrose-Zusatz im Kulturmedium, während die übrigen sich in Folge der Expression von Levansucrase selbst töten. In Ausrichtung auf therapeutische Anwendungen wird Nanoplasmid-DNA auch in GMP-Qualität angeboten.

Eine vergleichende Übersicht der verschiedenen Plasmid-Typen ist in Abb. 9 dargestellt.

Die Zellkulturexperimente wurden mit „klassischer“ Plasmid-DNA, welche als Reportergen ein eGFP-Gen trägt, durchgeführt, weil diese Plasmid-DNA durch Kultivierung transformierter Bakterien und anschließender Plasmidpräparation, z. B. mittels Qiagen Mega Prep Kit, schnell und einfach in großer Menge generiert werden kann.

1.6 Zielstellung

Hauptziel dieser Arbeit war die Erforschung einer möglichen Inkorporation von AG1856 als „Endosomal Escape Enhancer“ in lipidbasierte Gentransfer-Systeme (im Sinne eines Einkomponentensystems) zur Erhöhung ihrer Transfektionseffizienz.

Nebenziel sollte die Beurteilung der Eignung innovativer Plasmide für klinische Anwendungen bzw. Forschungszwecke sein.

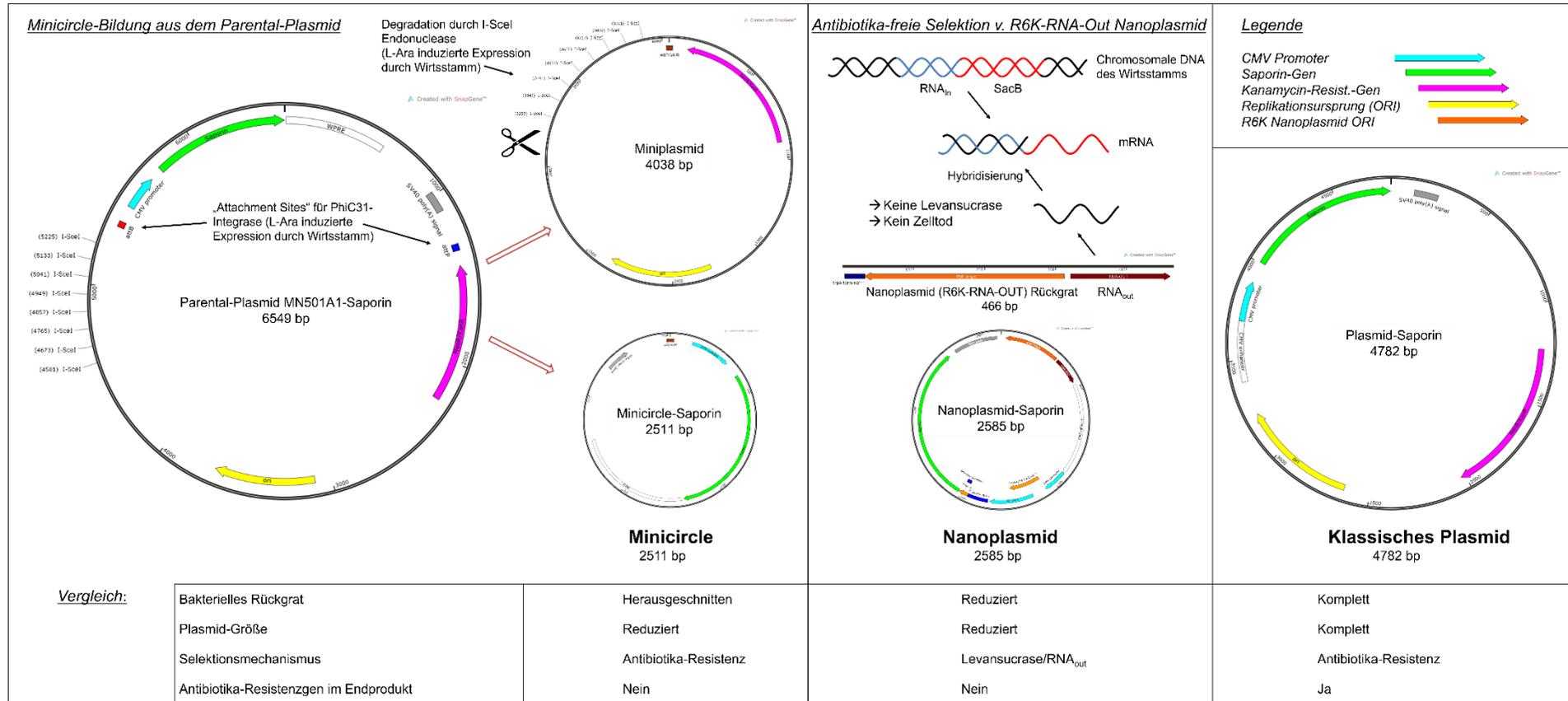


Abb. 9 Minicircle und Nanoplasmid im Vergleich zum klassischen Plasmid

Die dargestellte Größe der Plasmide steht in Relation zur tatsächlichen Anzahl der Basenpaare. Alle Plasmide tragen das gleiche Saporin-Gen [Mitdank (2022), modifiziert].

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gentechnik & Mikro-/Molekularbiologie

- PCR-Cycler Biometra TOne (Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland)
- Brutschrank B 5025 (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Thermoschüttler PHMT Thermo-Shaker (Grant Instruments, Cambridgeshire, UK)
- Standschüttler MaxQ™ 5000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Kühlzentrifuge Allegra X-30R Benchtop Centrifuge (Beckman & Coulter, Brea, CA, USA)
- BioSpectrometer mit Mikroküvette (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- NanoDrop™ One Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Elektrophorese-Laufkammer Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Elektrophorese-Laufkammer kuroGEL Mini Plus 10 Horizontal (VWR/ Avantor, Radnor, PA, USA)
- Heizblock Grant QBT1 (Grant Instruments, Cambridgeshire, UK)
- Zentrifuge Mikro 20 (Hettich, Tuttingen, Deutschland)
- UV-Transilluminator USDT-20SL-8E & Dunkelhaube „Dark Hood“ DH-10 (biostep, Burkhardtsdorf, Deutschland) mit aufgesetzter Kamera (Canon EOS 700D) mit BP-Filter 600 nm, Software: biostep Argus X1

MC-Herstellung

- Standschüttler MaxQ™ 5000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Hochleistungszentrifuge Avanti J-26XP mit JA-25.50 Rotor inkl. Zentrifugenröhrchen aus PPCO und JA-10 Rotor inkl. 500 mL Zentrifugenbecher mit Dichtung und Schraubkappe (Beckman & Coulter, Brea, CA, USA)
- SEC über Sephacryl S-1000 Superfine (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK) in einer YMC ECO Glassäule (YMC Europe GmbH, Dinslaken, Deutschland); Länge: 1000 mm, I.D. 25 mm, Betthöhe der stationären Phase: 950 mm, betrieben mit einer alten Merck Hitachi D-7000 HPLC-Anlage
- Kühlzentrifuge Allegra X-30R Benchtop Centrifuge (Beckman & Coulter, Brea, CA, USA)
- pH-Meter 766 Calimatic (Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland)

Zellkultur

- CO₂-Brutschrank ICO105med (Mettler, Schwabach, Deutschland)
- Sterilwerkbank HS 12 (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Wasserbad WB 14 mit Schüttelvorrichtung SV 1422 (Mettler, Schwabach, Deutschland)
- Umkehrmikroskop Nikon TMS (Nikon, Tokio, Japan)
- Neubauer Zählkammer, Brand, Wertheim, Deutschland

Analytik

- Dünnschichtchromatographie:
 - Horizontal-Entwicklungskammer (CAMAG, Muttenz, Schweiz)
 - Linomat IV (CAMAG, Muttenz, Schweiz)
 - TLC Scanner 4 (CAMAG, Muttenz, Schweiz)
 - UV-VIS Haube CabUVIS (DESAGA GmbH, Wiesloch, Deutschland)
- Analytische HPLC:
 - HPLC-Anlage von Shimadzu (Kyōto, Japan) mit
 - 2 Pumpen LC-10AD, Autoinjektor SIL-10A,
 - Säulenofen CTO-10AC,
 - Probenkühlung,
 - UV-VIS-Detektor SPD-10AV,
 - Interface CBM-20A,
 - Uniflows Degasys DG-1210 Degasser,
 - Software: LabSolutions
- LC-ESI-MS:
 - 1290 Infinity II HPLC System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
 - 6550 iFunnel Q-TOF Triple-Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer (Agilent Technologies)
- MALDI-MS:
 - Ultraflex II mit 200 Hz Laser (Bruker, Billerica, MA, USA)
 - Ultraflex TOF/TOF 2000 Hz (Bruker, Billerica, MA, USA)
- Elektronenmikroskopie:
 - Hitachi SU 8030 Elektronenmikroskop (Hitachi, Tokio, Japan)

- Dynamische Differenzkalorimetrie:
 - Nano DSC (TA Instruments, New Castle, DE, USA)

- Partikelgrößen- und Zetapotentialbestimmung:
 - Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK)

- Durchflussszytometrie:
 - CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)

- Biolumineszenz-Bildgebung:
 - NightOWL LB 981 imaging system (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland)

Saponin-Isolierung

- Rotationsverdampfer Rotavapor-R mit Wasserbad B-480 (Büchi, Flawil, Schweiz) und Membran-Vakuumpumpe MZ 2C + Kontroller CV2 (VACUUBRAND, Wertheim, Deutschland)
- Vakuum-Zentrifuge Savant SPD 111V SpeedVac Concentrator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Gefriertrocknung Christ Alpha 1-2 LDplus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland)
- Heraeus Megafuge 1.0 Centrifuge (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Mühle IKA-Universalmühle M20 (IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland)
- Magnetrührer IKA-COMBIMAG RCT (IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland)
- Sephadex LH-20 Säule (10 x 1990 mm): aus 2 verbundenen (verschmolzenen) Glassäulen ECO10/999V0V, AB-Version, Vario (YMC Europe GmbH, Dinslaken, Deutschland)
- Azura LC-System (Knauer Wissenschaftliche Geräte GmbH, Berlin, Deutschland) mit Pumpe P 6.1L, Ventildeck ASM 2.1L mit 2x 6-Wege-Ventil, Detektor DAD 2.1L, Leitfähigkeitsdetektor CM 2.1S und Fraktionssammler Foxy R1; Software: PurityChrom
- Prep-HPLC (Shimadzu, Kyōto, Japan) mit 2 Pumpen LC-8A, Säulenhalter LC-BA mit Injektorventil und Flußkanalventil (Umschalten zw. 2 Säulen) sowie Mischkammer, UV-VIS-Detektor SPD-20AV und Interface CBM-20A; Software: LabSolutions; Semiprep-Säule Phenomenex Kinetex® 5 µm, C18, 100 Å, 10 x 250 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)
- Zentrifuge EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)
- Analysenwaage MC1 AC210P (Sartorius, Göttingen, Deutschland)

Isolierung der Lipid-Saponin-Konjugate

- SPE-Vakuumvorrichtung: Adsorbex SPU “Sample Preparation Unit” (Merck, Darmstadt, Deutschland), schmale 5 mL Gläser zum Fraktionieren
- Rotationsverdampfer: IKA® RV10 digital, HB10 basic, RV 10D S93 (IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland) mit Membran-Vakuumpumpe MZ 2C und Controller CV2 (VACUUBRAND, Wertheim, Deutschland)
- Analysenwaage XS 205 Dual Range (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA)

Sonstige

- Avestin Liposofast™ extruder (AVESTIN Europe, Mannheim, Deutschland)
- Reinstwasseranlage LaboStar® UV 2 (Siemens, Barsbüttel, Deutschland)
- Ultraschallbad Sonorex RK 100 (Knick Elektronische Messgeräte, Berlin, Deutschland)

Software

- PlasmaDNA (Helsinki, Finnland)
- Snap Gene™ 1.1.3 (Dotmatics, Boston, MA, USA)
- DNA Baser Sequence Assembler v5.15.0 (Heracle BioSoft SRL, Lilienthal, Deutschland)
- WinLight (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland)
- Mass Hunter, Qualitative Analysis 10.0 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
- ImageJ (Rockville, MD, USA)
- R 4.2.2 und RStudio (Open Source)
- Zetasizer Software 7.13 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK)
- CytExpert 1.2. (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)

2.1.2 Verbrauchsmaterial/Chemikalien

Gentechnik/Mikrobiologie

- SOC-Medium, Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- LB-Bouillon mit Agar (Lennox) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- LB-Medium „Miller’s Modification“ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- TB-Medium „Terrific Broth Medium für die Molekularbiologie“ (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

- PCR-Primer & Sequenzierungsprimer (Metabion, Planegg, Deutschland)
- Library Efficiency® DH5 α ™ 5x 0,2 mL kompetente *E. coli* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- „MC-Easy Minicircle DNA Production Kit“ mit ZYCY10P3S2T *E. coli* Minicircle-Produktions-Stamm und Parental-Plasmid MN501A1 mit MCS (Vertrieb durch BioCat GmbH, Heidelberg, Deutschland; Herst.: SBI Biosciences, Palo Alto, CA, USA)
- Parental-Plasmid MN601A1 mit GFP-Gen (SBI Biosciences, Palo Alto, CA, USA)
- GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Restriktionsenzyme: SalI-HF und NheI-HF (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- CutSmart® Buffer (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- DNA-Polymerase, Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- Agarose (SERVA, Heidelberg, Deutschland)
- 100 bp DNA Ladder extended (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 1 kb Plus DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- Ethidiumbromid-Lösung 0,5 % (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Phusion™ HF DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- ZymoPure Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, Deutschland)
- ZymoPure II Plasmid Midiprep Kit (Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, Deutschland)
- ZymoPure II Plasmid Maxiprep Kit (Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, Deutschland)
- Roti-Transform Kit (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Kryoröhrchen CRYO.S™, 2 mL, PP, mit Schraubverschluss, steril (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)
- Glycerol, aus der Pflanze (SERVA, Heidelberg, Deutschland)
- Ladepuffer „6x Loading Dye“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Ampicillin Natriumsalz, Molekularbiologie-Qualität (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Kanamycinsulfat, Molekularbiologie-Qualität (SERVA, Heidelberg, Deutschland)
- Invitrogen™ Nuklease-freies Wasser, nicht DEPC-behandelt (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Reagiergefäße, 1,5 mL, SafeSeal (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Schraubröhren, 15 mL, PP mit Spitzboden, steril (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Schraubröhren, 50 mL, PP mit Spitzboden, steril (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Minicircle-Isolierung

- L(+)-Arabinose, $\geq 99\%$ für die Biochemie (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 2-Propanol p.a. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- TRIS PUFFERAN®, $\geq 99,9\%$, Ultra Qualität (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Ammoniumacetat, $\geq 96\%$, reinst (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- SDS: Dodecylsulfat-Na-Salz „electrophoresis grade“ (SERVA, Heidelberg, Deutschland)
- Natriumhydroxid, Plätzchen zur Analyse (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Eisessig, AnalaR, NORMAPUR® (Avantor, Radnor, PA, USA)
- Kaliumacetat, $\geq 99\%$, Ph.Eur., BP (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Natriumchlorid, $\geq 99,5\%$ (Fisher Chemical, Fisher Scientific, Loughborough, UK)
- Polyethylenglycol 8000 Rotipuran® Ph.Eur. (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Glycerol, Electran®, „Molecular biology grade“ (Avantor, Radnor, PA, USA)
- TB-Medium: „Terrific-Broth“, modifiziert, für die Molekularbiologie (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- EDTA: Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat $\geq 99\%$, p.a. (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Tube-O-DIALYZER™ MEDI, MWCO: 50 kDa (G-Biosciences, St. Luis, MO, USA)
- Millipore Amicon Ultra-15, Ultracel® Regenerierte Cellulose, MWCO: 30 kDa (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

Medien/Puffer	Zusammensetzung
LB Agarplatten	LB-Bouillon mit Agar (Lennox), 50 $\mu\text{g/mL}$ Kanamycin
Wachstumsmedium	TB-Medium, modifiziert (4 mL/L Glycerol, 50 $\mu\text{g/mL}$ Kanamycin)
Induktionsmedium	384 mL LB-Medium (frisch hergestellt) + 16 mL 1 M NaOH + 0,4 mL 20 % L-Arabinose-Lösung (m/v), vor Zugabe mischen
Resuspendierungspuffer (P1)	50 mM TRIS, 10 mM EDTA, pH 8,0
Lysepuffer (P2)	0,2 M NaOH, 1 % SDS (Tipp: Warten ü. N. vor dem kompletten Auffüllen des Kolbens wg. Schaumbildung)
Neutralisationspuffer (P3)	3 M Kaliumacetat, Essigsäure, pH 5,5
PEG/NaCl-Lösung	30 % PEG8000, 1,6 M NaCl (Lösen unter Anwendung von Ultraschall)
TE-Puffer	10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8,0
Mobile Phase	TE-Puffer/0,1 M NaCl

Sprühreagenzien zur DC-Detektion

- EtOH absolut $\geq 99,8\%$ „Analytical reagent grade“ (Fisher Chemical, Fisher Scientific, Loughborough, UK)
- konz. $\text{H}_2\text{SO}_4 \geq 95\%$ „Analytical reagent grade“ (Fisher Chemical, Fisher Scientific, Loughborough, UK)
- L(+)-Weinsäure, p.a. (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Vanillin, DAB 7 (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Wismut (III)-nitrat, basisch, p.a. (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Kaliumiodid AnalAR NORMAPUR (VWR Chemicals BDH®)
- Molybdätosphorsäure, p.a. (Merck, Darmstadt, Deutschland)

1) Vanillin-Schwefelsäure-Reagens (VSR)

(Sprühreagens Nr. 38 in „Drogenanalyse“ (Springer Verlag, 1983)

„*Universalreagens, z. B. für Terpenoide, Phenylpropanderivate, Phenole etc.*“

Lösung A: 5 % konz. H_2SO_4 in EtOH abs.

Lösung B: 1 % Vanillin in EtOH abs.

DC-Platte zuerst gründlich mit A, direkt im Anschluss mit B besprühen und auf 120 °C erhitzen.

2) Weinsaures Dragendorff-Reagens (DRG)

(Sprühreagens Nr. 11 C in „Drogenanalyse“ (Springer Verlag, 1983)

Nachweis basischer Amine

Lösung A: 0,85 g basisches Wismutnitrat + 10g Weinsäure in 40 mL Wasser

Lösung B: 8 g Kaliumiodid in 20 mL Wasser

Stammlsg.: Lösung A und Lösung B mischen (mehrere Wochen gekühlt haltbar)

Sprühreagens.: 1 mL Stammlsg. + 10 mL Wasser + 2 g Weinsäure

DC-Platte gründlich besprühen und anschließend trocknen lassen.

3) Molybdätosphorsäure (Phosphormolybdänsäure – PMS)

Nachweis reduzierender Substanzen, z. B. Phospholipide

Sprühreagens.: 1 % in EtOH abs.

DC-Platte gründlich besprühen und auf 120 °C erhitzen.

Saponin-Isolierung

- Samen von *Agrostemma githago* L. (Altbestände der AG Melzig)
- 2 mL Einmalspritze ONCE® (Codan Medical ApS, Færgevej 4, 4970 Rødby, Dänemark)

Chemikalien	Hersteller
Petrolether 40 - 60 °C, analytical reagent grade	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Methanol HiPerSolv CHROMANORM “HPLC grade”	Avantor, Radnor, PA, USA
Milli-Q Reinstwasser	Siemens LaboStar® Reinstwassersystem
Acetonitril HiPerSolv CHROMANORM “HPLC grade”	Avantor, Radnor, PA, USA
Sephadex LH-20 (Perlengröße 25 - 100 µm)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trifluoressigsäure (TFA) Art.-Nr. P088.1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Konjugat-Herstellung

- SPE-Säulchen Chromabond®, SiOH, 3 mL/500 mg (Macherey-Nagel, Düren, NRW, Deutschland)
- Braunglas-Vials, 1,5 mL GW-Flasche, braun, Cat.No 548-0019 (VWR/Avantor, Radnor, PA, USA)
- Schraubkappe, ND8, 8-425, schwarz (PP) mit Liner (rot-Gummi, beige-PTFE), Cat.No 548-3322A, (VWR/Avantor, Radnor, PA, USA)

Chemikalien	Hersteller
KMUH (N-[κ-maleimidoundecanoic acid] hydrazide, trifluoroacetic acid salt)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DSPE-SH	Nanosoft Polymers, Winston-Salem, NC, USA
DSPE-PEG-SH	Nanosoft Polymers, Winston-Salem, NC, USA
TEA (min. 99,5 %, zur Synthese)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform, p.a., EMSURE®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol HiPerSolv CHROMANORM “HPLC grade”	Avantor, Radnor, PA, USA
Milli-Q Reinstwasser	Siemens LaboStar® Reinstwassersystem

Herstellung von Liposomen und nanopartikulären Lipid-DNA-Formulierungen

Chemikalien	Hersteller
Chloroform, p.a., EMSURE®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
EtOH abs. AnalaR NORMAPUR®, Glasflasche	VWR Chemicals BDH®
Eisessig, AnalaR, NORMAPUR®	Avantor, Radnor, PA, USA
DOTAP (18:1 TAP), Pulver, 200 mg	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA
DODMA, Chloroform-Lösung, 100 mg/4 mL	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA
Egg SM (aus Hühnerei), Pulver, 25 mg	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA
DSPC (18:0 PC), Pulver, 200 mg	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA
POPC (16:0-18:1 PC), Pulver, 25 mg	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA
SOPC (18:0-18:1 PC), Pulver, 25 mg	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA
DMG-PEG 2000, Pulver, 1g	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA
Cholesterol (aus Schafwolle, 98 %), Pulver, 500 mg	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA
DPBS	Lonza, Basel, Schweiz
Natriumacetat Trihydrat, ≥ 99,5 %, CELLPURE®	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid, ≥ 99,5 %	Fisher Chemical, Loughborough, UK
Zitronensäure Monohydrat	VWR Chemicals BDH®
	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Polylysin K16	GeneCust, Boynes, Frankreich
Peptid Y	GeneCust, Boynes, Frankreich

LNP-Formulierung:

200 µL SafeSeal SurPhob Spitzen, DNA-, DNase-, RNase-, Pyrogenfrei, Art.Nr. VT0260 (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland)

Zellkultur**Verbrauchsmaterial**

- Cellstar Microplatten, 96-Well, 48-Well und 24-Well, transparent, steril (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)
- Kryoröhrchen CRYO.S™, 2 mL, PP, mit Schraubverschluss, steril (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)
- Zellkulturflaschen mit Filter-Schraubverschluss, 25 cm² und 75 cm² (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)
- Serologische Pipetten, steril, 5 mL, 10 mL und 25 mL (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)
- Schraubröhren, 15 mL und 50 mL, PP mit Spitzboden, steril (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Falcon® Rundbodenröhrchen, Polystyren, 5 mL, Corning® (Avantor, Radnor, PA, USA)
- MS® PES Spritzenvorsatzfilter, steril, Porengröße: 0,22µm, Ø 25 mm (Membrane Solutions, Plano, TX, USA)

Zelllinien

- Neuro-2A: murine Neuroblastom-Zelllinie (ATCC CCL-131) [90]
- Neuro-2A-Luc-Zellen: Neuro-2A-Zellen, die stabil mit einem Luciferase-Gen transduziert wurden [91]
- Hepa 1-6: murine Hepatom-Zelllinie (ATCC CRL-1830) [92]
- EVC-304: früher als vermeintliche endotheliale Zelllinie ATCC CRL-1998 erhältlich, tatsächlich Derivat der humanen Blasenkrebszelllinie T24 (RRID:CVCL_2029) [93]
- HEK-293FT: aus humaner Embryoniere, epitheliale Morphologie (RRID:CVCL_6911) [94]

Medien

- DMEM BioWhittaker® Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Lonza, Basel, Schweiz)
- DPBS BioWhittaker® Dulbecco's PBS, ohne Ca²⁺, ohne Mg²⁺ (Lonza, Basel, Schweiz)
- Nicht-essenzielle Aminosäuren (Lonza, Basel, Schweiz)
- FBS SUPERIOR stabil® (Bio&SELL, Feucht/Nürnberg, Deutschland)
- Trypsin/EDTA (Lonza, Basel, Schweiz)
- Opti-MEM® (1x) Reduced Serum (Biochrom, Berlin, Deutschland)

Verwendete Nukleinsäuren

Klassische Plasmid-DNA	Minicircle-DNA	Nanoplasmid-DNA
p-eGFP	MC-GFP MC-Sap	NTC9385R-eGFP-BGH pA (NP-eGFP) NTC9385R-Sap-BGH pA (NP-Sap) NTC9385R-Gyp-BGH pA (NP-Gyp)

Sonstiges

- UV-transparente Einmal-Küvetten mit 50 µL Kavität, REF 67.758 (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Pipettenspitzen, 10 µL, 200 µ, 1000 µL (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

2.3 Methoden

2.3.1 Herstellung von Minicircle-DNA

Nachdem erste Versuche Minicircle (MC) mit Hilfe eines Kits herzustellen in Folge unstimmgiger Angaben hinsichtlich Inkubationsdauer der Vorkultur und Vorkulturvolumen zum Animpfen der Hauptkultur, gescheitert waren (siehe 2.3.1.10), wurde eine eigene MC-Herstellungsmethode ausgehend vom *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm ZYCY10P3S2T und Parental-Präkursor MN501A1 (Komponenten des MC-Produktionskits) sowie den Angaben aus der Publikation von Kay et al. [82] entwickelt. In Abweichung zum Protokoll von Kay et al. beinhaltet dieses als letzten Schritt eine Größenausschlusschromatographie auf Sephacryl-S1000 SF als stationärer Phase (anstelle einer kommerziellen Anionenaustauschersäule zur Plasmidpräparation -Qiagen Mega-Prep- und doppelter Puffermengen). Auf diese Weise war es möglich, Minicircle in nahezu reiner supercoiled Konformation“ zu isolieren [95]. Eine Übersicht zum Arbeitsablauf ist in Abb. 11 dargestellt.

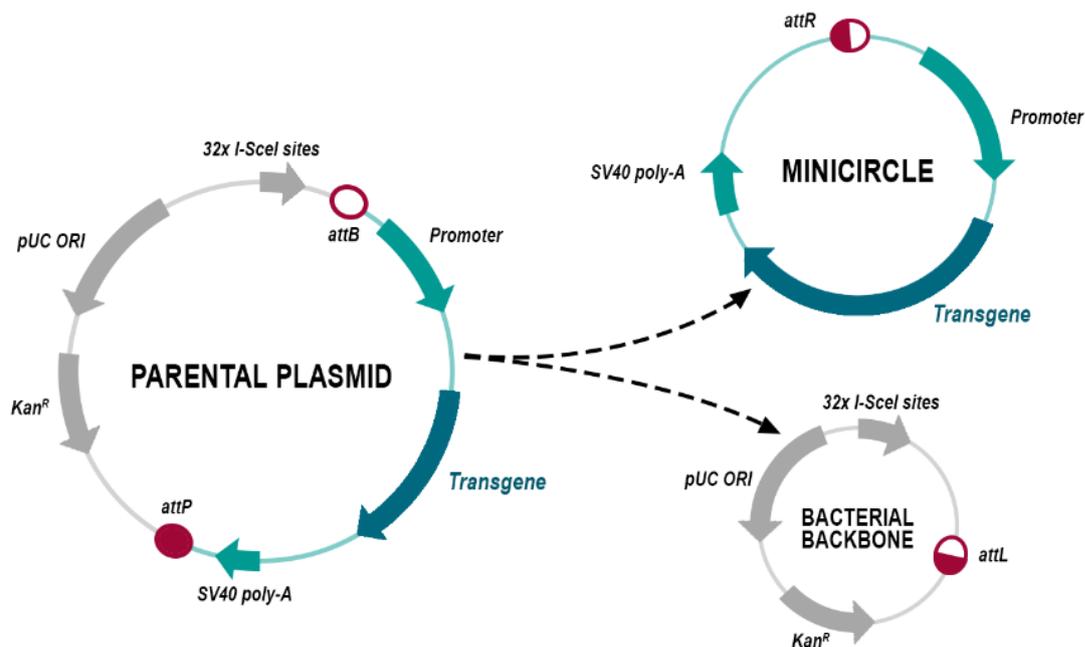


Abb. 10 Illustration der Minicircle-Bildung

Die Zugabe von L-Arabinose zu einer Kultur des *E. coli*-Stammes ZYCY10P3S2T induziert die Expression der Phagenintegrase PhiC31 und der Homing-Endonuklease I-SceI. Die Integrase bindet an attB und attP im Parental-Plasmid, bewirkt dort Strangbrüche und vermittelt anschließend die Rekombination zu Minicirceln und sogenannten Miniplasmiden (bakterielles Plasmid-Rückgrat inkl. Antibiotikaresistenz). Die Miniplasmide werden durch die I-SceI Endonuklease abgebaut (zahlreiche Erkennungsstellen verteilt über das bakterielle Rückgrat). *

*Abbildung (modifiziert durch Fabian Bülow) von der BioCat-Homepage [96].

2.3.1.1 Klonierung der RIP-Gene

Zu Beginn war die Erzeugung der sogenannten Parental-Plasmide für die spätere Herstellung von MC erforderlich. Dazu wurden die gewünschten Gensequenzen, welche für Ribosomen-inaktivierende Proteine (RIP) kodieren, von einem gegebenen Vektor (pET11d), in den speziellen Vektor pMC.CMV-MCS-SV40polyA (Produktbezeichnung MN501A1) kloniert.

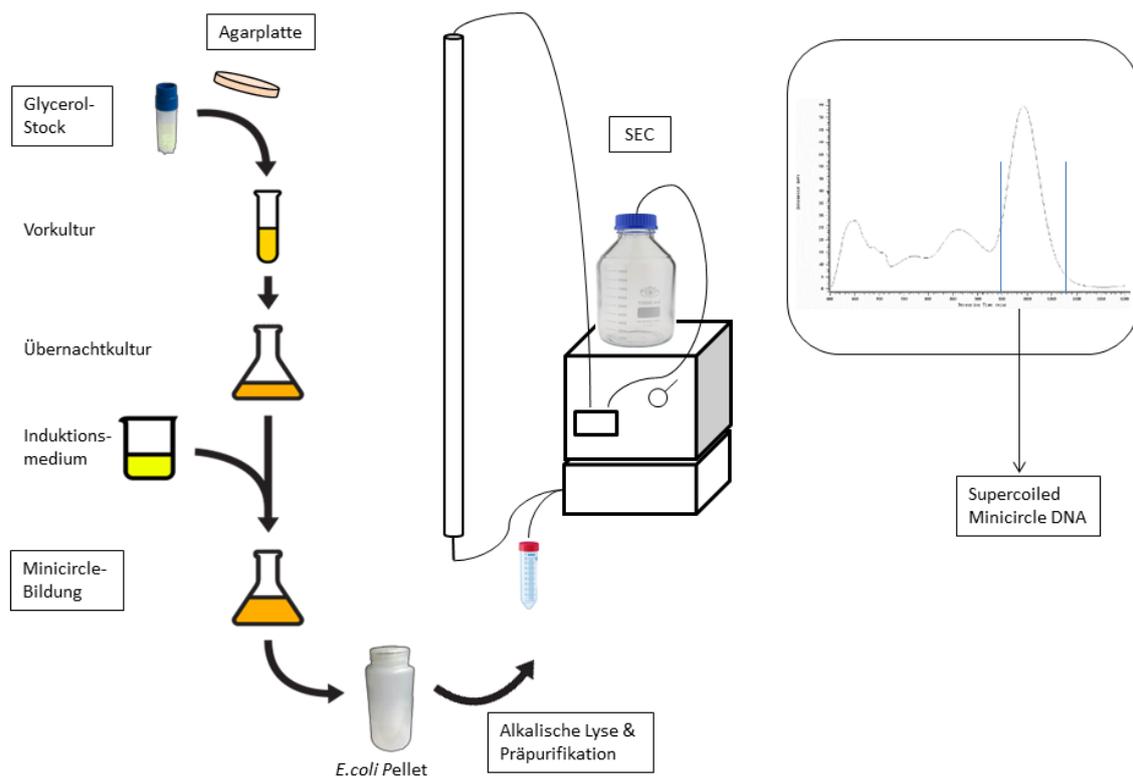


Abb. 11 Übersicht der Arbeitsschritte zur Herstellung von MC-DNA

Der mit Parental-Plasmid transformierte MC-Produktionsstamm wird aus einem angelegten Glycerol-Stock auf einer Agarplatte (LB-Agar mit 50 µg/L Kanamycin) ausplattiert und für max. 16 h bei 37°C inkubiert. Eine der gewachsenen Kolonien wird gepickt und zum Inokulieren der 2 mL Vorkultur (LB-Medium mit 50 µg/L Kanamycin) genutzt. Diese wird für 1 h bei 30 °C und 250 rpm inkubiert. 400 mL Wachstumsmedium werden mit 50 µL Vorkultur angeimpft und für 15,5 h bei 30 °C und 100 rpm inkubiert (Übernachtskultur). Nach Zugabe von 400 mL frisch hergestelltem Induktionsmedium wird für weitere 5 h bei 32 °C und 100 rpm inkubiert. In dieser Zeit werden die Minicircle gebildet. Anschließend folgen die Schritte Pelletieren, alkalische Lyse der Zellen & Präpurifikation der MC-DNA. Letzter Schritt ist die Isolierung der supercoiled Konformation mittels Größenausschlusschromatographie (SEC).

Die drei verwendeten Gensequenzen kodieren für Saporin aus *Saponaria officinalis* (Sap-3, [97]), Dianthin 30 [98] aus *Dianthus caryophyllus* und Gypsin aus *Gypsophila elegans* (Gypsophilin-S, [99]) und stammen demnach alle aus Vertretern der Caryophyllaceae. Als Ausgangsmaterial für die Klonierung standen die Plasmide pET11d-Saporin, pET11d-Dianthin und pRP-Gypsin zur Verfügung. Das Plasmid pET11d ist eine Abwandlung des Plasmids pBR322 und dient als bakterieller Expressions- und Klonierungsvektor. Bei pRP-Gypsin handelt es sich um einen mammalen Expressionsvektor, der bei der Online-Plattform „VectorBuilder“ in Auftrag gegeben wurde (inkl. Synthese der cDNA von Gypsophilin-S basierend auf der aufgeklärten Aminosäuresequenz [99]).

Zur Herstellung von GFP-Minicircle-DNA stand zusätzlich das Parental-Plasmid MN601A1 von SBI zur Verfügung, das bereits ein entsprechendes GFP-Gen trug.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels PCR wurde zunächst die zu klonierende Gensequenz („gene of interest“ (GOI)), hier das Gen, das für RIP kodiert, amplifiziert. Zur späteren Übertragung der Inserts in den mammalen Expressionsvektor für die MC-Produktion (MN501A1) wurden die dabei verwendeten Primer so konstruiert, dass mit ihnen (flankierend um das GOI) die Erkennungssequenzen für zwei Restriktionsendonukleasen (REN), welche in der „Multiple Cloning Site“ (MCS) von MN501A1 schneiden, in das Amplicon integriert wurden. Dabei wurde mit dem Forward-Primer die Erkennungssequenz von SallI und mit dem Reverse-Primer die Erkennungssequenz von NheI übertragen. Im Falle der Gypsin-Gensequenz wurde mit Hilfe des Forward-Primers zusätzlich das Start-Codon (ATG) sowie eine Sequenz, die für einen His-Tag (sechsmal aufeinander folgend Histidin) kodiert, eingefügt. Diese war in der Saporin- und Dianthin- Gensequenz von vornherein enthalten. Der His-Tag dient bei Bedarf der erleichterten Isolierung exprimierter Proteine durch Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen (Nickel).

Bevor die PCR durchgeführt werden konnte, mussten die nötigen Primer designt und bestellt werden (Synthese durch Metabion, Planegg, Deutschland). Unter Verwendung einer frei zugänglichen Software (PlasmaDNA, Helsinki, Finnland) wurden die Primer getestet und die geplante Klonierung erfolgreich simuliert und visualisiert.

PCR-Primer:

6His-Saporin

Forward-Primer:

ATT I GTC GAC I ATG GGA CAT CAT CAT CAT CAT C

T_m 63,8 GC 40,9

Reverse-Primer:

ATT I GCT AGC I TAC TTT GGT TTG CCC AAA TAC T_m 61,6 GC 40,0

6His-Dianthin

Forward-Primer:

ATT I GTC GAC I ATG GGA CAT CAT CAT CAT C T_m 63,8 GC 40,9

Reverse-Primer:

ATT I GCT AGC I TTA CTT CGG TCT ACC TAA ATA CTT AAG GAG CC T_m 67,4 GC 40,6

Gypsin

Forward-Primer:

ATT I GTC GAC I ATG CAT CAT CAT CAT CAT CAT ACC ACA ATT ACA TTA AAT CTG
GCT ACT CCG T_m 69,5 GC 40,0

Reverse-Primer:

ATT I GCT AGC I TAC TTC GGT CTA CCT AAA TAC ATA AGG AGC T_m 69,7 GC 45,5

Alle Primer sind der Konvention entsprechend in 5' – 3'-Richtung dargestellt.

Legende:

I XXXI Erkennungssequenz der REN

XXX 5'-Extension (beliebige Sequenz)

XXX Startcodon im Forward-Primer bzw. Stoppcodon im Reverse-Primer

XYZ Annealing-Sequenz

T_m Schmelztemperatur der Annealing-Sequenz [°C]

GC GC-Anteil der Annealing-Sequenz [%]

Beim Primerdesign ist folgendes zu beachten:

- 3'-Ende kritisch hinsichtlich Spezifität der PCR, vermieden werden sollte:
 - drei oder mehr G bzw. C (Stabilisierung unspezifischer Anlagerung möglich)
 - geringe T_m (erhöhte Gefahr für „Mispriming“)
 - Komplementarität innerhalb eines Primers (Bildung von Loops) bzw. zwischen beiden Primern (Bildung von Dimeren)

- 5'-Ende weniger kritisch für Primeranlagerung
 - Einfügen von Erkennungssequenzen von REN bzw. His-Tag
 - 5'-Extension von 2 – 10 Basen möglich zur Erhöhung der geringeren Effizienz der REN beim Schneiden am Ende von DNA-Fragmenten)
- Startcodon (ATG) im Forward-Primer
- Stoppcodon (CTA/TTA) im Reverse-Primer
- Überlappungssequenz mit dem „gene of interest“ (für diese soll gelten: Schmelztemperatur (T_m) beider Primer ähnlich ($\pm 2 - 4$ °C) und > 60 °C, GC-Gehalt 40 – 60 %)
- Kompatibilität beider REN hinsichtlich Puffer
- Auswahl von REN, die den Zielvektor nur einmal (innerhalb der MCS) und nicht innerhalb des „gene of interest“ schneiden
- unterschiedliche „Sticky Ends“ durch die REN (andernfalls kann das spätere Insert auch in falscher Orientierung ligiert werden)

Tab. 1 PCR-Protokoll

Komponente	Volumen [μ L]	Endkonzentration
Nuklease-freies Wasser	ad 50	
5x PolyPuffer	10	1x
dNTP 10 mM	1	200 μ M
Forward-Primer 10 μ M	2,5	0,5 μ M
Reverse-Primer 10 μ M	2,5	0,5 μ M
DNA (je nach Ansatz)		ca. 1 ng/ μ L
pET11d_6His-Saporin (563,2 ng/ μ L)	1 (1/100-Verdünnung)	5,63 ng/50 μ L
pET11d_6His-Dianthin (92,6 ng/ μ L)	3 (1/50 Verdünnung)	5,56 ng/50 μ L
pRP_Gypsin (957 ng/ μ L)	3 (1/500 Verdünnung)	5,74 ng/50 μ L
Phusion DNA-Polymerase 2 u/ μ L	0,5	1,0 u/50 μ L

Die PCR-Ansätze wurden der dargestellten Reihenfolge entsprechend zusammenpipettiert.

Tab. 2 PCR-Bedingungen

Phase der PCR	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	98 °C	30 sec	
PCR-Zyklus	Denaturierung	98 °C	10 sec
	Annealing	66 °C	20 sec
	Elongation	72 °C	25 sec/kbp
Finale Elongation	72 °C	5 min	
Hold	4 – 10 °C		

PCR-Phasen:

Durch das initiale Aufheizen wird der DNA-Doppelstrang aufgespalten. Danach wiederholen sich zyklisch Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsphase. Annealing bedeutet Anlagern der Primer an komplementäre DNA-Abschnitte. Die Annealing-Temperatur hängt von Art und Konzentration der Primer sowie von der verwendeten DNA-Polymerase ab (Bestimmung mit Hilfe des Onlinetools „NEB T_m Calculator“). Die DNA-Polymerase ist bei 72 °C aktiv und verlängert die DNA-Stränge während der Elongation mit passenden Nukleotiden. Am Ende wird eine längere Elongationsphase angefügt, bevor die Reaktion unter Kühlung gestoppt wird.

Sequenzierungsprimer:

Zusammen mit den PCR-Primern wurden auch die Primer für die spätere Sequenzierung entworfen und bestellt:

Forward-Primer MN501A1 (hybridisiert vor dem Insert)

CGC TGT TTT GAC CTC CAT AGA AGA TTC T_m 69,3 GC 44,4

Reverse-Primer MN501A1 (hybridisiert nach dem Insert)

GCA GCG TAT CCA CAT AGC GTA AA T_m 67,0 GC 47,8

Die Sequenzierungsprimer binden jeweils an eine Basensequenz des Parental-Plasmids MN501A1, vor (Forward-Primer) bzw. nach (Reverse-Primer) dem Insert. Um eine sichere Sequenzierung über die gesamte Länge des Inserts zu gewährleisten, wurden pro Insert zwei zusätzliche Primer designt, die ca. in der Mitte der Gensequenz binden.

6His-Saporin (792 bp)

Forward-Primer-Mitte (hybridisiert ab bp 451):

TTG GGG ATC GAC TTA CTT TTG ACG T_m 68,9 GC 45,8

Reverse-Primer-Mitte (hybridisiert ab bp 450):

CCC GAG TTC TTT TCT ACT TTT ATC TCC C T_m 67,5 GC 42,9

6His-Dianthin (795 bp)

Forward-Primer-Mitte (hybridisiert ab bp 441):

AGT AGA AAG GAA CTC GGT TTG GGG T_m 68,2 GC 50,0

Reverse-Primer-Mitte (hybridisiert ab bp 440):

TTG ATC GCC TGT TGT TAT CTT GGC T_m 69,9 GC 45,8

6His-Gypsin (780 bp)

Forward-Primer-Mitte (hybridisiert ab bp 316):

AGT TAA CCA CCC TTT TCC CCG

T_m 67,1 GC 52,4

Reverse-Primer-Mitte (hybridisiert ab bp 315):

CGA CGG TGG TAA TTT GAT TTT TG

T_m 66,1 GC 39,1**2.3.1.2 Agarose-Gelelektrophorese**

Auf die PCR folgte die elektrophoretische Auftrennung der erhaltenen Nukleinsäuren mittels Agarose-Gelelektrophorese. Damit sollte eine Trennung der amplifizierten DNA-Sequenz von Plasmid-DNA, unverwerteten Primern und sonstiger DNA erreicht werden. Die Trennung wurde realisiert, indem das Gemisch von Nukleinsäuresträngen unterschiedlicher Länge nach dem Mischen mit einem Ladepuffer in die Probentaschen eines 1%igen Agarosegels (0,2 µg/mL EtBr) gegeben und anschließend in einem elektrischen Feld (110 V Spannung) 60 Minuten in TAE-Puffer, der auch dem Aufkochen der Agarose diente, laufen gelassen wurde. Die Nukleinsäuremoleküle wandern abhängig von ihrer Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Gel, ihrer negativen Ladung entsprechend in Richtung Pluspol (Anode). Kleinere Moleküle wandern schneller durch die Gelmatrix. Die erhaltenen Banden wurden auf einem UV-Transilluminator bei 365 nm sichtbar gemacht und die Größe der entsprechenden DNA-Moleküle durch Vergleich mit den Banden einer mitgelaufenen DNA-Leiter „100 bp DNA Ladder extended“ näherungsweise ermittelt.

2.3.1.3 DNA-Gelextraktion

Das durch Agarose-Gelelektrophorese isolierte PCR-Produkt musste für die weitere Verwendung aus dem Gel extrahiert werden. Dazu wurden die entsprechenden Banden mit einem Skalpell auf dem UV-Transilluminator aus dem Gel herausgeschnitten und zur Extraktion des PCR-Produkts mit Hilfe des „GeneJET Gel Extraction Kit“ unter Anwendung des Zentrifugen-Protokolls des Kit-Manuals verwendet. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte anschließend mittels Mikroküvette (2,5 µL Probenvolumen) am BioSpectrometer oder am Nanodrop™ One Spectrophotometer mit 1 µL Probenvolumen.

2.3.1.4 Zwischenklonierung in pJET-Vektor

Anstatt das PCR-Produkt zu schneiden und direkt in den Zielvektor (MN501A1) zu ligieren, wurde es zunächst unter Verwendung des „CloneJET PCR Cloning Kit“ von Thermo Fisher in den dazugehörigen Vektor pJET 1.2/blunt ligiert. In diesen Vektor lassen sich auch PCR-Produkte (glatte Enden) ligieren. Zudem verfügt er über eine integrierte Positiv-Selektion durch Bildung eines letalen

Restriktionsenzym, wenn keine Ligation eines Inserts erfolgte. Mit dieser Zwischenklonierung wurden folgende Ziele verfolgt:

- Sicherstellung einer ausreichenden Insert-Menge für die Klonierung in den Zielvektor durch vorherige Amplifikation in *E. coli* Dh5a und
- Realisierung einer Erfolgskontrolle der Restriktion mittels Agarose-Gelelektrophorese (sichtbarer Unterschied zwischen Vektor und herausgeschnittenem Insert).

Das gängige molare Vektor-Insert-Verhältnis beträgt 1:3. Ausgehend von 50 ng einzusetzendem Vektor (pJET1.2/blunt) wurde mit Hilfe des Online-Tools „Ligation Calculator“ (Uni Düsseldorf) basierend auf der Vektor- und Insertgröße (bp) die jeweils einzusetzende Menge an Insert (in ng) berechnet. Um die Erfolgchance zu vergrößern, wurde auch das Vektor-Insert-Verhältnis 1:6 sowie 1:9 angewendet.

Tab. 3 Berechnung der einzusetzenden Insertmassen für die Ligation in pJET1.2/blunt

	Saporin	Dianthin	Gypsin
Vektorgröße (pJET1.2/blunt)	2974 bp		
Insertgröße	809 bp	813 bp	797 bp
Vektormasse	50 ng		
Insertmasse [ng] 1:3	40,8	41,0	40,2
Insertmasse [ng] 1:6	81,6	82,0	80,4
Insertmasse [ng] 1:9	122,4	123	120,6

Tab. 4 Protokoll der Ligation in den pJET1.2/blunt-Vektor

Komponente	Volumen [μ L]
Nuklease-freies Wasser	ad 20
10 x Ligationspuffer	2
Insert	je nach Konz. des Inserts entsprechend der kalkulierten Insertmasse (Tab. 3)
pJET1.2/blunt-Vektor (50 ng/ μ L)	1
T4-DNA-Ligase	1

Die Ligationsansätze wurden der dargestellten Reihenfolge entsprechend zusammenpipettiert. Das Kit-Manual gibt eine Inkubation von 5 min bei 22 °C vor. Hingegen empfiehlt New England Biolabs eine 2-stündige Inkubation bei Raumtemperatur oder eine Inkubation ü. N. bei 16 °C. Bei der Ligation der PCR-Produkte in den pJET-Vektor führte eine 1,5-stündige Inkubation bei RT zum Erfolg. Es sollte beachtet werden, dass der Ligationspuffer u. a. ATP enthält, welches durch wiederholte Gefrier-Tau-Zyklen degradiert. Daher ist es sinnvoll, den Ligationspuffer zu aliquotieren und jedes Aliquot nur einmalig zu verwenden.

Transformation von *E. coli* Dh5 α mit pJET-Konstrukten

Unmittelbar im Anschluss an die Ligation erfolgte die Transformation kompetenter *E. coli* Dh5 α . Dazu wurde für jedes pJET-Konstrukt (Sap, Dia, Gyp) und jedes Vektor-Insert-Verhältnis ein 40 μ L Aliquot kompetenter *E. coli* Dh5 α mit 5 μ L Ligationsansatz sanft durch kurzes Rühren mit der Pipettenspitze vermischt. Es ist darauf zu achten, die empfindlichen kompetenten Bakterien sehr vorsichtig zu behandeln und sofort nach dem Auftauen auf Eis (Lagerung bei -80 °C) mit Ligationsansatz zu versetzen. Anschließend wurden die Zellen für 30 min auf Eis gestellt. Es folgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C und weitere 2 min auf Eis. Danach wurden 200 μ L SOC-Medium zugegeben und die Zellen für 30 min in einen Thermoschüttler gestellt (37 °C, 225 rpm). Schließlich wurden je 150 μ L der Transformationsansätze auf einer LB-Agarplatte (50 μ g/mL Ampicillin) mittels Drigalskispatel ausplattiert und ü. N. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Es kann Erfolg versprechend sein, die Restvolumina der Transformationsansätze ü. N. bei RT stehenzulassen und am nächsten Tag auszuplattieren, falls keine Bakterienkolonien auf den Agarplatten gewachsen sind.

Nur *E. coli*, die erfolgreich mit pJET-Plasmid transformiert wurden, welches auch ein Ampicillin-Resistenzgen trägt, können auf der Ampicillin-haltigen Agarplatte wachsen. Die Transformation mit „leeren“ pJET-Plasmiden ohne Insert führt nicht zum Wachstum, weil das pJET-Plasmid außerdem ein Gen trägt, das für ein letales Restriktionsenzym kodiert. Erst durch Ligation des Inserts wird dieses Gen „ausgeschaltet“.

2.3.1.5 Plasmidpräparation

Die infolge erfolgreicher Transformation entstandenen Bakterienkolonien wurden mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte aufgenommen und zum Animpfen von jeweils 2 mL LB-Medium (50 μ g/mL Ampicillin) in 10 mL Kulturröhrchen genutzt. Die Flüssigkulturen wurden für 6 h bei 37 °C und 225 rpm im Standschüttler inkubiert. Anschließend wurden mit je 100 μ L dieser Flüssigkulturen größere Ansätze (100 mL LB-Medium mit 50 μ L Ampicillin/mL in 500 mL-Kulturkolben) angeimpft, die bei 37 °C und 180 rpm ü. N. inkubiert wurden. Mit je 50 mL dieser Kulturen wurde die Plasmidpräparation durchgeführt (Midiprep), um die pJET-Plasmide zu isolieren. Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit (A260/ A280) erfolgte küvettenlos mit dem UV-Vis Spectrophotometer NanoDrop™ One unter Verwendung von 1 μ L DNA-Lösung.

2.3.1.6 Glycerol-Stocks

Von allen transformierten *E. coli* wurden zur Langzeitlagerung sog. Glycerol-Stocks hergestellt. Dazu wurden 500 μ L Übernachtskultur mit 500 μ L 50 % Glycerol in einem 2 mL Kryoröhrchen vorsichtig vermischt. Anschließend wurde das Kryoröhrchen ca. sechsmal invertiert, bis keine Schlieren oder Schichten mehr erkennbar waren. Danach wurde es bei -80 °C eingefroren. Bei Nutzung der Glycerol-Stocks ist zu beachten, dass sie nur so kurz wie möglich aus der Tiefkühltruhe

entnommen werden und keineswegs auftauen sollten. Mit einer sterilen Pipettenspitze oder Impföse kann rasch etwas erweichtes Material von der Oberfläche gekratzt werden, bevor das Kryoröhrchen schnellstmöglich wieder eingefroren wird.

2.3.1.7 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden von der LGC Genomics GmbH (Ostendstr. 25, 12459 Berlin, Deutschland) durchgeführt. Zur Probenvorbereitung wurde Plasmid-DNA, Nuklease-freies Wasser und ein passender Primer in einem 1,5 mL-Reagiergefäß ad 14 µL zusammenpipettiert, sodass die finale DNA-Konzentration ca. 100 ng/µL und die Primerkonzentration 5 µM betrug. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software „DNA Baser Sequence Assembler“.

2.3.1.8 Restriktionsverdau

Ein Verdau mit Restriktionsendonukleasen in Verbindung mit einer Agarose-Gelelektrophorese wurde zu unterschiedlichen Zwecken durchgeführt: erstens zur Linearisierung von Plasmiden (einfacher Verdau), um die tatsächliche Größe durch Vergleich mit der Laufstrecke der Banden der DNA-Leiter zu ermitteln, denn das intakte Plasmid nimmt ansonsten verschiedene Konformationen an (supercoiled und offenkettig), die sich unterschiedlich schnell durch das Agarosegel bewegen; oder zweitens, um ein Insert herauszuschneiden (zweifacher Verdau) und elektrophoretisch zu isolieren. Es wurden dazu „high-fidelity“ (HF)-Restriktionsendonukleasen von New England Biolabs verwendet, die zum einen eine hohe Spezifität (keine „star activity“) aufweisen, zum anderen den Vorteil haben, alle im selben Puffer (CutSmart) angewendet werden zu können, womit sich bei Verwendung mehrerer verschiedener Restriktionsendonukleasen aufeinander folgende Inkubationen in unterschiedlichen Puffern erübrigen.

Für Restriktionen zu analytischen Zwecken wurden 50 µL-Ansätze mit 1 µg DNA und 0,5 µL Restriktionsenzym bzw. 20 µL-Ansätze mit entsprechend weniger DNA und Enzym verwendet. Auf eine einstündige Inkubation bei 37 °C folgte eine 15-minütige Inaktivierung bei 80 °C. Die Ansätze wurden mit 6x-Ladepufferkonzentrat versetzt und in die Geltaschen injiziert.

Die mit der Klonierungs-PCR eingefügten Schnittstellen für SalI und NheI konnten jetzt genutzt werden, um das Insert in die MCS des Parental-Plasmid-Präkursors (MN501A1) zu ligieren. Um ausreichend Insert zu gewinnen, wurden große Restriktionsansätze (200 µL mit 16 µg DNA) der drei pJET-Plasmide (pJET-Sap, pJET-Dia, pJET-Gyp) realisiert.

Tab. 5 Protokoll des Restriktionsverdaus von pJET-Plasmiden und Parental-Plasmid-Präkursor

Restriktionsansätze	Komponente [μ L]				
	Nuklease-freies Wasser	10x CutSmart Puffer	DNA	SaII-HF	NheI-HF
pJET-Sap	157,9	20	18,1 (884 ng/ μ L)	1,5	1,5
pJET-Dia	161,3	20	14,7 (1092 ng/ μ L)	1,5	1,5
pJET-Gyp	161,7	20	14,3 (1120 ng/ μ L)	1,5	1,5
MN501A1	61,7	20	114,3 (140 ng/ μ L)	1,5	1,5

Die Restriktionsansätze wurden der dargestellten Reihenfolge entsprechend zusammenpipettiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Restriktionsendonukleasen für 20 min bei 80 °C inaktiviert. Danach wurden jeweils 100 μ L der Ansätze mit 6x Ladepuffer vermischt, auf zwei Spuren aufgeteilt (je 60 μ L) in die Ladetaschen eines größeren Agarosegels (75 mL, 1 % Agarose, 0,2 μ g/mL EtBr) pipettiert und bei 100 mV 60 min elektrophoretisch aufgetrennt.

2.3.1.9 Ligation der Inserts in MN501A1 und Transformation von *E. coli* Dh5a

Analog zur Ligation der PCR-Produkte in den pJET-Vektor wurden zunächst mit Hilfe des „Ligation Calculator“ die einzusetzenden Insertmassen für verschiedene Vektor-Insert-Verhältnisse kalkuliert.

Tab. 6 Berechnung der einzusetzenden Insertmassen für die Ligation in MN501A1

	Saporin	Dianthin	Gypsin
Vektorgröße (MN501A1)	5752 bp		
Insertgröße	797 bp	801 bp	785 bp
Vektormasse	50 ng		
Insertmasse [ng] 1:3	20,8	20,9	20,5
Insertmasse [ng] 1:6	41,6	41,8	41,0
Insertmasse [ng] 1:9	62,4	62,7	61,5

Die Ligationsansätze (jeweils 20 μ L) wurden der in Tab. 7 dargestellten Reihenfolge entsprechend zusammenpipettiert und ü. N. bei 16 °C im PCR-Cycler inkubiert, bevor die T4-Ligase für 10 min bei 65 °C inaktiviert wurde.

Tab. 7 Protokoll der Ligation in MN501A1

Komponente	Volumen [μ L]
Nuklease-freies Wasser	ad 20
10 x Ligationspuffer	2
Insert	je nach Konz. des Inserts entsprechend der kalkulierten Insertmasse (siehe Tab. 6)
MN501A1 (50 ng/ μ L)	1
T4-DNA-Ligase	1

Die anschließende Transformation von *E. coli* Dh5 α erfolgte analog zur Zwischenklonierung (siehe 2.2.2.6), jedoch unter Verwendung von nur 3 μ L Ligationsansatz.

Gewachsene Kolonien wurden wiederum in Flüssigkulturen vermehrt und diese zur Durchführung einer Plasmidpräparation genutzt. Anschließend folgte analog zur Zwischenklonierung die Erfolgskontrolle mittels Restriktion/Agarose-Gelelektrophorese sowie Sequenzierung (Forward-Primer MN501A1). Wie sich zeigte, bindet der Forward-Primer MN501A1 zu dicht am Beginn der Gensequenzen, wodurch das Sequenzierungsergebnis in diesem Bereich unsicher wird. Daher wurde zusätzlich mit dem entsprechenden Reverse-Primer-Mitte sequenziert. Glycerol-Stocks der transformierten *E. coli* Dh5 α wurden angelegt.

2.3.1.10 MC-Produktion mit dem „MC-Easy Minicircle DNA Production Kit“ von SBI

Das verwendete MC-Produktions-Kit ermöglichte lediglich 5 Ansätze. Zunächst wurden Saporin-Minicircle (MC-Sap) produziert. Dabei wurde das Hersteller-Protokoll befolgt. Die wichtigsten Schritte waren:

- 1) Transformation des MC-Produktionsstamms *E. coli* ZYCY10P3S2T mit dem entsprechenden Parental-Plasmid,
- 2) Ansetzen der Vorkultur durch Inokulieren von 2 mL LB-Medium (50 μ g/mL Kanamycin) mit einer von der Agarplatte abgestriffenen Bakterienkolonie bzw. einer Impföse voll mit Material aus einem Glycerol-Stock, Inkubation bei 30 °C und 250 rpm für 4-6 h*),
- 3) Animpfen von 200 mL „Wachstumsmedium“ mit 0,5-1 mL*Vorkultur, Inkubation ü. N. (max. 16 h) bei 30 °C und 250 rpm,
- 4) Kontrolle von pH-Wert (SOLL: ca. 7) und OD₆₀₀ (SOLL: 4-6),
- 5) Zugabe von 200 mL „Induktionsmedium“, Inkubation bei 250 rpm für 3 h bei 30 °C, gefolgt von 1 h bei 37 °C,
- 6) Abzentrifugieren der Bakterien bei 6000 g und 4 °C für 20 min
- 7) Präparieren der MC-DNA mittels Plasmid-Präparationskits unter Verwendung doppelter Puffervolumina oder Einfrieren der Pellets zur späteren Verwendung.
- 8) Ggf. Entfernung von Kontaminationen mit genomischer DNA/Parental-Plasmid mittels beiliegender DNase sowie anschließender Entfernung ebendieser

***Achtung:**

Wie sich herausstellte, ist sowohl die Inkubationsdauer der Vorkultur als auch das Volumen zum Animpfen der Hauptkultur, wie sie in den Herstellerangaben (SBI) vorgegeben werden, wesentlich zu groß (4-6 h, korrekt ist 1h sowie 0,5-1 mL, korrekt ist 20 μ L). Dies führte wiederholt zu bedeutender Überschreitung der gewünschten OD₆₀₀ (4-6) am Ende der Inkubationsdauer der Hauptkultur und damit zum Scheitern des Ansatzes!

2.3.1.11 MC-Produktion ohne Kit

Um weitere MC-Konstrukte zu generieren und zu produzieren, wurde eine Kit-unabhängige Produktionsmethode entwickelt. Dabei wurde hinsichtlich MC-Herstellung im Wesentlichen auf eine Publikation von Kay et al. [82] aufgebaut. Für die MC-Isolierung wurde eine Größenausschlusschromatographie auf Sephacryl S-1000 SF [100] mit vorgeschalteter Prä-Purifikation der Minicircle-DNA angewendet und optimiert [101].

Die Entwicklung und Optimierung der Kit-unabhängigen Herstellung und Isolierung von MC-DNA im Labormaßstab wurde im „International Journal of Pharmaceutics“ veröffentlicht [95], inkl. eines Schritt-für-Schritt-Protokolls im Supplement-Teil, das im Folgenden aufgeführt ist.

Tab. 8 Protokoll zur Herstellung und Isolierung von Minicircle-DNA

(für 2 x 400 mL Übernachtskultur)

Tag 1	Vermehrung der Bakterien
17:00 Uhr	Glycerol-Stock auf LB-Agarplatte (50 µg/mL Kanamycin) ausstreichen.
	Cave: Ausplattierte Bakterien müssen bei 4 °C gelagert und innerhalb von 5 Tagen weiterverarbeitet werden.
Tag 2	
09:30 Uhr	Agarplatte mit Parafilm verschließen und in den Kühlschrank überführen.
17:00 Uhr	Vorkultur: 1 KBE spicken (nur antippen, nicht zuviel!) und damit 2 mL LB-Medium (50 µg/mL Kanamycin) inokulieren.
	<i>Inkubation: 1 h, 30 °C, 250 rpm</i>
18:00 Uhr	Animpfen von 2 x 400 mL Wachstumsmedium in 2 L-Kulturkolben (mit Schikanen) mit je 50 µL Vorkultur.
	<i>Inkubation: 15,5 h, 30 °C, 100 rpm</i>
Tag 3	MC-Induktion
09:30 Uhr	Bestimmung von pH-Wert und OD ₆₀₀ der Übernachtskultur (Sollwerte: pH 6-7, OD ₆₀₀ 4-5).
	Zugabe von je 400 mL Induktionsmedium .
	<i>Inkubation: 5 h, 32 °C, 100 rpm</i>
15:00 Uhr	Überführen der Bakteriensuspension in 500 mL-Zentrifugenbecher (JA 10 Rotor), Austarieren der Becherpaare.
	<i>Zentrifugation: 6000g, 4 °C, 20 min</i>
	Überstand verwerfen, Pellets einfrieren.
Tag 4	Alkalische Lyse
Zugabe von:	
50 mL P1	Resuspendieren der Pellets durch kräftiges Vortexen.
50 mL P2	Vorsichtiges Mischen durch Invertieren (sofort nach Zugabe), kein Vortex!

	<i>Inkubation: 5 min bei RT</i>
50 mL P3	Puffer vorkühlen, vorsichtiges Mischen durch Invertieren, kein Vortex!
	<i>Inkubation: 20 min auf Eis.</i>
	<i>Zentrifugation: 17700 g, 4 °C, 60 min</i>
	Überstand durch einen feinen Teefilter aus Edelstahl dekantieren in 4 neue 500 mL Zentrifugenbecher.
Präzipitation	Zugabe von 110 mL 2-Propanol (0,7 Volumen; vorgekühlt auf -20 °C).
	<i>Inkubation: 2 h bei -20 °C</i>
	<i>Zentrifugation: 17700 g, 4 °C, 30 min</i>
	Überstand verwerfen, Pellets ü. N. an der Luft trocknen (oder nur einige Stunden, um sie leichter wieder auflösen zu können).
Tag 5	Prä-Purifikation & Wiedergewinnung der Plasmid-DNA
	Jedes Pellet in jeweils 20 mL TE-Puffer lösen (ggf. 1h bei RT quellen lassen, dann mit Hilfe einer 10 mL serologischen Pipette & Pipetteboy homogenisieren.
	In 4 Zentrifugenröhrchen für den JA-25.50 Rotor (Röhrchen aus PPCO für bessere Pellets) überführen, die bereits mit 3,9 g Ammoniumacetat gefüllt sind (Zielkonz. 2,5 M), vortexen!
	<i>Inkubation: 15 min auf Eis</i>
	<i>Zentrifugation: 20000 g, 4 °C, 30 min</i>
	Überstand (22 mL) in neue JA-25.50 Röhrchen überführen.
	Zugabe von 0,5 Volumen (11 mL) 30 % PEG8000/1,6 M NaCl-Lösung, einige Male invertieren. <i>Inkubation ü. N. bei 4°C</i>
Tag 6	<i>Zentrifugation: 22000 g, 4 °C, 30 min</i>
	Überstand verwerfen, restliche PEG-Lösung sorgfältig durch Abpipettieren entfernen.
	Alle 4 Pellets zusammen in 1 mL TE-Puffer lösen.
Dialyse	Tube-O-Dialyzer Medi (MWCO: 50 kDa), Mobile Phase der SEC als Dialysierflüssigkeit, min. 6 h, Puffer min 1x erneuern.
	Größenausschlusschromatographie (SEC)
17:00 Uhr	<i>Probe: 1 mL MC-angereicherte Lösung (Konz. 10-12 µg/µL)</i>
	<i>Mobile Phase: TE-Puffer mit 0,1 M NaCl (pH 8,0)</i>
	<i>Säule: 2,5 x 100 cm (YMC Eco Glass Column), Betthöhe: 95 cm</i>
	<i>Stationäre Phase: Sephacryl S-1000 SF</i>
	<i>Flussrate: 0,3 mL/min</i>
	Kalkulierte molare Masse (660 g/mol pro bp), vergleichbare Proteingröße* (entscheidend für MWCO bei UF) und geschätzte Zeit bis Elutionsbeginn der sc-Konformation für verschiedene Plasmidgrößen: (*basierend auf: www.genscript.com/conversion.html)

	3400 bp	2,244 x 10 ⁶ g/mol	126 kDa*	15 h
	2500 bp	1,65 x 10 ⁶ g/mol	93 kDa*	16 h
	1500 bp	9,9 x 10 ⁵ g/mol	56 kDa*	18 h
Tag 7	Ultrafiltration (UF)			
	Merck Amicon ultra 15 (MWCO: 30 kDa)			
	Zuerst Probe aufkonzentrieren, dann entsalzen mit 3 Läufen à 10 mL hochreinem Wasser (steril, Nuklease-frei, Endotoxin-frei)			
	<i>Zentrifugation: 20 °C, 4000-5000g, ca. 10 min pro Lauf</i>			
UV-spektroskopische Konzentration- und Reinheitsbestimmung (Cave: Ergebnisse nur in TE-Puffer vergleichbar!)				
Agarose-Gelelektrophorese des Endprodukts im Vgl. zur SEC-Probe (unverdaut und verdaut)				

2.3.2 Zielgerichtete Nanoplexe mit Suizid-Nanoplasmiden

Nanoplasmide

Unter Ausnutzung vorhandener Schnittstellen (Sall/XbaI) in den entsprechenden pJET-Plasmiden wurde das Saporin- bzw. Gypsin-Gen durch NTC in einen Nanoplasmid-Vektor kloniert. NTC produzierte und lieferte die Nanoplasmide NTC9385R-Gyp-BGH pA (2573 bp) und NTC9385R-Sap-BGH pA (2585 bp) sowie des Weiteren NTC9385R-eGFP-BGH pA (2487 bp) mit dem eGFP-Gen als Reporter gen für die Zellkulturversuche. Die Transgene standen unter Kontrolle des chimären Promotors CMV HTLV-I.

Formulierung zielgerichteter Nanoplexe

Die Nanoplasmid-DNA wurde als Nanoplex-Formulierung (komplexiert durch Peptid Y) sowohl in Zellkulturexperimenten als auch *in vivo* in einem Tierversuch mit Mäusen getestet. Peptid Y (GeneCust, Boynes, Frankreich) entspricht dem Polylysin K16, welches um eine Aminosäuresequenz (GACYGLPHKFCG) ergänzt worden ist, die von Integrin-Rezeptoren gebunden wird oder *vice versa*. Da diese Rezeptoren in Tumoren häufig überexprimiert sind, wirken die mit Peptid Y formulierten Nanoplexe zumindest teilweise zielgerichtet, was die Transfektionseffizienz entsprechender Nanoplexe verbessern soll [102]. Die Partikelformulierung erfolgte wie unter 2.3.3.1 beschrieben, für die *in vitro* Experimente im Massenverhältnis von 7:1 und für den *in vivo* Versuch im Massenverhältnis von 4:1 (Peptid Y:DNA), entsprechend einem N/P-Verhältnis von 11,7 bzw. 6,4.

2.3.3 Nanopartikeläre DNA-Formulierungen

2.3.3.1 Polyplexe/Nanoplexe (PD)

Polyplexe (PD) entstehen durch Komplexieren der vielfach negativ geladenen DNA (D) mit mehrfach positiv geladenen Polymeren (P) wie den Polylysinen K16 bzw. Peptid Y (16 positive Ladungen in Reihe). Beim Mischen der Komponenten entstehen im Zuge einer Selbstassemblierung nanoskalige Partikel. Aufgrund dessen werden sie auch als Nanoplexe bezeichnet.

Für die Herstellung von PD wurden gleiche Volumina einer K16- (oder Peptid Y-) und einer DNA-Lösung (jeweils in Reinstwasser) in einem Massenverhältnis (wenn nicht anders angegeben) von 4:1 ($N/P = 10,85$ bei Verwendung von K16 bzw. $N/P = 6,4$ bei Verwendung von Peptid Y) durch 20-mal Auf- und Abpipettieren gemischt. Danach folgten 30 min Inkubation bei Raumtemperatur.

2.3.3.2 Lipoplexe (LD)

Es wurden DOTAP-Liposomen sowie Liposomen aus verschiedenen molaren Verhältnissen von DOTAP und anderen Lipiden entsprechend einer Konzentration von 1 mg/mL DOTAP hergestellt und für die Formulierung von Lipoplexen für die *in vitro* Transfektion verwendet.

Präformulierte kationische Liposomen

Das kationische Lipid DOTAP wurde als Feststoff in einen 10 mL Rundkolben eingewogen (2 mg) und in 2 mL Chloroform gelöst. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel restlos entfernt. Der entstandene Lipidfilm an der Glaswand des Rundkolbens wurde anschließend in 2 mL sterilfiltriertem Milli-Q-Wasser hydratisiert, um eine DOTAP-Konzentration von 1 mg/mL zu erreichen. Diese Vorgehensweise zur Gewinnung von Liposomen ist als **Lipidfilmmethode** bekannt. Nach kurzem Quellen der Lipidschicht unter gelegentlichem Schwenken wurde der Rundkolben für 5 min in ein Ultraschallbad gehängt. Danach wurde ein Teil der Lösung durch einen 0,22 µm Spritzenvorsatzfilter filtriert, der andere Teil nicht. Die Filtration wird in einem Protokoll („Preparation of Cationic Liposomes & Transfection of Cells“) von Avanti Polar Lipids (www.avantilipids.com) als optional aufgeführt und sollte in ihren Auswirkungen auf die Transfektionseffizienz untersucht werden.

Die Lagerung der kationischen Liposomen ist im Kühlschrank über viele Wochen möglich. Nach Vorgaben aus einer Gebrauchsanweisung für DOTAP-Liposomen (1 mg/mL) von Carl Roth (zur Transfektion eukaryotischer Zellen) wurden zur Komplexierung von 2,5 µg DNA 16 µg DOTAP verwendet. Dies entspricht einem N/P-Verhältnis von 3. Für Mischungen aus DOTAP und anderen Lipiden wurden die entsprechenden Chloroformlösungen vor der Filmbildung im gewünschten Verhältnis gemischt. Die absolute DOTAP-Konzentration der Liposomen-Formulierungen betrug

stets 1 mg/mL. Neben DOTAP zählt DOTMA zu den ältesten zur Lipofektion genutzten kationischen Lipiden [103].

Präformulierte Liposomen aus DOTAP/Lipid-AG1856-Konjugat

Präformulierte Liposomen durch Lipidfilmmethode im HPLC-Vial. DOTAP (1 mg/mL in Chloroform) wurde in verschiedenen molaren Verhältnissen von 100:0,5 bis 100:2 mit Konjugat (0,1 mg/mL in Chloroform/Methanol (9:1)) in Vials gespritzt (mit Hamilton-Mikroliterspritzen). Anschließend wurde der Lipidfilm mittels SpeedVac erzeugt, in 50 µL sterilem Reinstwasser hydratisiert, 5 min Ultraschallbad ausgesetzt. Die Liposomen wurden kurz anzentrifugiert und zur Formulierung von Lipoplexen verwendet.

Formulierung der Lipoplexe für die Transfektion

Die DNA wurde in einem sterilen 1,5 mL Reagiergefäß ad 25 µL mit sterilem Reinstwasser verdünnt, die Liposomenpräparation in einem anderen Reagiergefäß (oder HPLC-Vial) ad 50 µL. Anschließend wurde die DNA-Lösung zu den kationischen Liposomen gegeben und die Mischung sanft einige Male auf- und abpipettiert (kein Vortexen oder Zentrifugieren). Nach 10 min Inkubation bei RT wurden die Lipoplexe mit Medium (mit oder ohne AG1856) verdünnt und für Transfektionsversuche in 48 Well-Platten verwendet.

2.3.3.3 Lipid-Nanopartikel (LNP)

Hintergrund der Methodik:

Das praktische Vorgehen zur Formulierung von LNP wurde einer Veröffentlichung von Lloyd B. Jeffs et al. aus 2005 mit dem Titel „A Scalable, Extrusion-Free Method for Efficient Liposomal Encapsulation of Plasmid DNA“ entlehnt. Auch wenn darin von „stabilized plasmid lipid particles“ (SPLP) die Rede ist, wird erstmals ein einfaches Verfahren zur Formulierung von LNP durch spontane Vesikelbildung sowie die Vorteile gegenüber experimentellen Vorläufer-Methoden zur Erzeugung liposomal verpackter DNA wie „Detergenz-Dialyse unter Verwendung von Octylglucopyranosid (OGP)“ und „EtOH-destabilisierte kationische Liposomen“ beschrieben [37].

Zusammenfassung:

Plasmid-DNA wurde mit Citratpuffer (pH 5) und Wasser verdünnt, während die Lipide in EtOH abgelöst wurden: Chol, DSPC, DODMA, DSG-PEG (55:20:15:10), bevor die Lipidmischung mit Wasser auf 90 % EtOH verdünnt wurde. Beide Lösungen wurden vorgewärmt (37 °C) und mittels zweier Peristaltikpumpen (1 mL/s) über Silikonschläuche im Verhältnis 1:1 in einem T-Konnektor gemischt (60 % Einschlusseffizienz). Sofort anschließend wurde die Mischung mit einer gleichartigen Apparatur 1:1 mit 300 mM NaCl/20 mM Citrat (pH 6) verdünnt (80-90 %

Einschlusseffizienz). Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde freie DNA über einen Anionenaustauscher-Membranfilter entfernt, mittels Ultrafiltration wurde aufkonzentriert und gegen 15 Volumen PBS (pH 7,4) diafiltriert. Spätere Publikationen beschreiben für kleinere Ansätze ausführlich die Vorteile der Anwendung des „Microfluidic Mixing“, z. B. mit Geräten des Unternehmens Precision Nanosystems [33, 104]. Für größere Ansätze wurde die „T-Stück-Aufprallmethode“ [37] durch die Berliner Firma Knauer zum „Impingement-Jet-Mixing“ weiterentwickelt und entsprechende Geräte zur Produktion des Covid-19-Impfstoffs von Biontech/Pfizer genutzt.

LNP-Formulierung:

Für die vorliegende Arbeit jedoch wurde einfach die zuvor beschriebene Methodik herunterskaliert und mit Kolbenhubpipetten umgesetzt. Dabei wurden jedoch einige Parameter einer jüngeren Publikation aus 2017 übernommen, in der auch bereits die Bezeichnung LNP verwendet wurde [32]. Die DNA wurde in 10 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,0) gelöst. Als Lipide (siehe Tab. 9) wurden verwendet (gelöst in EtOH abs.): DODMA (5 mg/mL), DSPC (2 mg/mL), Chol (3 mg/mL), DMG-PEG (0,5 mg/mL) in einem molaren Verhältnis von 50:10:39:1. Dies kann als „Standard-Lipidkomposition“ aus ionisierbarem Aminolipid, Strukturlipid, Cholesterol und PEG-Lipid betrachtet werden. Die Verwendung des kurzkettigen DMG-PEG erleichtert die Aufnahme der LNP in die Zellen und erhöht die Wirksamkeit [32]. Ein größerer Anteil von PEG-Lipid führt zu kleineren, stabileren Partikeln, hemmt aber auch die Aufnahme in die Zellen bzw. Freisetzung aus den Endosomen und senkt dadurch die Wirksamkeit. Durch längere systemische Zirkulation kann es *in vivo* dennoch sinnvoll sein. 5,5 µg DNA in 50 µL saurem Puffer wurden mit 0,2 µmol Lipiden in 50 µL 90%igem EtOH schnell und kräftig gemischt (50x Auf- und Abpipettieren), entsprechend einem N/P-Verhältnis von 6. Sofort danach wurde die Mischung 1:1 mit 300 mM NaCl/20 mM Citrat (pH 6) auf gleiche Weise verdünnt unter Verwendung von „SafeSeal SurPhob Pipettenspitzen“. Nach 30 min Inkubation bei RT wurde der Ansatz zu 4 mL sterilem PBS (pH 7,4) in eine Ultrafiltrationseinheit pipettiert und bei 4000 g und 20 °C für 5 min diafiltriert, um das EtOH zu entfernen.

Die folgende Illustration der LNP-Bildung wurde aus einem Review (2017) von Pieter R. Cullis und Michael J. Hope übernommen [57]:

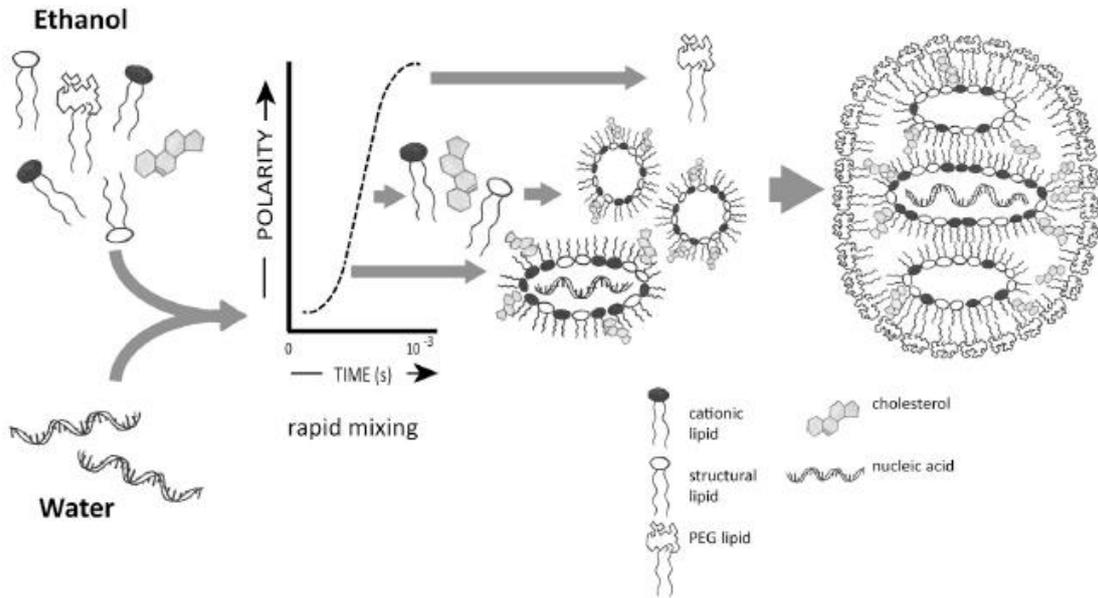


Abb. 12 LNP-Formulierung durch spontane Vesikelbildung infolge der Verdünnung der ethanolischen Lipidlösung

Durch das rasche Mischen von wässriger Nucleinsäure- mit ethanolischer Lipidlösung werden durch elektrostatische Interaktionen inverse Mizellen um die DNA bzw. RNA herum gebildet. Das kationische Lipid beginnt mit steigender Polarität „auszufallen“. Wird schnell genug gemischt, werden diese Invers-Mizellen mit PEG-Lipid überzogen, das mit steigender Polarität um sie herum ausfällt, bevor sie aggregieren können.

Unter dem Eindruck neuer Erkenntnisse zur Bildung und Morphologie der LNP wurde bereits 2018 ein aktualisiertes Modell veröffentlicht, siehe Abb. 13. Kulkarni et al. stellten zudem die Bedeutung von DSPC und Cholesterin für die Stabilisierung der LNP heraus.

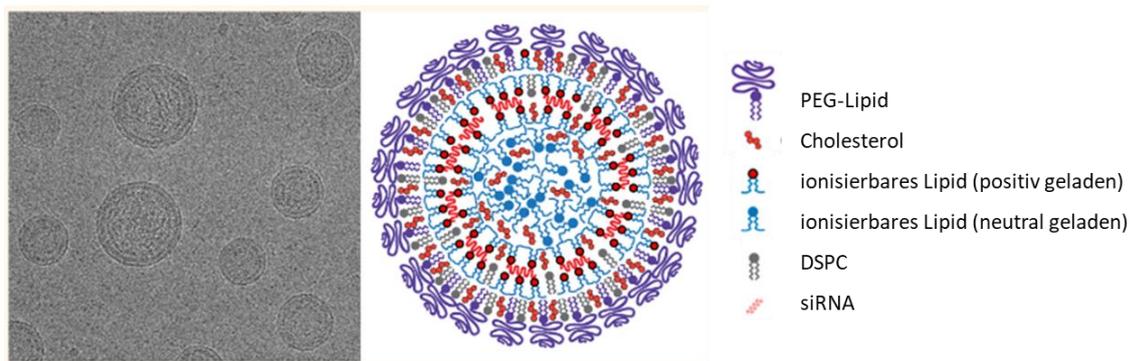


Abb. 13 Cyro-TEM-Aufnahme (links) und Modellaufbau (rechts) von LNP mit siRNA

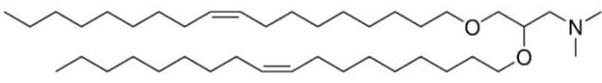
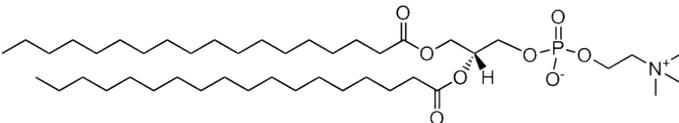
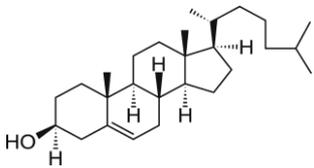
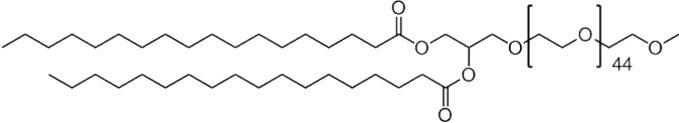
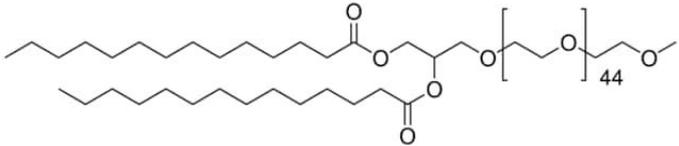
Anstelle des Einschusses der RNA in inverse Mizellen, wird im Modell ein Sandwich-Aufbau mit der RNA zwischen zwei Lipid-Monolayern skizziert. Überschüssiges ionisierbares Lipid bildet mit den übrigen Lipiden separate Partikel (nicht gezeigt), die schließlich mit den RNA-haltigen LNP verschmelzen, was bei den resultierenden Partikeln (dargestellt) zu einem amorphen Lipidkern führt. *

*Abbildung (modifiziert) nach Kulkarni et al. [105].

Durchgeführte Experimente:

- LNP-Formulierung und anschließende Verdünnung mit PBS (zu 10 ng/μL DNA) und Medium (mit AG1856) zu 12 μg/mL AG1856 und 5 ng/μL DNA.
- LNP-Formulierung mit AG1856 und anschließende Verdünnung mit PBS (zu 5 ng/μL DNA). AG1856 (1,38 μg) wurde entweder gelöst in Wasser der DNA-Lösung zugegeben (AGW) oder gelöst in Ethanol der Lipidmischung (AGE).
- LNP-Formulierung mit Lipid-AG1856-Konjugat (0,375 mol% der Lipide) und anschließende Verdünnung mit PBS (zu 5 ng/μL DNA). In einem HPLC-Vial wurde ein Konjugat-Film erzeugt, dann Zugabe der Lipide.

Tab. 9 Lipid-Bestandteile von Lipid-Nanopartikeln

Abkürzung	Nomenklatur und Strukturformel	Funktion
DODMA	1,2-Dioleoyloxy-3-dimethylaminopropan 	ionisierbares Lipid zur Komplexierung der DNA
DSPC	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin 	Strukturlipid
Chol	Cholesterol 	vermittelt Struktur und Stabilität; entscheidend f. Morphologie der LNP [106]
DSG-PEG	1,2-Distearoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylenglycol-2000 	Partikelstabilisierung
DMG-PEG	1,2-Dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylenglycol-2000 	Partikelstabilisierung (schwächer)

2.3.4 Partikelcharakterisierung

2.3.4.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Morphologie der zielgerichteten Nanoplexe wurde durch Rasterelektronenmikroskopie mit einem Hitachi SU 8030 Elektronenmikroskop bei 15 kV untersucht. Die Proben (5 μ L) wurden aus Formulierungen entnommen, die entsprechend den Proben für den Tierversuch hergestellt wurden. Die Probe wurde vor der Messung über Nacht bei RT auf einem Silizium-Wafer getrocknet.

2.3.4.2 Agarosegel-Retentions-Assay

Die DNA-Komplexierung wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert [73]. Komplexierte DNA wurde mit freier DNA als Kontrolle in einem 1%igen Agarosegel (0,2 μ g/mL EtBr) elektrophoretisiert und anschließend unter UV-Licht (365 nm) sichtbar gemacht.

Zielgerichtete Nanoplexe:

Nanoplexe mit 500 ng Nanoplasmid pro Ansatz wurden in einem Gesamtvolumen von 30 μ L formuliert. Äquivalente Mengen an freiem Nanoplasmid als Kontrolle.

Lipoplexe:

Lipoplexe mit 800 oder 1000 ng Plasmid-DNA wurden für den Agarosegel-Retentions-Assay verwendet mit 100 ng freier DNA als Kontrolle.

2.3.4.3 DLS/Zeta-Potential

Der hydrodynamische Durchmesser (D_H) und das ζ -Potential aller nanopartikulären DNA-Formulierungen wurden mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) und Laser-Doppler-Mikroelektrophorese mit einem Malvern Zetasizer Nano ZS, ausgestattet mit einem 4 mV HeNe-Laser (633 nm), bei einem festen Streuwinkel von 173 ° („Backscatter“) gemessen.

Dynamische Lichtstreuung (DLS):

Bei der Methode der dynamischen Lichtstreuung (DLS), die auch als Photonenkorrelationspektroskopie (PCS) bezeichnet wird, nutzt man das Streulicht-Signal, welches beim Durchtritt monochromatischen Laserlichts durch eine Probe entsteht. Trifft das Laserlicht auf sehr kleine Partikel oder Makromoleküle, wird es in alle Richtungen gestreut (Rayleigh-Streuung). Detektiert wird ein interferierendes Streulichtmuster, meist mittels einer Avalanche-Photodiode (APD). Durch die Brownsche Molekularbewegung fluktuieren die Streulichtsignale der Partikel je nach Größe unterschiedlich stark (die kleinen stärker). Das Messsignal der interferierenden Streulichtintensitäten wird einer mathematischen Operation namens Autokorrelation unterzogen, eine Autokorrelations-

funktion wird berechnet und dargestellt. Über „Fitting-Algorithmen“ werden daraus Diffusionskoeffizienten und aus denen über die Stokes-Einstein-Gleichung hydrodynamische Durchmesser abgeleitet.

Die Zetasizer Software verwendet zur Analyse der Autokorrelationsfunktion die Kumulantenanalyse nach ISO 22412:2017, um einen Mittelwert für D_H (Z-Average) und einen Breitenparameter der monomodalen Kurve, bekannt als Polydispersitätsindex (PDI) zu generieren. Multimodale Systeme werden mit Hilfe des CONTIN-Algorithmus analysiert. Die „Backscatter-Technologie“, also die Detektion des Streulichts in einem Winkel von 173° anstelle von 90° bietet einige Vorteile: größerer Konzentrationsbereich messbar (v.a. größere Konzentrationen), größere Sensitivität, Messung größerer Partikel möglich (durch kleineren Multi-Scattering-Effekt), größere Reproduzierbarkeit (www.bettersizeinstruments.com). Der verwendete Messbereich war 0,4-10.000 nm. Es wurden 3 Messungen pro Probe durchgeführt, für die Messdauer wurde „automatisch“ eingestellt.

Zetapotential:

Die Bestimmung des ζ -Potentials erfolgte mittels Laser-Doppler-Mikroelektrophorese. Nach Anlegen eines elektrischen Felds bewegen sich die Partikel entsprechend ihrer Ladung unterschiedlich schnell zu einer der Elektroden (negativ geladene Partikel zur Anode, positiv geladene Partikel zur Kathode). Die Wanderungsgeschwindigkeit wird als elektrophoretische Mobilität bezeichnet und kann über den Doppler-Frequenz-Shift bestimmt werden. Ausschlaggebend für die elektrophoretische Mobilität ist die Partikelladung an der sogenannten Abschergrenze: das ζ -Potential. Dieses kann dementsprechend von der elektrophoretischen Mobilität abgeleitet werden.

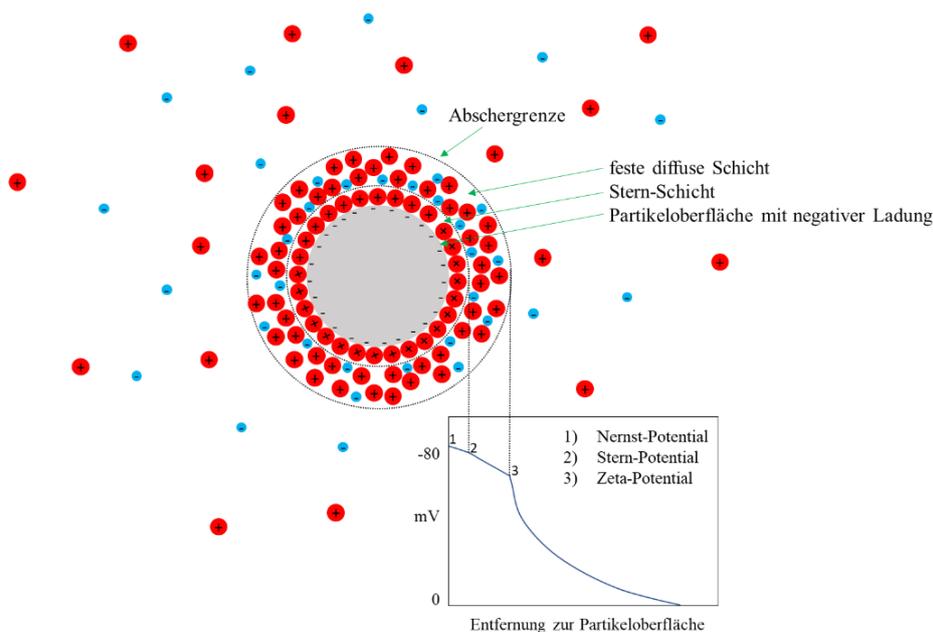


Abb. 14 Negativ geladener Partikel mit ladungsausgleichenden Ionenschichten und resultierenden Potentialdifferenzen

Neben der beschriebenen Frequenzanalyse ist mit manchen Messgeräten auch eine Phasenanalyse möglich (PALS: „phase analysis light scattering“), was z. B. in organischen Lösungsmitteln sinnvoll sein kann.

Zielgerichtete Nanoplexe:

Für jede Nanoplex-Formulierung wurden 2,5 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µL in einem Massenverhältnis von 1:4 oder 1:7 mit Peptid Y komplexiert (siehe 2.3.3.1). Nach 30 min Inkubation bei RT wurde die Formulierung für die Größenbestimmung in eine UV-transparente Einmalküvette überführt. Für ζ-Potentialmessungen wurde die DLS-Probe mit Reinstwasser auf ein Endvolumen von 800 µL verdünnt und mit NaCl bis zu einer Endkonzentration von 10 mM ergänzt, bevor die gesamte Lösung in eine Faltkapillarzelle überführt wurde. Es wurden 3 Messungen à mindestens 10 Messläufe durchgeführt.

K16-Nanoplexe & Lipoplexe:

Es wurden 2 µg DNA in 25 µL H₂O mit 8 µg K16 (N/P 10,85) bzw. 13 µg DOTAP-Liposomen oder eine Menge Liposomen aus kombinierten Lipiden, entsprechend 13 µg DOTAP (N/P 3) in 50 µL H₂O zu einem Gesamtvolumen von 75 µL vereinigt und gemischt. Nach 30 min Inkubation bei RT wurden 50 µL der Formulierung für die Größenbestimmung in eine UV-transparente Einmalküvette überführt. Für ζ-Potentialmessungen wurde die DLS-Probe mit filtriertem Reinstwasser (0,22 µm Spritzenvorsatzfilter) auf ein Endvolumen von 800 µL verdünnt, bevor die gesamte Lösung in eine Faltkapillarzelle überführt wurde. Es wurden 3 Messungen à mindestens 10 Messläufe durchgeführt.

LNP

Von den 250 µL LNP-Formulierung nach Ultrafiltration mit PBS wurden 50 µL für die DLS- und Zetapotential-Messung entnommen und zunächst für die Größenbestimmung in eine UV-transparente Einmalküvette überführt. Anschließend wurde für die ζ-Potentialmessungen ad 800 µL mit filtriertem Reinstwasser (0,22 µm Spritzenvorsatzfilter) aufgefüllt und in eine Faltkapillarzelle überführt. 3 Messungen à mindestens 10 Messläufe wurden durchgeführt.

2.3.5 DSC-Analyse von Modell-Liposomen

Mittels DSC-Analyse wurde untersucht, ob AG1856 oder Lipid-AG1856-Konjugat in die Membranen von Modell-Liposomen unterschiedlicher Zusammensetzung integriert. Dies sollte eine Verschiebung der Übergangstemperatur (T_c bzw. T_m) von Gelphase zu ungeordneter flüssig-kristalliner Phase bewirken. Als Lipid wurde DPPC ausgewählt, das häufig für derartige

Anwendungen zur Herstellung von Modell-Liposomen verwendet wird und eine Phasenübergangstemperatur von 41,5 °C aufweist.

Phasenübergänge in Lipid-Membranen

Unterhalb der T_c liegen Lipidmembranen als geordnete Gelphase (S_o) vor, d.h. die Alkylketten liegen lang gestreckt und dicht nebeneinander. Bei Temperaturerhöhung kommt es bei einer für das Lipid spezifischen Temperatur zu einem schnellen, reversiblen Übergang zur ungeordneten flüssigkristallinen Phase (L_d). Die Phasen-Übergangstemperatur T_c („phase transition temperature“) lässt sich in der DSC-Kurve am Maximum des entsprechenden Peaks großer Enthalpieänderung ablesen. Bei Phosphatidylcholinen lässt sich i. d. R. davor ein Peak kleiner Enthalpieänderung beobachten, der die sogenannte „pre-transition“ bei der entsprechenden Temperatur T_p anzeigt. Dabei verwandelt sich die planare Gelphase (S_o) in eine gewellte Gelphase (P_β). Die „pre-transition“ reagiert empfindlich auf Probenvorbereitung oder Verunreinigungen [107]. Abb. 15 illustriert die genannten flüssig-kristallinen Phasen.

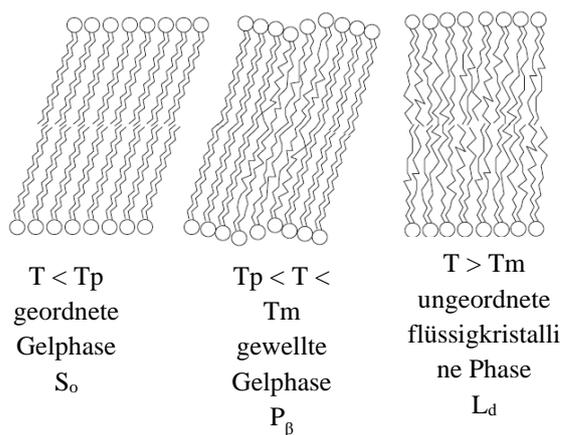


Abb. 15 Phasenübergänge in Lipidmembranen

Abbildung 15 (modifiziert) nach Costas Demetzos [108].

Die Einlagerung von Cholesterol zwischen (gesättigte) Phospholipid-Moleküle erzeugt eine geordnete flüssigkristalline Phase L_o (siehe Abb. 16) und ist für die Eigenschaften von mammalen Membranen von großer Bedeutung. Im DSC-Thermogramm bewirkt ein zunehmender Cholesterol-Anteil in einer DPPC-Membran das Verschwinden der „pre-transition“ und eine Verbreiterung der „main transition“ inkl. Abnahme von ΔH (Enthalpie-änderung durch den Phasenübergang), bis schließlich kein Phasenübergang mehr erkennbar ist [108]. Cholesterol beeinflusst so maßgeblich die Fluidität der Membranen und ist außerdem am Aufbau der „Lipid Rafts“ beteiligt.

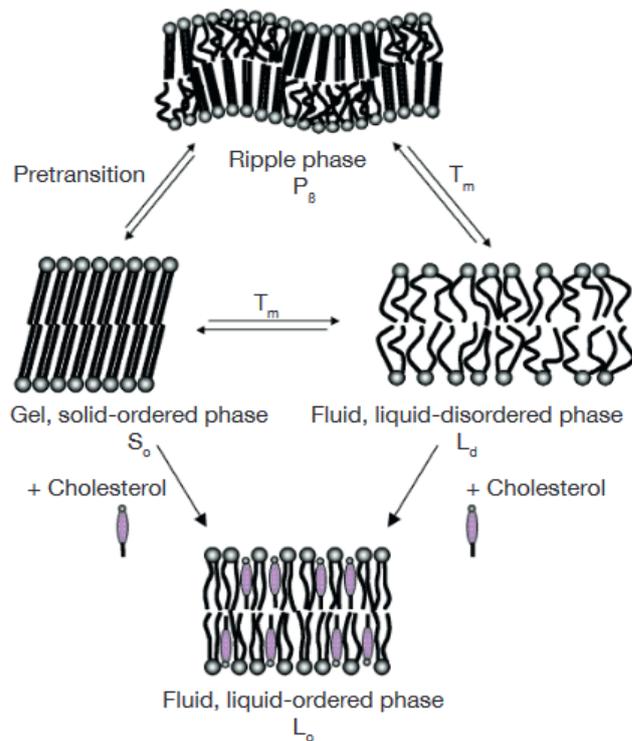


Abb. 16 Einfluss von Cholesterol auf das thermotrope Phasenverhalten von Lipid-Doppelmembranen

Abb. 16 nach Marc Eeman und Magali Deleu [109].

Es bilden nur solche Lipide Membranen aus, deren Moleküle die passende (zylindrische) „Geometrie“ aus hydrophilem und hydrophoben Molekülteil aufweisen (siehe Abb. 17), insbesondere Glycerophosphocholine (PC), während andere wie DOPE (Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin), ein PE, aufgrund der vergleichsweise geringeren Hydrophilie der Kopfgruppe (bei neutralem pH) eine kegelförmige Hydrophilie/Hydrophobie-Molekülgeometrie aufweisen und infolgedessen als flüssigkristalline Phase keine lamellare sondern eine invers-hexagonale Phase (H_{II}) ausbilden.

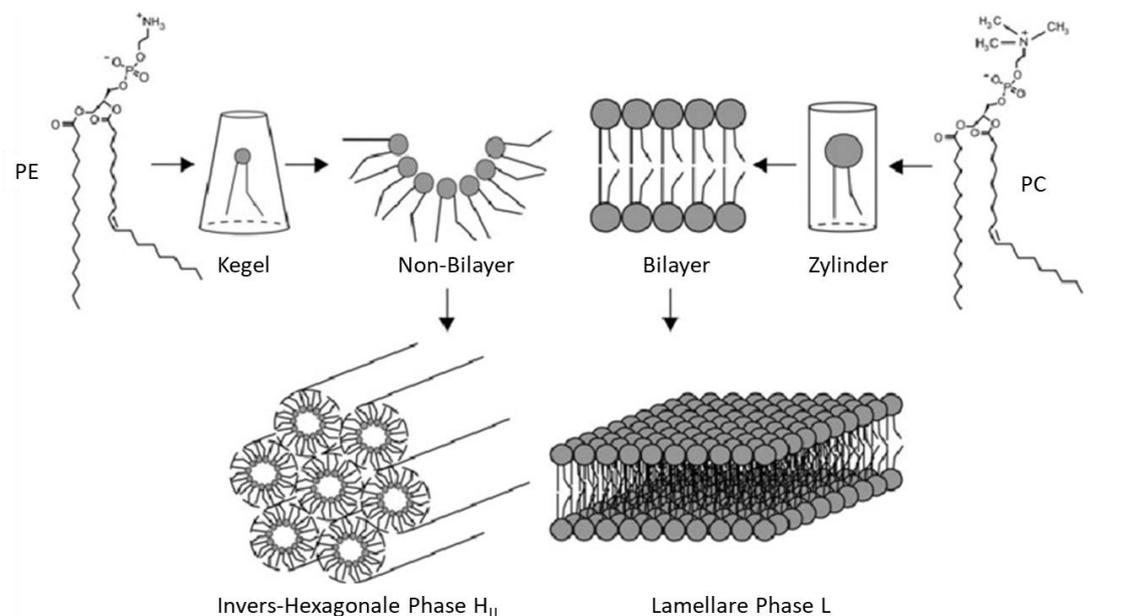


Abb. 17 Einfluss der Lipide auf die Art der gebildeten flüssigkristallinen Phase

Abb. 17 (modifiziert) nach Writoban Basu Ball et al. [110].

Tab. 10 Übersicht der für Liposomen verwendeten Lipide

Modell-Liposomen	Verwendete Lipide	T _c [°C]
➤ DPPC	DPPC - 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin	41,5
➤ DPPC/Chol	POPC - 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin	-2
➤ POPC/SM	SOPC - 1-Stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	6
➤ SOPC/SM	Egg SM - Sphingomyelin (v.a. N-(hexadecanoyl)-Sphing-4-enine-1-phosphocholin)	38 [111]
➤ DPPC/DOTAP	Chol - Cholesterol DOTAP - Dioleoyl-3-trimethylammonium-propan	- 0 [112]

Folgende Substanzen wurden auf eine Interaktion mit Liposomen getestet:

Saponine: AG1856, SO1861, Asperosaponin VI, Digitonin,
DSKA (ein hergestelltes Lipid-Saponin-Konjugat).

Liposomenbildung und -prozessierung

Es wurden Lipide bzw. Lipidmischungen in Chloroform verwendet, um über die Lipidfilmmethode Liposomen zu erzeugen (siehe 2.3.3.2). Die Behandlung der hydratisierten Lipide mit Ultraschall dient dazu, die Bildung kleiner unilamellarer Vesikel (SUV) zu forcieren. Nur durch Aufquellen unter Schwenken und Schütteln/Vortexen würden zunächst nur Multilamellare Vesikel (MLV) entstehen, also Lipidvesikel in einem breiten Größenbereich von ca. 100 bis 1000 nm, die mehrschichtige Lipidmembranen aufweisen. Durch die Ultraschallbehandlung werden die Vesikel degradiert und es entstehen SUV, die eine Größe von 100 nm und kleiner haben. Während hydratisiertes DOTAP aufgrund seiner niedrigen T_c (0 °C) bei Raumtemperatur mittels Ultraschall prozessiert werden kann, ist bei Phospholipiden darauf zu achten, dass die Liposomenprozessierung (durch Ultraschall oder Extrusion) von der Hydratisierung an oberhalb der T_c abläuft. Meist neigen SUV dazu, unterschiedlich schnell wieder zu größeren Vesikeln zu aggregieren. Grund dafür ist ihre starke Membrankrümmung. Inhomogene Größenverteilung führt dann zu Ostwald-Reifung. Liposomen, die mittels Extrusion erzeugt werden, weisen eine homogenere Größenverteilung auf. Dies verlangsamt die Ostwald-Reifung und verzögert so die Aggregation.

Ultraschallbehandlung:

Hydratisierter Lipidfilm (30 min) im Rundkolben oder HPLC-Vial wurde oberhalb der T_c für 5 min ins Ultraschallbad gehängt.

Liposomenextrusion:

Mit Hilfe eines Extruders (Avestin Liposofast™) mit Polycarbonatmembranen unterschiedlicher Porengröße wurden Liposomen der gewünschten Größe hergestellt. Dabei wurde schrittweise vorgegangen, beginnend mit der größten Porengröße (200 nm). Der Extruder wurde im Wasserbad vorgewärmt (60 °C bei DPPC). Die Membran wurde eingelegt, der komplette Extruder inkl. beider Glasspritzen wurde mit temperiertem Reinstwasser gespült und erneut im Wasserbad temperiert. Dann wurden die Liposomen (MLV) mit einer der beiden Spritzen aufgezogen. Die Spritze wurde über den Luer-Lock-Anschluss wieder mit dem Extruder verbunden und die Liposomen wurden langsam 21x (wenn nicht anders angegeben) durch die Membran gedrückt und auf der anderen Seite entnommen.

Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Die Messungen wurden an einem Nano DSC von TA Instruments durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein besonders sensitives DSC-Gerät, mit dem bereits kleine Substanzmengen analysiert werden können. Es ist v. a. zur Analyse von Proteinen und anderen Biomolekülen geeignet. Innerhalb des Messbereichs (0 bis 110 °C) lassen sich endotherme wie exotherme Prozesse untersuchen, z. B. Konformationsänderungen oder Änderungen des Aggregatzustands. Auch für Stabilitäts- und Reinheitsuntersuchungen ist es daher gut geeignet. Vorsicht ist bei Proteinen und Nukleinsäuren bei hoher Messtemperatur geboten (> 100 °C), da es nach Ausfällung zu Benetzung/Verstopfung der Kapillaren kommen kann. Ein Gefrieren der Probe kann die Messzelle beschädigen und muss daher vermieden werden. Für diese Arbeit wurden Temperaturprogramme zwischen 2 und 92 °C verwendet, mit einer Heizrate von 1 °C/min.

Das Nano DSC verfügt über eine Referenz- und eine Probenzelle (je 300 µL). Es werden ca. 750 µL einer Probe zum Einfüllen benötigt. Typische Konzentration bei Proteinen ist 1 mg/mL. Für die Messungen von Modell-Liposomen wurden meist Lipidkonzentration von 1-2 mM verwendet, was bei Phospholipiden ca. 1 mg/mL entspricht. Wichtig ist eine ausreichende Konditionierung der Messzellen mit dem zu verwendenden Puffer.

Das **Messprinzip** beruht darauf, dass Referenz- und Probenzelle immer auf der gleichen Temperatur gehalten werden, während sie einem zuvor programmierten Temperaturprogramm ausgesetzt sind. Um ein Sieden zu verhindern, werden die Messzellen unter Druck gesetzt (typischerweise 3 bar). Aufgezeichnet wird eine Kurve der Heizrate im Verlauf des Temperaturprogramms. Diese Kurve gibt wieder, wieviel mehr oder weniger Heizenergie (Messung über die elektrische Leistung) nötig war, um die Probenzelle auf der gleichen Temperatur wie die Referenzzelle zu halten. So werden endotherme oder exotherme Prozesse als positive oder negative Peaks der Heizrate aufgezeichnet. Über das Peak-Integral lässt sich die Enthalpieänderung ΔH durch den entsprechenden Prozess bestimmen.

- Blank-Messungen:

Für diese Arbeit wurden alle Messungen in Reinstwasser durchgeführt. Entsprechend wurde es als Blank verwendet. Die Blank-Messungen wurden ü. N. mit dem zuvor erstellten Temperaturprogramm durchgeführt (6 Messungen: 3x Heizen, 3x Kühlen, alternierend).

- Einfüllen von Blank (und Proben):

Der Blank wurde 30 min im Vakuum entgast und luftblasenfrei mit Hilfe einer 2,5 mL Eppendorfpipette sowohl in den Referenz- als auch in den Proben-Loop eingefüllt. Dazu wurden zwei Pipettenspitzen jeweils mit einem kurzen Stück Silikonschlauch als Verbindung zu den Loop-

Öffnungen (die über Kapillaren zu den Messzellen führen) ausgestattet. Während eine Pipettenspitze mit einer Loop-Öffnung verbunden wurde, konnte mit der zweiten Spitze an der Eppendorfpipette das Wasser langsam in die andere Loop-Öffnung der Referenzzelle pipettiert werden, bis es in der losen Pipettenspitze aufzusteigen begann. Das Wasser wurde einige Male behutsam durch den Loop bewegt, um evtl. festsitzende Luftblasen auszutreiben. Schließlich wurden beide Pipettenspitzen bei kompletter Füllung des Referenz-Loop gleichzeitig abgezogen. Analog dazu wurde der Proben-Loop mit Blank befüllt. Bei beiden Loops wurde jeweils eine Öffnung mit einem Viton-Stopfen verschlossen. Ausgetretene Flüssigkeit wurde aufgesaugt (eine Funktion der „Cleaning-Station“). Der Verschluss wurde handfest aufgeschraubt und nachdem sich eine stabile Heizrate eingestellt hatte, ein Druck von 3 bar aufgeschlagen. Auf diese Weise konnte kontrolliert werden, dass die Heizrate durch den Druckanstieg max. einen Sprung von 20-30 $\mu\text{W/s}$ zeigt. Andernfalls wurde von Luftblasen im Loop ausgegangen bzw. von unzureichender Entgasung und das Entgasen und Einfüllen musste entsprechend wiederholt werden. Am nächsten Tag, nach den erfolgten Blank-Messungen, wurde nur der Proben-Loop gelehrt und die Probe auf die gleiche Weise wie der Blank vorbereitet, eingefüllt und vermessen. Bei der Auswertung wurde die Blank-Kurve von den Proben-Kurven abgezogen. Zwischen der Messung verschiedener Proben wurde die Probenzelle mit dem Medium gespült, das als Blank verwendet wurde.

- Reinigung

Nach Abschluss der Messungen wurden die Loops mit Hilfe einer zum DSC-Gerät erworbenen „Cleaning-Station“, einer programmierbaren Pumpe mit drei Eingängen, mit einem einfachen Programm gereinigt (Reinstwasser, 1% ige Detergenzlösung, Reinstwasser, Luft) und schließlich mit Wasser in LC-MS-Qualität gefüllt. Als Detergenzien werden vom Hersteller Micro 90, Cleanox oder Triton-X empfohlen, nicht jedoch Tween oder Helmanex.

2.3.6 Transfektionsversuche in der Zellkultur

Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht darauf, dass Zellen in einer Trägerflüssigkeit („Sheath Fluid“) einzeln hintereinander durch einen winzigen Spalt gepumpt werden. Beim Passieren dieses Spalts durchqueren sie einen Laserstrahl, welcher durch die Zellen teilweise gestreut wird. Die Analyse des gestreuten Lichts (SSC = seitliches Streulicht, FSC = Forwärts-Streulicht) liefert zahlreiche Informationen über Größe, Form und sogar Oberflächenbeschaffenheit der Zellen. Auf diese Weise erfolgt heute z. B. die Unterscheidung der Leukozyten im Rahmen eines großen Blutbildes. Die Durchflusszytometrie ist jedoch auch in der Forschung eine wertvolle analytische Methode. Um diverse Filter ergänzt, ist es möglich, verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe an bzw. in Zellen oder auch Partikeln anzuregen und sehr sensitiv zu quantifizieren. Manche Geräte verfügen über eine Funktion, Zellen aufgrund eines Fluoreszenzsignals zu sortieren (FACS = „fluorescence-activated cell sorting“). So können z. B. stabil transfizierte Zellen selektiert werden, indem zusammen mit dem GOI ein entsprechendes Reportergen übertragen wird.

Bei Bestimmung der Transfektionseffizienz am Durchflusszytometer im Rahmen dieser Arbeit wurde das Medium nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit den verschiedenen nanopartikulären DNA-Formulierungen (Plasmide mit GFP-Reportergen) abgesaugt, die Zellen mit Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und vereinzelt, in 5 mL Rundbodenröhrchen aus Polystyren überführt und auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Transfektionseffizienz bestimmt. Alle Zellen, die höhere FITC-H-Signale aufwiesen als die unbehandelte Kontrolle, galten als transfiziert. Der „FITC-Kanal“ bezeichnet die Verwendung eines 525/40 Band-Pass-Filters bei Anregung mit einem 488 nm Laser und leitet sich vom Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluoresceinisothiocyanat) ab.

„Alle Zellen“ umfasste die Zellpopulation nach **Dubletten-Diskriminierung**. Dafür wurde mit den Ergebnissen der Negativkontrolle ein Dot-Plot mit „FSC-Width“ auf der Y-Achse gegen „FSC-H“ auf der X-Achse erstellt. Während bei Zellen mit großen Werten für „FSC-Width“ (Dauer des Signals bei Zelldurchtritt) von Dubletten ausgegangen werden kann, handelt es sich bei kleinen FSC-Signalen (Vorwärtsstreuung) um tote Zellen/Zelltrümmer. Beides wurde von der Auswertung der Daten ausgeschlossen (siehe Abb. 18A). Ähnlich gut lässt sich die selektierte Population intakter, einzelner Zellen durch Auftragung von SSC-H gegen FSC-H erkennen (Abb. 18B). Mit Hilfe eines Dot-Plots mit FITC-H gegen FSC-H ließen sich die transfizierten Zellen dann leicht identifizieren (Abb. 18G). In einem Histogramm mit Darstellung der FITC-H Signale wurde bei der Negativkontrolle die Grenze gesetzt, ab der die Zellen als transfiziert galten. Bei Vermessung der Proben wurde der entsprechende Prozentsatz transfizierter Zellen an der ausgewählten Population intakter Einzelzellen ausgegeben (Abb. 18H).

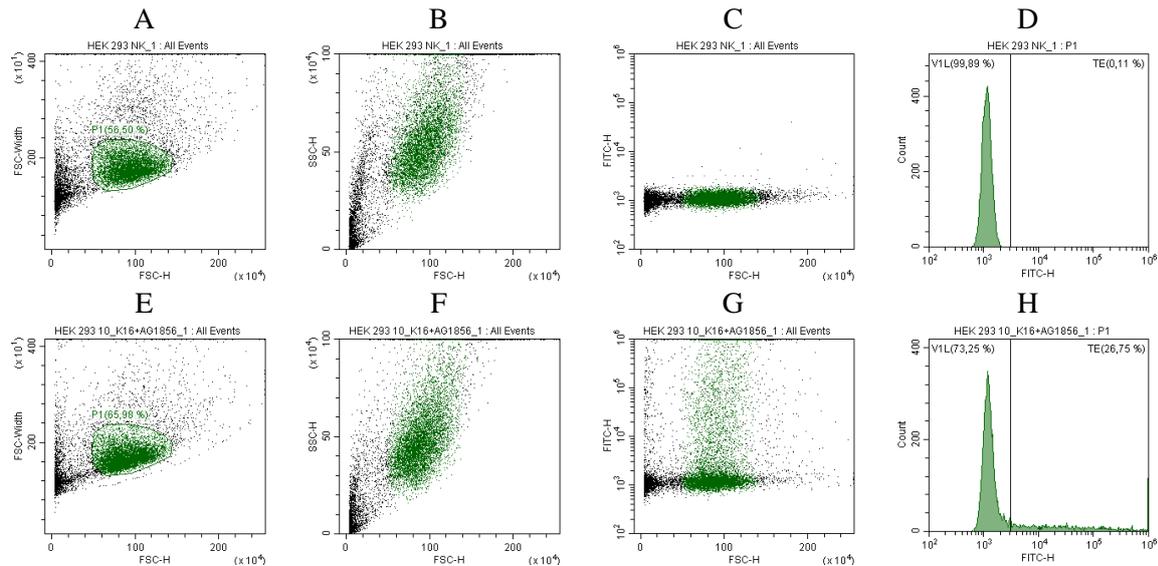


Abb. 18 Beispiel zur Auswertung der FACS-Daten nach Dubletten-Diskriminierung

Oben: Negativkontr., A: FSC-Width gg. FSC-H, B: SSC-H gg. FSC-H, C: FITC-H gg. FSC-H, D: FITC-H-Histogramm;
 Unten: Transfektion, E: FSC-Width gg. FSC-H, F: SSC-H gg. FSC-H, G: FITC-H gg. FSC-H, H: FITC-H-Histogramm.

Zielgerichtete Nanoplexe mit Nanoplasmid-DNA:

Neuro2A sowie Neuro2A-Zellen, die stabil mit dem Luciferase-Gen transduziert worden waren (Neuro2A_Luc) wurden in Kulturmedium, bestehend DMEM, ergänzt um 10 % FBS und nicht-essenzielle Aminosäuren, in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre bei 37 °C kultiviert. Für *in vitro* Transfektionen wurden die Zellen in transparente Well-Platten ausgesät und 24 h lang kultiviert. Danach wurde das Kulturmedium mit einer Mischung aus frisch formulierten Nanoplexen, Kulturmedium und AG1856 (Endkonzentration: 5 µg/mL) ausgetauscht.

Die Zellen (4000 pro Kavität) wurden in 96-Well-Platten ausgesät und mit Suizid-Nanoplexen entsprechend 100 ng DNA pro Well transfiziert (Volumen pro Well 200 µl). Nach der Transfektion wurden die Zellen 48 h lang beobachtet. Die zytotoxische Wirkung wurde mit einem CytoSMART® Omni „live cell imaging device“ (CytoSMART Technologies, Eindhoven, Niederlande) beobachtet.

Für *in vitro* Transfektionen mit eGFP-Nanoplasmid (500 ng pro Well) wurden 15000 Zellen in 400 µL Kulturmedium pro Kavität in 24-Well-Platten ausgesät. Mit dem „Fluoreszenz-Live-Cell-Imaging-Mikroskop“ Lux3 FL von CytoSMART® wurde das Zellwachstum und die eGFP-Expression während der 48-stündigen Inkubationszeit nach Zugabe der Nanoplexe beobachtet.

Lipoplexe ohne/mit AG1856:

Neuro-2A-, Hepa 1-6-, HEK-293FT und ECV-304-Zellen wurden in Kulturmedium, bestehend DMEM, ergänzt um 10 % FBS und nicht-essenzielle Aminosäuren (letztere nur bei Neuro-2A), in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre bei 37 °C kultiviert.

Für *in vitro* Transfektionen mit eGFP-Plasmid (300 ng pro Well) wurden die Zellen in transparente 48-Well-Platten ausgesät (12000 Zellen in 300 µL Kulturmedium pro Kavität) und 24 h lang kultiviert. Danach wurde das Kulturmedium mit einer Mischung aus frisch formulierten Lipoplexen und Kulturmedium mit oder ohne AG1856 ergänzt. Wurde AG1856 zugesetzt, betrug die Konzentration 7 µg/mL. Nach Zugabe von 120 µL Transfektionsmedium zu 300 µL/Well resultierte eine AG1856-Konz. von 2 µg/mL im Well.

Lipoplexe aus DOTAP/Lipid-AG1856-Konjugaten:

Vorgehen wie bei Lipoplexen ohne/mit AG1856, jedoch wurden nach Mischen der formulierten Lipoplexe mit Kulturmedium 120 µL aus den Wells entnommen und mit 120 µL des Transfektionsmediums ersetzt.

Lipid-Nanopartikel (LNP):

Neuro-2A-, Hepa 1-6- und ECV-304-Zellen wurden in Kulturmedium, bestehend DMEM, ergänzt um 10 % FBS und nicht-essenzielle Aminosäuren (letztere nur bei Neuro-2A), in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre bei 37 °C kultiviert. Formuliertes LNP wurden mit PBS bzw. PBS/Medium verdünnt und zu den Zellen pipettiert. Bei 48-Well-Platten mit 300 µL Medium/Well wurden 60 µL (5 ng/µL DNA) zugegeben.

2.3.7 Suizid-Nanoplasmide zur Tumorthherapie im Tierversuch

Der Tierversuch wurde vom Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin autorisiert und bei EPO (Experimentelle Pharmakologie & Onkologie Berlin-Buch GmbH) unter der Leitung von Professor Dr. Wolfgang Walther durchgeführt. Dabei wurden die Richtlinien des „United Kingdom Coordinated Committee on Cancer Research“ (UKCCCR) befolgt. Für alle Studien wurden weibliche Rj:NMRI-Foxn1^{nu/nu} (NMRI-nu/nu) Mäuse (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) verwendet. Diesen Mäusen fehlt aufgrund eines Gendefekts der Thymus und damit auch jegliche T-Zell-Immunantwort, wodurch das sogenannte Xenograft-Tierversuchsmodell, also das erfolgreiche Implantieren eines Tumors (i. d. R. durch Injektion einer entsprechenden Zellkultur), erst möglich wird. Aufgrund ihres Phänotyps werden sie auch als Nacktmäuse bezeichnet.

1. Studie zur akuten & chronischen Toxizität

Zunächst wurde mit 2 Mäusen eine Studie zur akuten Toxizität durchgeführt. Dazu wurden an Tag 3 und Tag 6 der Studie kombinierte Applikationen von AG1856 (90 µg in 50 µL H₂O, s.c. in die Nackenfalte) und Nanoplexen* mit NP-Sap (1 h später, 30 µg NP-Sap in 100 µL H₂O, i.v. in die Schwanzvene) verabreicht. Dieselben Mäuse wurden auch zur Bewertung der chronischen Toxizität genutzt, indem weitere kombinierte Applikationen an den Tagen 27, 31, 34 und 36 erfolgten. Das Körpergewicht wurde regelmäßig bis zum Ende der Studie an Tag 48 ermittelt.

*Die Nanoplexe wurden durch Mischen von Peptid Y (2,4 mg/mL) und NP-Sap (0,6 mg/mL) im Massenverhältnis 4:1 in Milli-Q-Wasser formuliert.

2. Wirksamkeitsstudie

In der Wirksamkeitsstudie sollte die antitumorale Wirkung der Kombination von AG1856 und NP-Sap-Nanoplexen in einem „Luciferase-exprimierenden Neuro-2A Xenograft-Modell“ untersucht werden. Murine Neuroblastomzellen „Neuro-2A“ (ATCC® CCL-131™), die stabil mit dem Luciferase-Gen transduziert worden waren [91], wurden in BioWhittaker® Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), supplementiert mit 10 % FBS sowie nicht-essentiellen Aminosäuren in 5 %-iger CO₂-Atmosphäre bei 37 °C kultiviert. 10⁷ Zellen wurden den Mäusen (6-8 Wochen alt) subkutan in die linke Flanke injiziert. Die Mäuse wurden randomisiert in 3 Gruppen à 8 Mäuse aufgeteilt, die mit NP-Sap-Nanoplexen allein (Gruppe B), Nanoplexen in Kombination mit AG1856 (Gruppe C) oder nur mit PBS als Placebo (Gruppe A) behandelt wurden.

Die „Tumor-Suizid-Gentherapie“ wurde einen Tag nach der Inokulation der Neuro-2A_Luc-Zellen begonnen (Tag 1) und an Tag 3,5,7 und 9 wiederholt. Wie bei der Toxizitätsstudie zuvor wurden 50 µL mit 90 µg AG1856 s.c. in die Nackenfalte injiziert, gefolgt von 100 µL Nanoplex-Formulierung mit 30 µg NP-Sap i.v. in die Schwanzvene mit einer Stunde Abstand (Gruppe C) bzw. ohne vorherige AG1856-Injektion (Gruppe B). Damit entsprach das Studiendesign einer vorhergehenden Studie [91]. Das Tumorwachstum wurde mittels Caliper-Messungen bestimmt. Die Biolumineszenz-Bildgebung (BLI) wurde von Tag 11 an mit Hilfe des „NightOWL LB 981 imaging system“ generiert. Dazu wurde den mit Isofluran narkotisierten Mäusen intraperitoneal 150 mg/kg D-Luciferin (Biosynth, Staad, Schweiz) injiziert. 20 Minuten nach der D-Luciferin-Injektion wurde das Biolumineszenz-Signal aufgenommen und mit der Software WinLight sowie ImageJ quantifiziert und abgebildet [91].

2.3.8 Isolierung von AG1856

In den Zellkultur-Experimenten wurde als transfektionssteigerndes Saponin stets *Agrostemmosid E*, im Weiteren als AG1856 bezeichnet, verwendet. Die Isolierung erfolgte mit Modifizierungen wie von Clochard et al. beschrieben [68]. Die Bezeichnungen für die Fraktionen wurden übernommen. Die wichtigsten Schritte waren:

1. Mahlen getrockneter Samen von *Agrostemma githago* L.
2. Entfetten des Samenmehls mit Petrolether im Soxhlet-Extraktor
3. Extraktion des entfetteten Samenmehls mit 90 % MeOH
4. Gewinnung eines trockenen Rohextrakts durch Evaporation des MeOH am Rotationsverdampfer und Lyophilisation des wässrigen Restes
5. Gewinnung Saponin-reicher Fraktionen durch Größenausschlusschromatographie auf Sephadex LH-20 mit MeOH-Wasser (50:50, V/V)
6. Isolierung von AG1856 mittels semipräparativer HPLC (Säule: Phenomenex Kinetex® 5 µm, C18, 100 Å, 10 x 250 mm)

Erläuterungen zu den genannten Schritten:

1. Das Mahlen erfolgte portionsweise in einer IKA-Universalmühle M20.
2. Die gemahlene Samen von *Agrostemma githago* L. wurden in mehreren Durchgängen ü. N. in Soxhlet-Apparaturen mit Petrolether entfettet.
3. Insgesamt wurden 1,2 kg entfettetes Samenmehl in Portionen à 300 g unter Rühren je 3x mit 3 L MeOH-Wasser (90:10, V/V) extrahiert.
4. Die Extrakt-Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer eingedunstet. Das zurückgewonnene Methanol wurde erneut zur Extraktion genutzt. Der resultierende konzentrierte, wässrige Extrakt wurde in mehreren Portionen in Rundkolben bei -80 °C eingefroren und schließlich lyophilisiert.
5. Es wurden für jeden Gelchromatographie-Lauf 200 mg Rohextrakt in ein 15 mL Sarstedt-Röhrchen eingewogen und in 2 mL MeOH-Wasser (50:50, V/V) unter kurzem Vortexen dispergiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 4000 g wurde der klare Überstand in ein kleines Rundrandglas dekantiert. Die Größenausschlusschromatographie (SEC) erfolgte in einer speziell angefertigten, knapp 2 m langen (I.D. 10 mm) Glassäule (zusammengeschmolzen aus zwei 1m-Säulen von YMC) an einer Azura-Anlage von Knauer auf Sephadex LH-20 mit MeOH-Wasser (50:50, V/V) als mobiler Phase mit einer Flussrate von 0,3 mL/min, nachdem die Probe mit einer 2 mL Spritze aufgezogen und in die Probenschleife injiziert wurde. Frühestens nach 25 h bei 0,3 mL/min wurde die nächste Probe appliziert. Mit einem Fraktionssammler wurden 4 Fraktionen à 6 mL im Bereich von 220 bis 300 min gesammelt (20 min pro Fraktion), für die mittels LC-ESI-MS (LC-MS-Methode 1) das Vorhandensein

von AG1856 bestätigt werden konnte. Die 4 Sephadex-Fractionen wurden in 50 mL Sarstedt-Röhrchen gepoolt, welche zwischenzeitlich bei -20 °C gelagert wurden. In der SpeedVac wurde schließlich das MeOH evaporiert, danach der wässrige Teil in einer Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert.

6. 10 mg gepoolte Sephadex-Fraktion wurden in 2 mL ACN-Wasser (50:50, V/V) gelöst. Nach kurzer Zentrifugation (2 min bei 4000 rpm) wurde die Lösung mit einer Spritze aufgezogen und in die Probenschleife injiziert. Als mobile Phase kam ein Wasser (0,01 % TFA, V/V)/ACN-Gradient (LC-Methode 2, siehe 2.3.9) bei 2 mL/min Flussrate zur Anwendung. Der letzte größere Peak, der im Chromatogramm zu sehen ist (siehe 3.4.3) entspricht AG1856 und wurde händisch 15 mL-Sarstedt-Röhrchen aufgefangen. Das Isolat wurde mittels SpeedVac vom org. LM (ACN) befreit und der wässrige Anteil anschließend lyophilisiert.

2.3.9 LC-Methoden & Massenspektrometrie

2.3.9.1 Analytische HPLC

- **LC-Methode 1**

Säule: Phenomenex Kinetex, 2,6 µm, C18, 100 Å, 100 x 4,6 mm
 Säulenofen: 25 °C
 Probenvol.: 5 µL
 Flussrate: 0,7 mL/min
 Mobile Phase: A = H₂O mit 0,01 % TFA (V/V); B = ACN
 Detektion: DAD (210; 280 nm)

Tab. 11 Gradient LC-Methode 1

min	% A	% B
0	70	30
4	65	35
14	50	50
24	50	50
25	70	30
33	70	30

- **LC-Methode 1a**

Tab. 12 Gradient LC-Methode 1a (abweichender Gradient zur Analyse des Rohextrakts)

min	% A	% B
0	70	30
4	65	35
14	50	50
24	50	50
27	20	80
30	70	30
35	70	30

2.3.9.2 Semipräparative HPLC

- **LC-Methode 2**

Säule: Phenomenex Kinetex, 5 µm, C18, 100 Å, 10 x 250 mm
 Säulenofen: nicht vorhanden, Raumtemperatur
 Probenvol.: 2 mL
 Flussrate: 2 mL/min
 Mobile Phase: A: H₂O mit 0,01 % TFA (V/V); B: ACN
 Detektion: DAD (210; 280 nm)

Tab. 13 Gradient LC-Methode 2 (Semiprep-Methode)

min	% A	% B
0	80	20
10	70	30
15	60	40
20	50	50
25	30	70
35	10	90
40	80	20

2.3.9.3 LC-ESI-MS

- **LC-MS-Methode 1** (für Saponine)

HPLC-Säule und -Parameter wie LC-Methode 1
 Detektion: DAD (210; 280 nm), Q-TOF
 Referenzmassen: 119,036320 & 966,000725

Parameter Ionenquelle (ESI, Negativmodus):
 Trägergastemperatur 350 °C; Trägergasfluss 11 L/min (Stickstoff); Verneblerdruck 35 psi;
 Trocknungsgastemperatur 200 °C; Trocknungsgasfluss 14 L/min (Stickstoff); Kapillar-
 spannung 3500 V; Düsenspannung 1000 V; Fragmentor-Spannung 175 V; Skimmer1-
 Spannung 65 V

Acquisitions-Modus Auto-MS2:

MS Bereich (m/z) 100-2000

MS Scanrate (Spektren/sec) 1,5

MS/MS Bereich (m/z) 100-2600

MS Scanrate (Spektren/sec) 3

Isolationsbreite MS/MS Medium

Abgestufte Kollisionsenergie

Ladung	Steigung	Versatz
--------	----------	---------

Alle	6	4
------	---	---

- **LC-MS-Methode 2** (Nachweisversuch Konjugate)

Säule: Poroshell 120 EC-C8 (3,0 × 150 mm, 2,7 µm; Agilent Technologies)
 Säulenofen: 30 °C
 Probenvol.: 5 µL
 Mobile Phase: A = H₂O mit 0,1 % FA (V/V); B = MeOH/ACN (1:1) mit 0,1 % FA (V/V)
 Detektion: Q-TOF

Tab. 14 Gradient LC-MS-Methode 2

min	% A	% B	Flussrate [ml/min]
0	40	60	0,5
7	10	90	0,5
8	6	94	0,7
26	2	98	0,7
27	2	98	1
29	2	98	1
30	40	60	0,5

Referenzmassen:

Negativmodus	Positivmodus
119,0363200	121,050900
966,0007250	922,009800
1033,988109	

Parameter Ionenquelle (ESI, Negativmodus oder Positivmodus):

Trärgasttemperatur 375 °C; Trärgasfluss 12 L/min (Stickstoff); Verneblerdruck 20 psi;
 Trocknungsgasttemperatur 240 °C; Trocknungsgasfluss 18 L/min (Stickstoff); Kapillarspannung
 4000 V; Düsenanspannung 2000 V; Fragmentor-Spannung 170 V; Skimmer1-Spannung 0 V

Acquisitions-Modus Auto-MS1:

Bereich (m/z) 100-3000 Scanrate (Spektren/sec) 2

2.3.9.4 Q-TOF Direktinjektion

Referenzmassen: 121,050873 & 922,009798

Parameter Ionenquelle (ESI, Positivmodus):

Trärgasttemperatur 350 °C; Trärgasfluss 11 L/min (Stickstoff); Verneblerdruck 35 psi;
 Trocknungsgasttemperatur 200 °C; Trocknungsgasfluss 14 L/min (Stickstoff); Kapillarspannung
 3500 V; Düsenanspannung 1000 V; Fragmentor-Spannung 175 V; Skimmer1-Spannung 65 V

Acquisitions-Modus Auto-MS1:

Bereich (m/z) 100-7000 Scanrate (Spektren/sec) 2

2.3.9.5 MALDI-MS

- **MALDI-MS-Methode 1**

Operator: Chris Weise, Institut für Chemie und Biochemie, FU Berlin
 Instrument: Bruker Ultraflex II mit 200 Hz Smart beam™ Laser
 Probenvorb.: Proben gelöst in EtOH 1:5 verdünnt in TA₃₃ (33 % ACN/0.1 % TFA)

Matrix:	HCCA oder SA oder 2,5-DHB, getrocknetes Tröpfchen (1+1)
Messmodus:	RP_PepMix (Peptide)
Messbereich:	600 – 4000
Art der Masse:	M+H, monoisotopisch

- **MALDI-MS-Methode 2**

Operator:	Benjamin-Florian Hempel, Fachbereich Veterinärmedizin, FU Berlin
Instrument:	Bruker Ultraflex II mit 2000 Hz Laser
Probenvorb.:	Proben gelöst in EtOH)
Matrix:	SA oder 2,5-DHB, getrocknetes Tröpfchen (1+1)
Art der Masse:	M+H, monoisotopisch

2.3.10 Synthese und Isolierung von Lipid-Linker-AG1856 Konjugaten

Als alternativer Ansatz gegenüber der passiven Integration des Saponins in lipidbasierte nanopartikuläre DNA-Formulierungen wurde die Idee verfolgt, mit Hilfe von heterobifunktionalen Linkern Lipid-Linker-Saponin Konjugate zu synthetisieren, welche über ihren Lipid-Teil in die Lipid-Membran entsprechender Formulierungen integriert werden sollten.

Als Linker wurde KMHU (N- κ -maleimidoundecanoic acid hydrazide) verwendet. Dieser weist zwei unterschiedliche reaktive Gruppen auf: eine Sulfhydryl-reaktive Maleinimid-Gruppe einerseits und eine Carbonyl-reaktive Hydrazid-Gruppe (Hydrazonbildung) andererseits. Derartige heterobifunktionale Linker können für eine Vielzahl geeigneter Konjugationen herangezogen werden, z. B. für die Herstellung von Immunkonjugaten („Antibody-Drug Conjugates“) oder zur Markierung von Proteinen mit Reportermolekülen (i. d. R. Fluorophore). Die Konjugationsreaktionen finden üblicherweise bei neutralem pH-Wert im Wässrigen, also unter physiologischen Bedingungen statt. Des Weiteren können sie auch in lebenden Organismen Anwendung finden, da sie keine biochemischen Prozesse stören, also nicht mit anderen Biomolekülen reagieren. Deshalb werden sie als „bioorthogonal“ bezeichnet. Die US-Amerikanerin Carolyn Bertozzi prägte den Begriff „bioorthogonal“ im Jahre 2003 [113]. Sie erforschte eine Reihe von Kopplungsreaktionen zur Untersuchung zellulärer Biomoleküle in lebenden Organismen, u. a. die in dieser Arbeit genutzte Hydrazonbildung [114]. Bei ihrer Entwicklung der kupferfreien (daher bioorthogonalen) Azid-Alkin-Cycloaddition (Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition (SPAAC)) zur Untersuchung der Zelloberfläche [115] baute sie auf der sogenannten „Click-Chemie“ von Barry Sharpless und Morten Meldal auf. Der US-Amerikaner und der Däne entwickelten unabhängig voneinander die kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC), die Click-Chemie-Reaktion mit der größten Bedeutung. Sharpless prägte den Begriff Click-Chemie im Jahre 2001 zusammen mit Hartmuth C. Kolb und M. G. Finn [116]. Es handelt sich um Reaktionen, die

schnell und effizient ablaufen, mit großer Selektivität, nahezu vollständig und ohne bzw. ohne

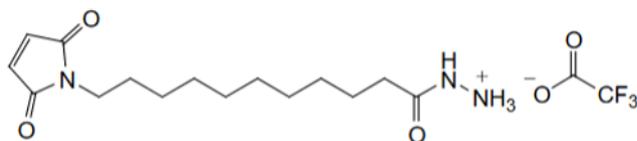


Abb. 19 KMUH (N-κ-maleimidoundecanoic acid hydrazide · TFA)

Langer („Spacer-Arm“: 19.0Å), heterobifunktionaler Linker mit Maleinimid- sowie Hydrazidgruppe, MM = 409,4 g/mol.

störende Nebenprodukte. Grundlage dafür ist eine große thermodynamische Triebkraft bei diesen Reaktionen [116]. Im Ergebnis lassen sich Moleküle wie Legobausteine „zusammenklicken“. Für ihre Forschung erhielten sowohl Barry Sharpless und Morten Meldal als auch Carolyn Bertozzi den Chemie-Nobelpreis 2022.

Laut Herstellerinstruktionen soll zunächst unter Verwendung eines 5-10fachen molaren Überschusses an Linker (gelöst in DMSO) das (freie!) Thiol an die Maleinimid-Gruppe konjugiert werden (eine Form der Michael-Addition). Der pH-Wert soll dabei zwischen 6,5 und 7,5 liegen, wobei ab pH > 7,5 auch eine Reaktion mit Aminen möglich sei. Nach 2 h Inkubation bei RT oder 4 h bei 4 °C soll der Linker-Überschuss durch Dialyse entfernt werden. Anschließend soll das Reaktionsprodukt ebenfalls bei pH 6,5 bis 7,5 mit der Carbonyl-tragenden Komponente konjugiert werden (weitere 2 h Inkubation bei RT), wobei eine Hydrazonbindung entsteht, die v. a. bei saurem pH-Wert hydrolyseempfindlich ist.

Da sich die genannten Herstellerinstruktionen auf die Konjugation mit Peptiden/Proteinen in wässrigem Milieu beziehen, erschienen sie impraktikabel für die geplante Herstellung von Saponin-Lipid Konjugaten. Deswegen wurde auf eine Publikation aus 2007 zurückgegriffen, in der Kale et al. die Synthese und Isolierung von pH-sensitiven PEG-PE (Polyethylenglykol-Phosphatidylethanolamin) Konjugaten mit Hilfe von KMUH und ähnlichen Linkern beschreiben [117]. Zum Teil modifiziert wurde diese wasserfreie Methodik auf die angestrebte Synthese und Isolierung von Lipid-Linker-Saponin Konjugaten angewandt. Die wichtigsten Schritte dabei waren:

1. Synthese des Lipid-Linker Konjugats in EtOH abs. unter Zugabe von TEA
2. Isolierung des Lipid-Linker Konjugats mittels SPE über Kieselgel mit CHCl₃/MeOH
3. Konjugation mit AG1856 in Chloroform/Ethanol
4. Isolierung des Lipid-Linker-Saponin Konjugats mittels SPE über Kieselgel mit CHCl₃/MeOH/H₂O

Es wurden zwei verschiedene Konjugate hergestellt: eines mit DSPE-SH und eines mit DSPE-PEG-SH als Lipidkomponente. Ausgehend von Berechnungen sowie Erkenntnissen aus Vorversuchen wurden die einzusetzenden Stoffmengen abgeleitet, um eine für anschließende Experimente ausreichende Menge der Endprodukte zu erhalten.

2.3.10.1 Synthese & Isolierung der Lipid-Linker Konjugate

a) Synthese & Isolierung von DSPE-S-KMUH (DSK)

Die Ausgangsstoffe wurden wie in Tab. 15 angegeben mit Kolbenhubpipetten in HPLC-Vials (Braunglas) pipettiert und gemischt. Es wurden **3 Reaktionen** parallel angesetzt. Die Vials wurden ü. N. bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Lösungsmittel (LM) in einer Vakuum-Zentrifuge evaporiert (ca. 60 min).

Tab. 15 Konjugationsansatz von DSPE-SH und KMUH-Linker

Ausgangsstoffe	Lösungsmittel	Konzentration [mM]	eingesetztes Volumen [μ L]	eingesetzte Stoffmenge [μ mol]
DSPE-SH	EtOH abs.	2	1000	2
KMUH	EtOH abs.	25	100	2,5
TEA	EtOH abs.	100	100	10

Dazu wurden die Vials in 15 mL Röhrcchen (Sarstedt) platziert, um diese dann in den entsprechenden Halter der Vakuum-Zentrifuge (SpeedVac) zu stecken. Nach dem Evaporieren wurden die Vials mit einer abgewinkelten Pinzette wieder aus den Röhrcchen entnommen. Der Inhalt der drei Vials wurde in insgesamt 300 μ L Chloroform gelöst und **verreinigt**. Ein SPE-Kieselgelsäulchen (Normalphase) wurde auf ein Ventil der SPE-Vakuumvorrichtung gesteckt. Nach Konditionierung der Säule mit Chloroform wurde die Probe mit einer kurzen Pasteur-Pipette aufgegeben. Nachdem das Probenvolumen von der Säule aufgenommen worden war, wurde mit der schrittweisen Elution begonnen (siehe Tab. 16) unter leichtem Unterdruck begonnen (1-2 Tropfen pro Sekunde). Die Lösungsmittel wurden mit einer 5 mL-Glasmesspipette pipettiert. Nur reines Methanol wurde mit einer Kolbenhubpipette pipettiert.

Tab. 16 SPE-Fraktionierung des Konjugationsansatzes von DSPE-S-KMUH (DSK)

Konditionierung	CHCl ₃ mind. 15 mL		
Probenaufgabe	300 μ L		
Elution	CHCl ₃ /MeOH	Volumen [mL]	Fraktionen
	4:0,25	3	DSK 1
	4:0,5	3	DSK 2
	4:0,75	3	DSK 3
	4:1	3	DSK 4
	4:2	3	DSK 5
	4:3	2x2	DSK 6

Die Fraktionierung wurde unter Verwendung einer SPE-Vakuumvorrichtung durchgeführt und die Fraktionen in passenden 5 mL Gläschen aufgefangen. Anschließend wurden die Fraktionen in 10 mL-Spitzkolben umgefüllt und am Rotationsverdampfer bei 35-40 °C zur Trockne eingengt. Zudem wurde das Vakuum bei ca. 10 mbar für min. 15 Minuten gehalten, um das Chloroform zur Gänze zu entfernen. Danach wurden die Fraktionen in 0,5 mL Chloroform aufgenommen und in tarierte

Braunglas-Vials überführt. Nach erfolgter DC-Analyse (Normalphase, Chloroform/Methanol (60:40)) wurde mittels SpeedVac das Chloroform wieder entfernt. Die Vials wurden bei -80 °C eingefroren und daraufhin gefriergetrocknet, bevor die Masse der einzelnen Fraktionen ermittelt wurde. Dieses Vorgehen resultierte aus der Erfahrung, dass die Produkte mehr oder weniger hygroskopisch sind und ohne Gefrierdrying keine sinnvollen Wäageergebnisse zur Kalkulation der Reaktionsausbeute zu erhalten sind.

b) Synthese & Isolierung von DSPE-PEG-S-KMUH (DPSK)

Zur Synthese des pegylierten Pendants wurde nur ein Reaktionsansatz entsprechend Tab. 17 zusammenpipettiert. Die Vorgehensweise, auch bei der SPE-Fraktionierung, entsprach (abgesehen vom Chloroform-Methanol-Gradienten) der zuvor beschriebenen zur Synthese und Isolation von DSPE-S-KMUH. Der Gradient wurde angepasst, um ein sauberes Produkt zu erhalten (Tab. 18)

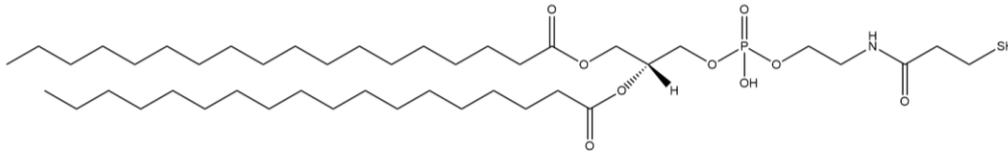
Tab. 17 Konjugationsansatz von DSPE-PEG-SH und KMUH-Linker

Ausgangsstoffe	Lösungsmittel	Konzentration [mM]	eingesetztes Volumen [μ L]	eingesetzte Stoffmenge [μ mol]
DSPE-PEG-SH	EtOH abs.	2	1000	2
KMUH	EtOH abs.	25	100	2,5
TEA	EtOH abs.	100	100	10

Tab. 18 SPE-Fraktionierung des Konjugationsansatzes von DSPE-PEG-S-KMUH (DPSK)

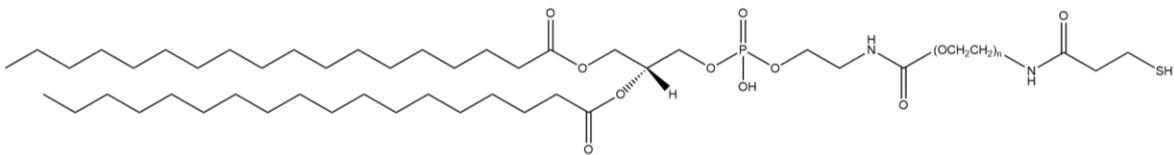
Konditionierung	CHCl ₃ mind. 15 mL		
Probenaufgabe	300 μ L		
Elution	CHCl ₃ /MeOH	Volumen [mL]	Fraktionen
	4:0,1	3	DPSK 1
	4:0,2	3	DPSK 2
	4:0,4	3	DPSK 3
	4:0,8	3	DPSK 4
	4:1,6	3	DPSK 5
	4:3	3	DPSK 6

DSPE-SH



Exakte Masse: 835,58

DSPE-PEG-SH



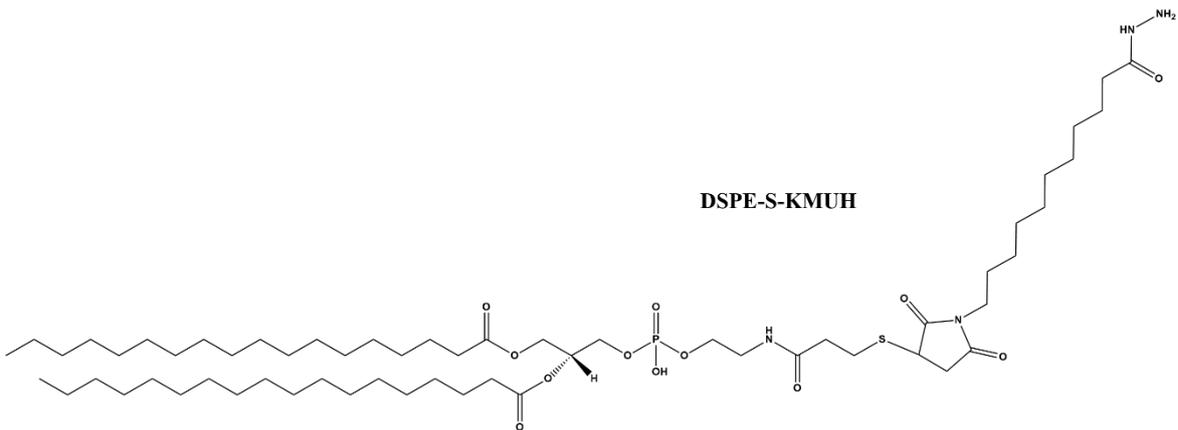
$n \sim 47$ (Mittlere PEG-Masse=2100 Da (nach Analysezertifikat))

Mittlere Masse: 2890

Abb. 20 Strukturformeln der eingesetzten Lipide

DSPE = 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin

DSPE-S-KMUH



Exakte Masse: 1130,77

Abb. 21 Strukturformel des hergestellten Lipid-Linker Konjugats DSPE-S-KMUH (DSK)

2.3.10.2 Synthese & Isolierung der Lipid-Linker-AG1856 Konjugate

Fraktion DSK 5 wurde in 1 mL Chloroform (zu 1,5 mM) gelöst. Zu 0,5 mL dieser Lösung wurden 0,5 mL AG1856-Lösung pipettiert (1 mM in EtOH abs.), entsprechend einem molaren Verhältnis von 1,5 zu 1. Analog dazu erfolgte gleichzeitig die Umsetzung von DPSK 4 mit AG1856 in einem molaren Verhältnis von 1,5 zu 1. Ziel war es, das Saponin bei der Reaktion vollständig umzusetzen, um die anschließende SPE-Isolierung zu vereinfachen. Als dies auch nach mehreren Tagen Reaktionszeit nicht gelang (Analyse per DC), wurde zu beiden Ansätzen in mehreren Schritten à 80 µL das entsprechende Konjugat zugegeben (insgesamt weitere 160 µL DSK (1,5 mM) bzw. 240 µL DPSK (3 mM)). Letztlich wurde auf diese Weise DSKA aus DSK (1,5 mM) und AG1856 (1 mM) in einem molaren Verhältnis von 2 zu 1 und DPSKA aus DPSK (3 mM) und AG1856 (1 mM) in einem molaren Verhältnis von 3 zu 1 synthetisiert.

DSKA wurde nach insgesamt 10 Tagen, DPSKA nach insgesamt 14 Inkubation bei RT mittels Festphasenextraktion aus dem Reaktionsansatz isoliert. In Vorbereitung dazu wurden die Reaktionsansätze in der SpeedVac vom Lösungsmittel befreit. Der DSKA-Ansatz wurde in 300 µL Chloroform gelöst. Der DPSKA-Ansatz löste sich nicht vollständig in Chloroform und wurde daher in 300 µL Chloroform/Methanol (9:1) gelöst.

a) Isolierung von DSPE-S-KMUH-AG1856 (DSKA)

Tab. 19 SPE-Fraktionierung des Konjugationsansatzes von DSPE-S-KMUH-AG1856 (DSKA)

Konditionierung	CHCl ₃ mind. 15 mL		
Probenaufgabe	300 µL		
Elution	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O	Volumen [mL]	Fraktionen
	9:1	3	DSKA 1
	8:2	3	DSKA 2
	8:2	3	DSKA 3
	7:3:0,1	3	DSKA 4
	6:4:0,2	3	DSKA 5
	6:4:0,3	3	DSKA 6

Die SPE-Fractionen wurden in 5 mL Gläschen aufgefangen, in 10 mL Spitzkolben überführt und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Fraktionen DSKA 1 und 2 wurden in 250 µL CHCl₃ gelöst, DSKA 3 und 6 wurden in 300 µL, die übrigen Fraktionen in 600 µL CHCl₃/MeOH (5:1) gelöst. Anschließend wurden die Fraktionen mittels Pasteurpipette in Braunglas-Vials überführt; jeweils 15 µL jeder Fraktion wurden für die DC-Analyse verwendet. Danach wurden die Fraktionen in der SpeedVac von Lösungsmittel befreit (ca. 60 min) und gefriergetrocknet, bevor die Masse der einzelnen Fraktionen ermittelt wurde. Anschließend wurden die Fraktionen zu 1 mg/mL in CHCl₃/MeOH (9:1) gelöst.

b) Isolierung von DSPE-PEG-S-KMUH-AG1856 (DPSKA)

Bei der Isolierung von DPSKA wurde genauso vorgegangen, jedoch mit leicht abgeänderter Elution (Tab. 20). Die Fraktionen DPSKA 1,2,5 und 7 wurden für die DC in 200 μL , die Fraktionen 3,4, und 8 in 100 μL und Fraktion 6 in 250 μL $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1) gelöst. Von allen Fraktionen wurden 15 μL für die DC verwendet.

Tab. 20 SPE-Fraktionierung des Konjugationsansatzes von DSPE-PEG-S-KMUH-AG1856 (DPSKA)

Konditionierung	CHCl_3 mind. 15 mL		
Probenaufgabe	300 μL		
Elution	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$	Volumen [mL]	Fraktionen
	9:1	3	DPSKA 1
	8:2	3	DPSKA 2
	8:2	3	DPSKA 3
	8:2	3	DPSKA 4
	7:3:0,1	3	DPSKA 5
	6:4:0,2	3	DPSKA 6
	6:4:0,2	3	DPSKA 7
	6:4:0,2	3	DPSKA 8

2.3.10.3 Bestätigung korrekter Konjugate durch Massenspektrometrie

Obwohl die DC-Ergebnisse bei der Isolierung der beiden Konjugate bereits auf eine erfolgreiche Synthese schließen ließen, sollte zusätzlich die korrekte Molekülmasse mittels Massenspektrometrie bestätigt werden. Dazu wurden LC-ESI-MS (LC-MS-Methode 2), Direktinjektion am Q-TOF sowie MALDI-MS angewandt (siehe 2.2.4).

3 Ergebnisse

3.1 Minicircle-Herstellung

3.1.1 Klonierungs-PCR

Das Ergebnis der Klonierungs-PCR konnte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung einer DNA-Leiter ausgewertet werden. Von jedem PCR-Ansatz (Saporin-, Dianthin- und Gypsin-Insert) wurden zweimal 25 μ L (inkl. Ladepuffer) in die Geltaschen aufgetragen. Die resultierenden Banden entsprachen der erwarteten Größe der Amplifikate von ca. 800 bp (Saporin: 809 bp, Dianthin: 813 bp, Gypsin: 797 bp).

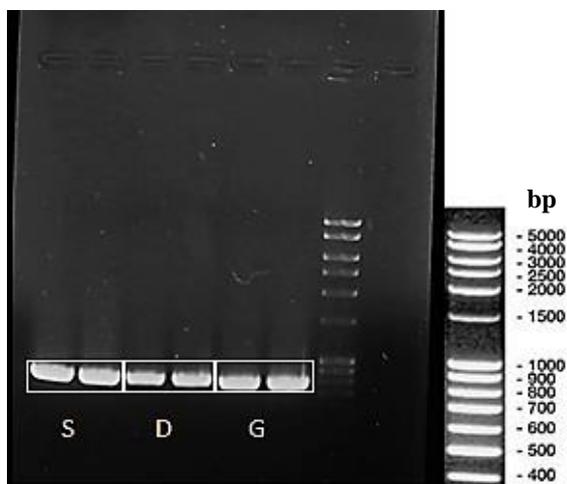


Abb. 22 Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Ansätze

S (Saporin), D (Dianthin) und G (Gypsin), DNA-Leiter „100 bp DNA Ladder extended“.

3.1.2 DNA-Extraktion

Die erhaltenen Gelbanden wurden auf einem UV-Transilluminator bei 365 nm detektiert und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Mittels „GeneJET Gel Extraction Kit“ wurde die DNA extrahiert. Dabei wurde die DNA aus beiden Banden der jeweiligen PCR-Ansätze vereinigt.

Tab. 21 Spektralphotometrische Analyse der extrahierten PCR-Produkte

Insert	Konzentration [ng/ μ L]	A260/280
Saporin	30,6	2,02
Dianthin	21,0	2,04
Gypsin	25,7	2,01

3.1.3 Zwischenklonierung in pJET-Vektor

Nach erfolgter Zwischenklonierung in die pJET-Plasmide wurden die resultierenden Konstrukte in *E. coli* Dh5 α vermehrt und mittels Plasmidpräparation isoliert. Anschließend wurde der Erfolg der Zwischenklonierung mittels Restriktionsverdau/Agarose-Gelelektrophorese bestätigt (Abb. 23).

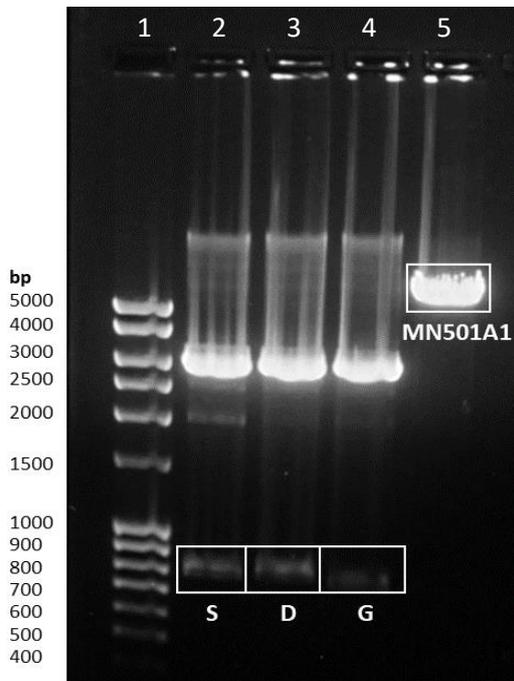


Abb. 23 Agarose-Gelelektrophorese zur Erfolgskontrolle der Zwischenklonierung
 Spur 1: DNA-Leiter „100 bp DNA Ladder extended“, Restriktion der pJET-Konstrukte (Spuren 2 bis 4) und des eigentlichen Zielvektors MN501A1 (Spur 5) mit SallI-HF und NheI-HF; S (Saporin), D (Dianthin), G (Gypsin).

Tab. 22 Spektralphotometrische Untersuchung der präparierten Plasmide

Plasmid	Konzentration [ng/ μ L]	A260/280
pJET-Sap	884	1,88
pJET-Dia	1092	1,89
pJET-Gyp	1120	1,88
MN501A1	140	1,84

3.1.4 Restriktionsverdau & Gelextraktion

Die Plasmide (pJET-Plasmide und Parental-Plasmid MN501A1) wurden in großen Ansätzen von jeweils 200 μ L und 16 μ g DNA mit den Restriktionsendonukleasen Sall-HF und NheI-HF verdaut. Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden die so erzeugten Inserts abgetrennt.

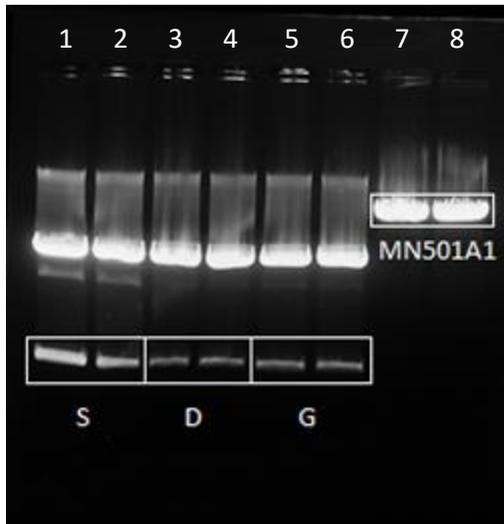


Abb. 24 Agarose-Gelelektrophorese der zweifach verdauten pJET-Plasmide

Restriktion der pJET-Konstrukte (Spuren 1 bis 6) und des Parental-Plasmid-Präkursors MN501A1 (Spuren 7 bis 8) mit Sall-HF und NheI-HF; S (Saporin-Insert), D (Dianthin-Insert), G (Gypsin-Insert).

Die in Abb. 24 markierten Insert-Banden (S, D, G) sowie die Bande des geschnittenen Parental-Plasmid-Präkursors (MN501A1) wurden anschließend wie bereits für die PCR-Amplifikate beschrieben aus dem Gel geschnitten und die DNA extrahiert. Gleichartige Banden wurden dabei vereinigt. Konzentration und Reinheit der DNA wurden am Nanodrop™ One bestimmt.

Tab. 23 Spektralphotometrische Untersuchung der/des extrahierten Inserts/Parental-Plasmids

DNA	Konzentration [ng/ μ L]	A260/280
Saporin-Insert (797 bp)	37	1,80
Dianthin-Insert (801 bp)	27	1,77
Gypsin-Insert (785 bp)	28	1,82
MN501A1 (2x geschnitten, 5752 bp)	156	1,84

3.1.5 Ligation in MN501A1 & Transformation von *E. coli* Dh5 α

Es folgte die Ligation der so gewonnenen Inserts in das gleichsam geschnittene und extrahierte Plasmid MN501A1 zur Erzeugung der gewünschten Parental-Plasmide sowie die Transformation dieser in *E. coli* Dh5 α . Nach Vermehrung der transformierten Bakterien in Flüssigkulturen und anschließender Plasmidpräparation (Midiprep) konnte die erfolgreiche Ligation mittels Restriktion/Agarose-Gelelektrophorese (Abb. 25) sowie Sequenzierung mit dem Forward-Primer „FW-MN501A1“ und dem jeweiligen „Reverse-Primer-Mitte“ bestätigt werden (für Sequenzierungsergebnisse siehe Abb. A1). Der Forward-Primer hatte seine Bindungsstelle zu dicht am Startcodon des Gens. Weil aber das Sequenzierungsergebnis genau in diesem Bereich unsicher ist, sollte der Primer so konstruiert werden, dass er mit einigen Basen Abstand vor dem Gen bindet. Die Sequenzlänge, die unter Einsatz eines Primers sicher analysiert werden kann, beträgt ca. 1000 bp und war ausreichend für die drei untersuchten Gene.

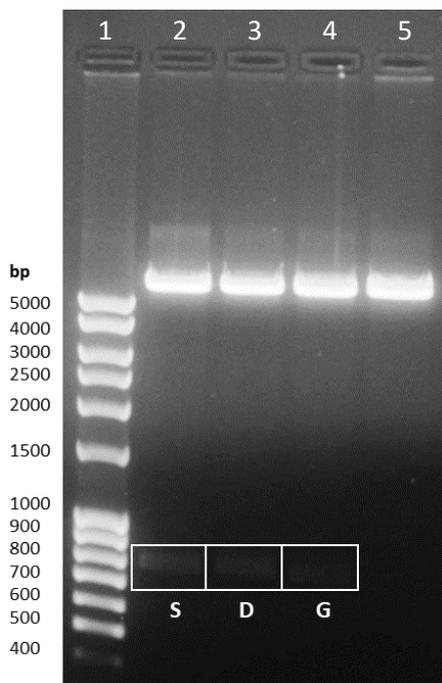


Abb. 25 Agarose-Gelelektrophorese der zweifach verdauten Parental-Plasmide

Spur 1: DNA-Leiter „100 bp DNA Ladder extended“, Restriktion der Parental-Plasmide (Spuren 2 bis 4) und des Parental-Plasmid-Präkursors MN501A1 (Spur 5) mit SalI-HF und NheI-HF; S (Saporin-Insert), D (Dianthin-Insert), G (Gypsin-Insert).

Tab. 24 Spektralphotometrische Untersuchung der präparierten Parental-Plasmide

Plasmid	Konzentration [ng/ μ L]	A260/280
Sap-MN501A1	333	1,87
Dia-MN501A1	279	1,88
Gyp-MN501A1	245	1,89
MN501A1	328	1,88

3.1.6 MC-Produktion mit Kit

Der einzige geglückte Versuch, MC mit dem „MC-Easy Minicircle DNA Production Kit“ von SBI herzustellen, führte zu einer Ausbeute von ca. 80 µg DNA (aus 200 mL Flüssigkultur). Allerdings fielen in der Analyse mittels Restriktion/Agarose-Gelelektrophorese deutliche Kontaminationen mit chromosomaler DNA auf (siehe Abb. 26).

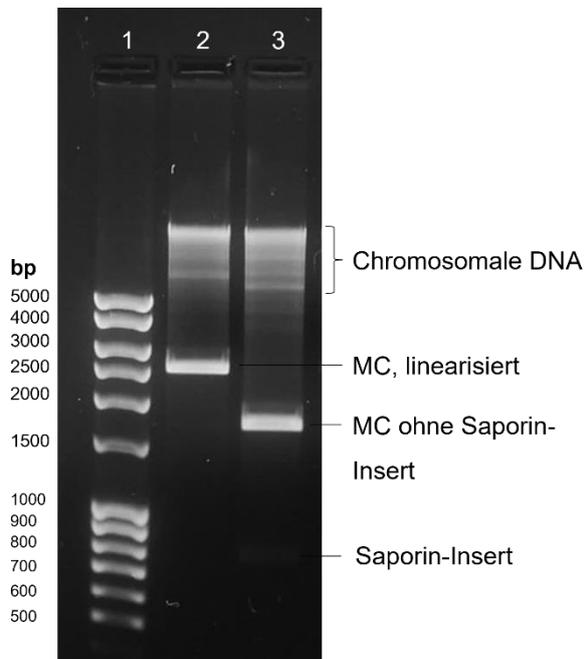


Abb. 26 Agarose-Gelelektrophorese der mittels Kit hergestellten MC-Saporin

Spur 1: DNA-Leiter „100 bp DNA Ladder extended“, Spur 2: Restriktion mit SalI (Linearisierung), Spur 3: Restriktion mit SalI und NheI (Herausschneiden des Inserts).

Das Kit bot die Möglichkeit, Kontaminationen mit chromosomaler DNA/Parental-Plasmid mittels eines Gemisches aus DNase und Restriktionsenzymen zu verdauen und die MC-DNA anschließend durch Alkoholpräzipitation, Waschen mit 70%igem EtOH und Entfernung von ATP und dNTPs über ein AEC-Säulchen aufgereinigt wiederzugewinnen (Abb. 27). Die Ausbeute verringerte sich dadurch um ca. 20 %. Sie wurde über Konzentration und Volumen kalkuliert. Der „Verlust“ entsprach somit (zumindest teilweise) der Entfernung von chromosomaler DNA/Parental-Plasmid.

Durch Analyse der unverdauten MC-Sap DNA fiel auf, dass diese zu einem Großteil aus Multimeren bestand (siehe Abb. 28).

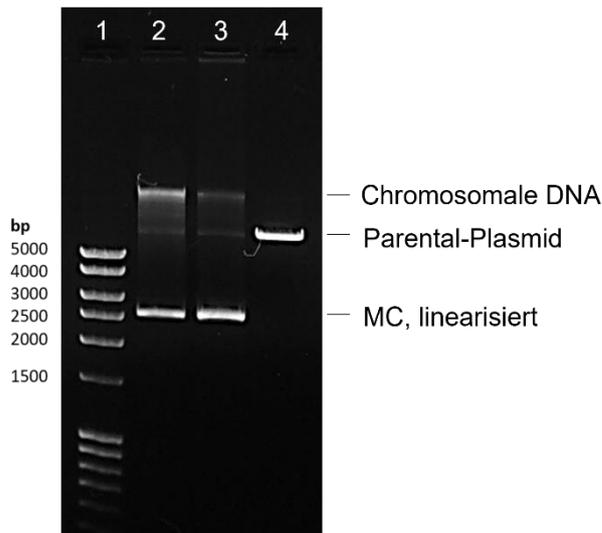


Abb. 27 Agarose-Gelelektrophorese der mittels Kit hergestellten MC-Sap (Saporin-Minircle) vor und nach Entfernung chromosomaler DNA/Parental-Plasmid

Spur 1: DNA-Leiter „100 bp DNA Ladder extended“, Spur 2: vor der Entfernung von chromosomaler DNA/Parental-Plasmid (linearisiert mit SalI), Spur 3: nach der Entfernung von chromosomaler DNA/Parental-Plasmid (linearisiert mit SalI), Spur 4: Parental-Plasmid (linearisiert mit SalI).

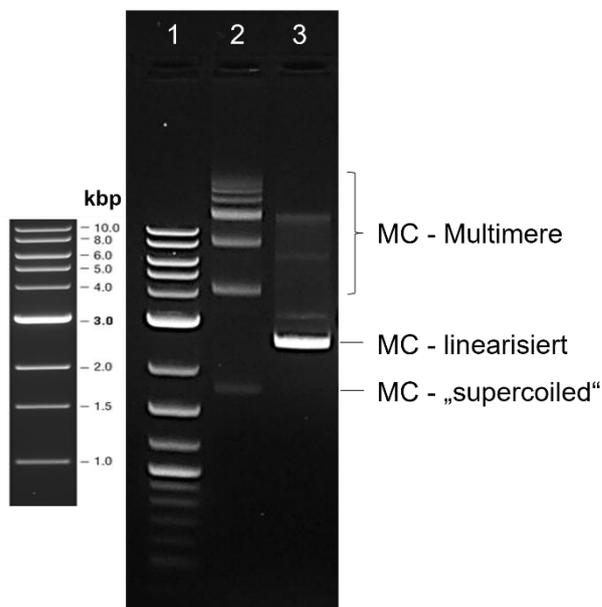


Abb. 28 Agarose-Gelelektrophorese der mittels Kit hergestellten MC-Sap: nativ vs. linearisiert

Spur 1: DNA-Leiter „1kb Plus DNA Ladder“, Spur 2: MC-Sap (nativ), Spur 3: MC-Sap (linearisiert mit SalI).

*Abb. nach Mitdank et al. (2021) [95].

3.1.7 MC-Produktion ohne Kit

Mittels Größenausschlusschromatographie mit Sephacryl S-1000 SF als Stationärer Phase konnte eine vollständige Abtrennung der supercoiled Konformation der Saporin-MC (sc MC-Sap) von der chromosomalen DNA sowie Resten des Parental-Plasmids (PP), die aufgrund ihrer Größe in dieser Reihenfolge als erste wieder die Säule verlassen, erreicht werden. Auch die verbliebene RNA, welche im Chromatogramm mit Abstand das größte Signal hervorrief, wurde vollständig abgetrennt, ist jedoch in Abb. 29 nur als beginnender Peak-Anstieg zu sehen.

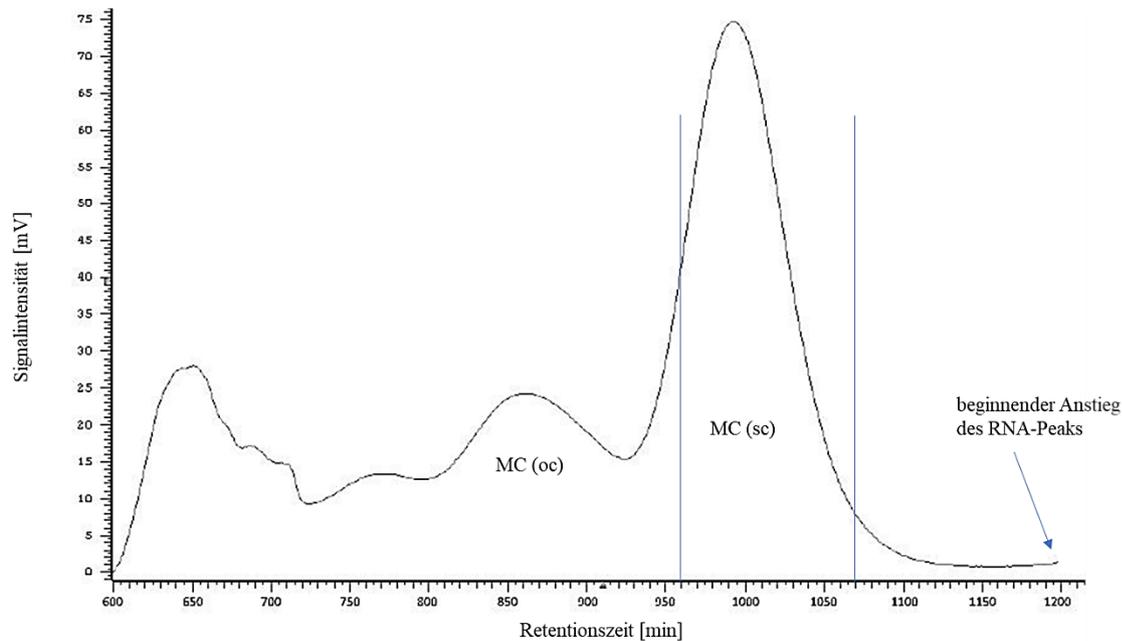


Abb. 29 Chromatogramm der SEC einer MC-Sap-Präparation (2511 bp)

MC-Sap (sc) wurde von zwischen 960 und 1070 min aufgefangen. Säule: 25x1000 mm, Säulenbett: 950 mm, Stationäre Phase: Sephacryl S-1000 SF, Mobile Phase: TE-Puffer mit 0,1 M NaCl (pH 8,0), Flussrate: 0,3 mL/min, Probenvolumen: 1 mL, Detektion bei 210 nm. *Abb. nach Mitdank et al. (2021) [95].

Da die Trennung von der oc- („open-circular“/offenkettigen) Konformation unvollständig blieb, wurde mit dem Aufsammeln des sc-Peaks nach beginnendem Peak-Anstieg etwas abgewartet, mit dem Ziel, den Anteil an oc-Konformation im Endprodukt möglichst gering zu halten. Bei der Herstellung therapeutischer Plasmid-DNA wird ein großer Anteil der supercoiled Plasmid-Konformation angestrebt, weil dies die physiologisch aktivste Form ist, die U.S. FDA („Food and Drug Administration“) empfiehlt in diesem Zusammenhang einen Anteil der sc-Konformation von > 80 % [118]. Ein größerer Anteil der oc-Konformation kann z. B. durch den basischen Lysepuffer während der Plasmid-Präparation hervorgerufen werden (durch ungenügendes/ zu langsames Mischen), Ursache sind dadurch hervorgerufene Einzelstrangbrüche.

Mittels Agarose-Gelelektrophorese ließen sich Prä-Purifikation und erfolgreiche Isolation der MC-Sap (sc) gut analysieren (Abb. 30).

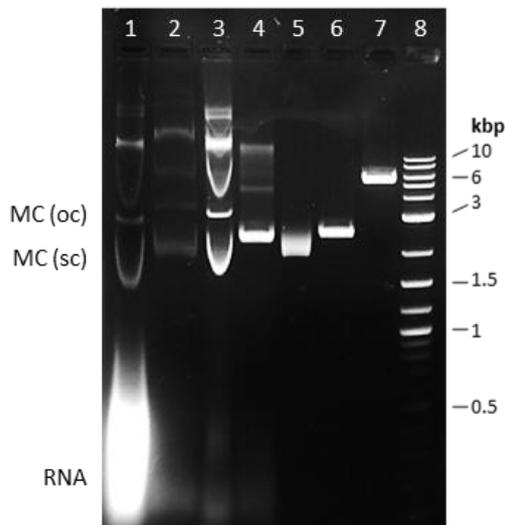


Abb. 30 Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse Isolation von sc MC-Sap (2511 bp)

1%iges Agarosegel, 110V für 1 h in TAE-Puffer; Spur 1: nach 2-Propanol-Fällung, Spur 2: nach Ammoniumacetat-Fällung, Spur 3: SEC-Probe (unverdaut), Spur 4: SEC-Probe (verdaut mit SalI), Spur 5: isolierte sc MC-Sap (unverdaut), Spur 6: isolierte MC-Sap (linearisiert mit SalI), Spur 7: PP linearisiert mit SalI (6553 bp), Spur 8: 1 kb Plus DNA Leiter. *Abb. nach Mitdank et al. (2021) [95].

Die verwendete SEC-Methode stellt eine Verbesserung im Vergleich mit sehr ähnlichen veröffentlichten Methoden zur Isolierung von (sc) Plasmid-DNA mittels SEC über Sephacryl S-1000 SF dar. Anhand einer Tabellierung (Tab. 25) entscheidender Prozess-Parameter und Berücksichtigung allgemeiner Empfehlungen zur Größenausschlusschromatographie großer Moleküle wurden die relevanten Stellschrauben zur Optimierung abgeleitet. Demnach kann für das gegebene Trennproblem (Isolierung von supercoiled Plasmid-DNA) mit besserer Auflösung gerechnet werden durch:

- geringere Flussgeschwindigkeit (3-4 cm/h); diese ist abhängig von Flussrate und Säulendurchmesser
- kleinere Flussrate/größerer Säulendurchmesser
- kleineres Verhältnis von Probenvolumen/Bettvolumen (ca. 0,2)
- kleineres Probenvolumen
- schmalere Startzone der Probe (ergibt sich aus größerem Säulendurchmesser im Verhältnis zu kleinerem Probenvolumen)

Bei größeren MC-Konstrukten war die Auflösung zwischen oc- und sc-Konformation etwas schlechter, was durch weitere Verringerung von Flussrate und Probenvolumen kompensiert werden konnte (siehe Abb. 31) sowie letzte Spalte Tab. 25).

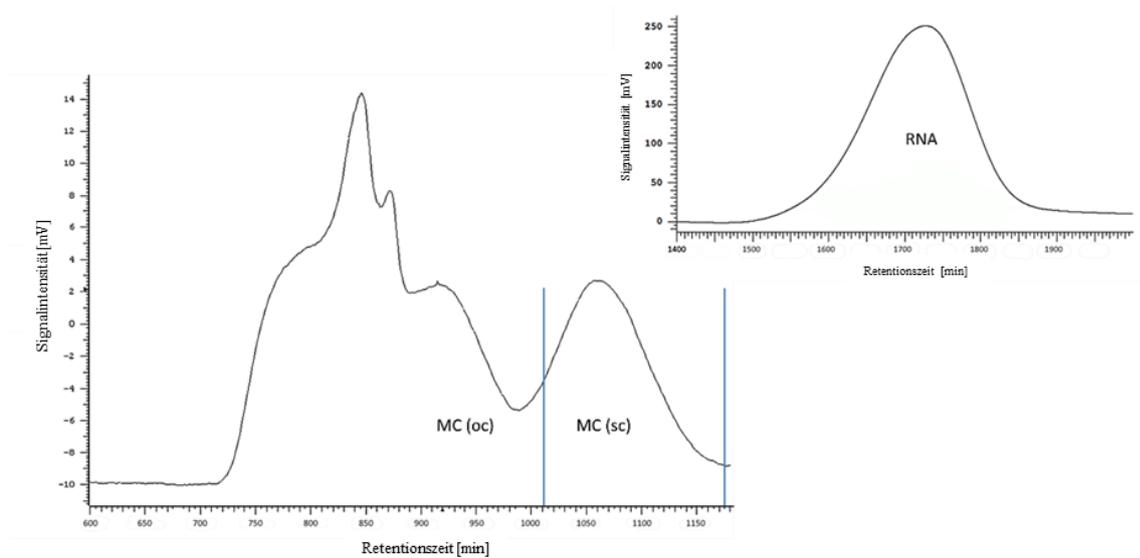


Abb. 31 Chromatogramm der SEC einer sc MC-HLP-hFIX-Präparation (4489 bp)

HLP = „hybrid liver promoter“, hFIX = „human coagulation factor IX“. MC-HLP-hFIX (sc) wurde von zwischen 1012 und 1176 min aufgefangen. Säule: 25x1000 mm, Säulenbett: 950 mm, Stationäre Phase: Sephacryl S-1000 SF, Mobile Phase: TE-Puffer mit 0,1 M NaCl (pH 8,0), Flussrate: 0,25 mL/min, Probenvolumen: 0,25 mL, Detektion bei 210 nm. *Abb. nach Mitdank et al. (2021) [95].

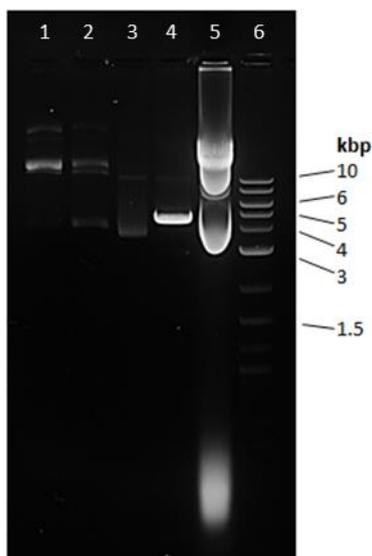


Abb. 32 Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse der Isolation von sc MC-HLP-hFIX (4489 bp)

1%iges Agarosegel, 110V für 1 h in TAE-Puffer; Spur 1: Fraktion 945-990 min, Spur 2: Fraktion 990-1012 min, Spur 3: Fraktion 1012-1176 min = MC-HLP-hFIX (sc) unverdaut, Spur 4: MC-HLP-hFIX (sc) verdaut mit SallI, Spur 5: SEC-Probe unverdaut, Spur 6: 1 kb Plus DNA Leiter (NEB). *Abb. nach Mitdank et al. (2021) [95].

Tab. 25 Vergleich verschiedener veröffentlichter SEC-Methoden zur Isolierung von Plasmid-DNA

I.D. [cm]	2,6 (Horn et al.) [100]	1,6 (Ferreira et al.) [119]	1,6 (Almeida et al.) [120]*	1 (Mitdank et al.) [95]	2,5 (Mitdank et al.) [95]	2,5 (Mitdank et al.) [95]
Querschnitt [cm²]	5,3066	2,0096	2,0096	0,785	4,90625	4,90625
Betthöhe [cm]	170 (2x85 Tandem)	95	60	95	95	95
Bettvolumen [mL]	900 (2x450 Tandem)	150,7	120,6	74,5	466,1	466,1
Flussrate [mL/min]	0,75	0,5	0,3	0,1	0,3	0,25
Flussgeschw. [cm/h]	8,48	18,91	8,96	7,65	3,67	3,06
Probenvol. [mL]	10	8	2	0,2	1	0,25
Min. bis zur Elution der Plasmid-DNA (sc-Konform.)	180 (Abb. 3A) <i>5 kb Plasmid</i>	200 (Abb. 2A) <i>4.8 kb Plasmid</i>	193 (Abb. 2A) <i>5 kb MC Plasmid</i>	460 (Abb. 2) <i>2.5 kb MC Plasmid</i>	960 (<i>2,5 kb MC Plasmid</i> , Fig.3)	1002 (<i>4,5 kb MC Plasmid</i> , Fig.4)
Probenvol. / Bettvol. [%]	1,11	5,30	1,66	0,27	0,21	0,05

*Nur eine von mehreren getesteten Methoden (die mit der größten Selektivität).

Die vorgestellte Methode zur Isolierung von sc MC-DNA führte für Plasmidgrößen von 1,5 bis 5,5 kbp zu guten Ergebnissen. Pro Präparation konnten ca. 200 µg DNA isoliert werden. Es wurden mehrere Präparationen von Minicirceln unterschiedlicher Größe durchgeführt. Die in Tab. 26 dargestellten Ergebnisse belegen die Reproduzierbarkeit und Robustheit der Methode.

Tab. 26 Spektralphotometrische Untersuchung unterschiedlicher MC-Präparationen

MC-Präparation	Größe [bp]	Volumen [µL]	c (DNA) [ng/µL]	DNA [µg]	A 260/280	A 260/230
MC-Produktions-Kit (SBI):						
MC-Sap 1	2511	250	195,8	49,0	2,31	2,65
Vorgestellte Methode:						
MC-GFP	1523	300	655,8	196,7	1,87	2,20
MC-Sap 2	2511	320	596,1	190,8	1,89	2,33
MC-Sap 3	2511	250	650,0	162,5	1,88	2,28
MC-X 1	2536	320	664,8	212,7	1,89	2,29
MC-X 2	2536	300	910,5	273,2	1,87	2,19
MC-Y	3324	350	599,9	210,0	1,89	2,42
MC-hFIX-HLP	4489	330	350,6	115,7	1,88	2,57

3.1.8 Wirksamkeit der Minicircle in der Zellkultur

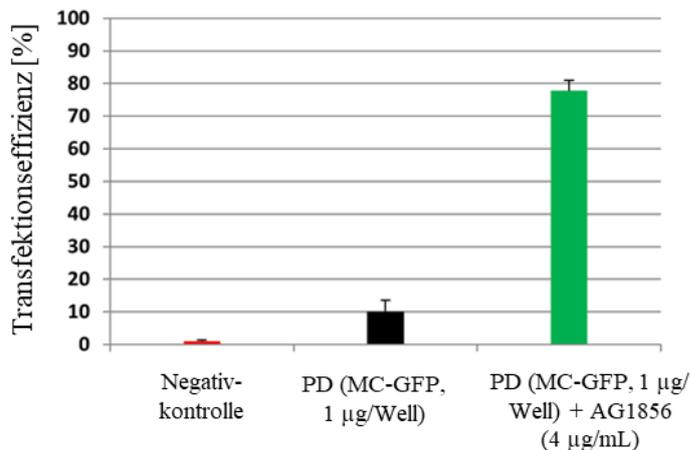


Abb. 33 Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie

Nanoplexe (PD) aus K16/MC-GFP führten in Kombination mit AG1856 zu nahezu 80 % transfizierten Zellen, während mit PD allein nur 10 % der Zellen transfiziert wurden (Negativkontrolle 1 %). 2 Experimente in Doppelbestimmung (n=4). Transfektionseffizienz: Negativkontrolle $1,0 \pm 0,3$ %; PD (MC-GFP) $10,1 \pm 3,5$ %; PD (MC-GFP) + AG1856 $77,8 \pm 3,2$ %. *Abb. nach Mitdank et al. (2021) [95], Durchführung und Auswertung durch Simko Sama.

3.2 Nanoplasmide – Tumorthherapie mit Suizidgenen

3.2.1 Partikelcharakterisierung

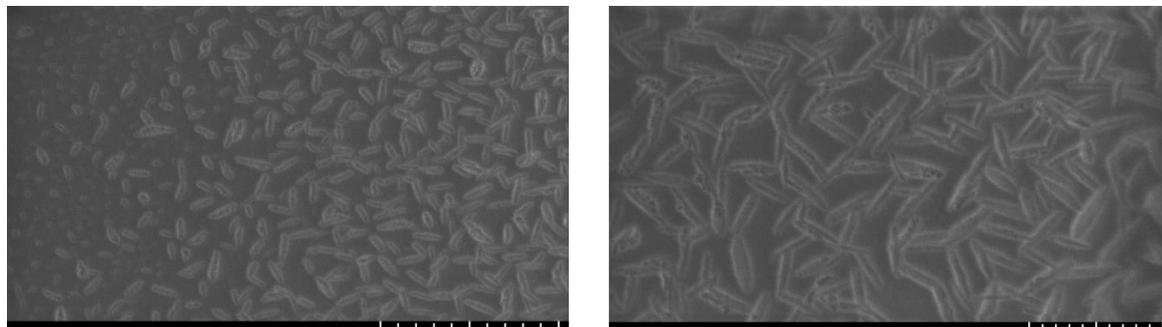


Abb. 34 REM-Aufnahmen der Sap-Nanoplexe (7:1) wie sie im Tierversuch zum Einsatz kamen

Zu sehen sind stabförmige Strukturen von ca. 50 nm Breite und 200 nm Länge. *Abb. nach Mitdank et al. (2022) [69], Probenvorbereitung für die REM durch Eric Woith.

Tab. 27 Hydrodynamischer Durchmesser (D_H), Polydispersitätsindex (PDI) und ζ -Potential der Nanoplexe

Die Proben wurden nach 30 min Inkubation bei RT in Dreifachbestimmung gemessen, Angabe als Mittelwert \pm SD. Es handelte sich bei allen Formulierungen um kationische Nanopartikel mit ζ -Potentialen zwischen +29 und +37 mV sowie D_H zwischen 46 und 61 nm und PDI < 0,3. *Tab. nach Mitdank et al. (2022) [69], erstellt von Meike Tröger.

Formulierung	D_H [nm]	PdI	ζ -Potential [mV]
eGFP-Nanoplex (4:1)	57,34 \pm 0,2	0,137 \pm 0,01	29,4 \pm 3
Sap-Nanoplex (4:1)	60,88 \pm 4,1	0,267 \pm 0,02	33,2 \pm 2
Sap-Nanoplex (7:1)	46,46 \pm 1,9	0,215 \pm 0,03	31,2 \pm 3
Gyp-Nanoplex (7:1)	53,01 \pm 0,7	0,221 \pm 0,003	36,6 \pm 1

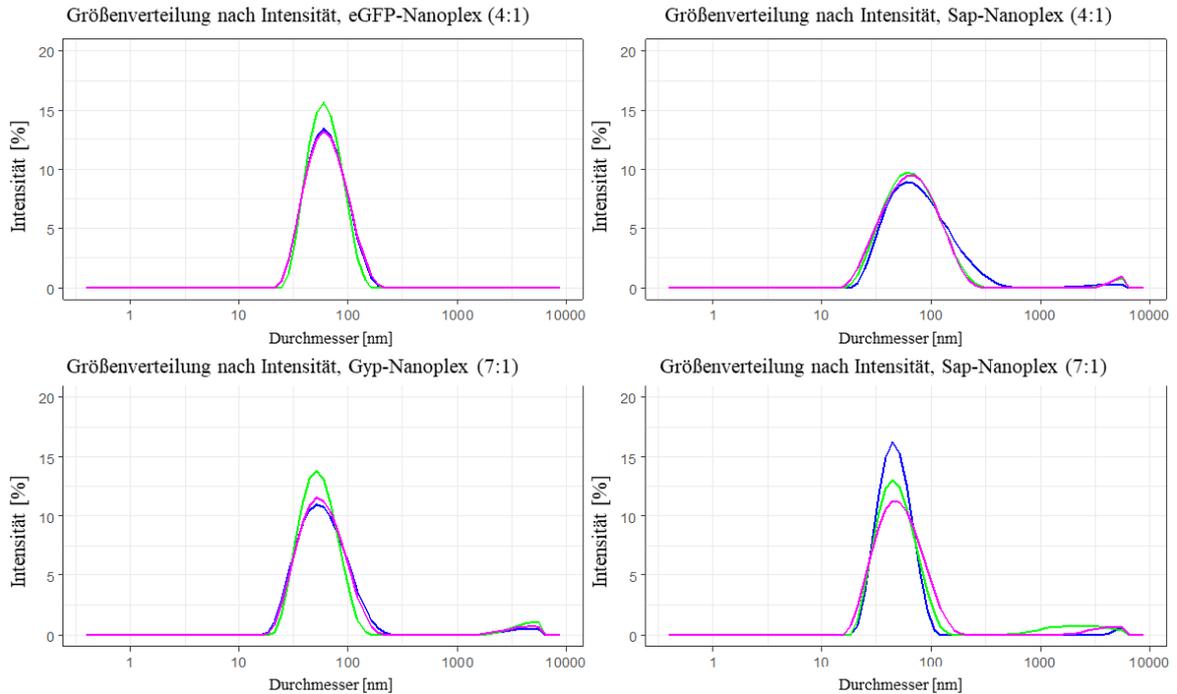


Abb. 35 Größenverteilung der verwendeten Nanoplexe

Verschiedene Farben entsprechen mehreren Messungen derselben Probe. Alle Partikelformulierungen zeigen eine enge Größenverteilung mit einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser von < 100 nm. Die Gyp- und Sap-Nanoplexe zeigen einen kleinen Anteil größerer Partikel (> 1µm). Ein größeres N/P-Verhältnis führt bei den Sap-Nanoplexen zu einer etwas engeren Größenverteilung. *Abb. nach Mitdank et al. (2022) [69], durchgeführt und ausgewertet von Meike Tröger.

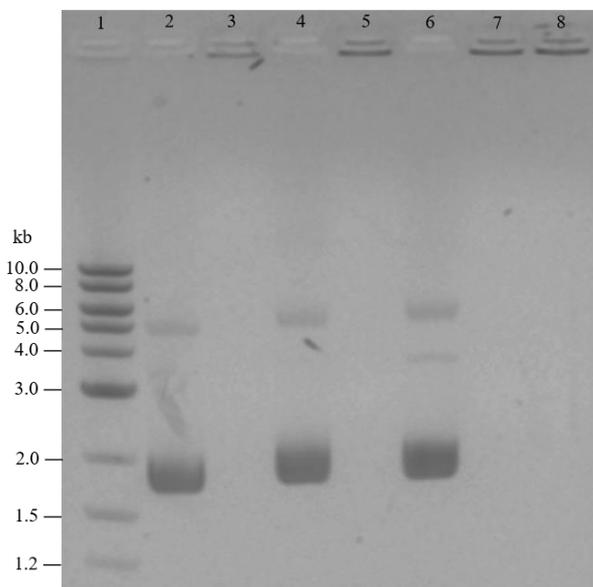


Abb. 36 Analyse der DNA-Komplexierung mittels Agarosegel-Retentions-Assay

Spur 1: DNA-Leiter, Spur 2: Nanoplasmid-eGFP, Spur 3: eGFP-Nanoplex (4:1), Spur 4: Nanoplasmid-Gyp, Spur 5: Gyp-Nanoplex (7:1), Spur 6: Nanoplasmid-Sap, Spur 7: Sap-Nanoplex (4:1), Spur 8: Sap-Nanoplex (7:1). Bei keiner untersuchten Nanoplex-Formulierung (Spur 3,5,7 und 8) konnte freie DNA detektiert werden. *Abb. nach Mitdank et al. (2022) [69], durchgeführt und ausgewertet von Meike Tröger.

3.2.2 In-vitro-Wirksamkeit der Nanoplasmeide

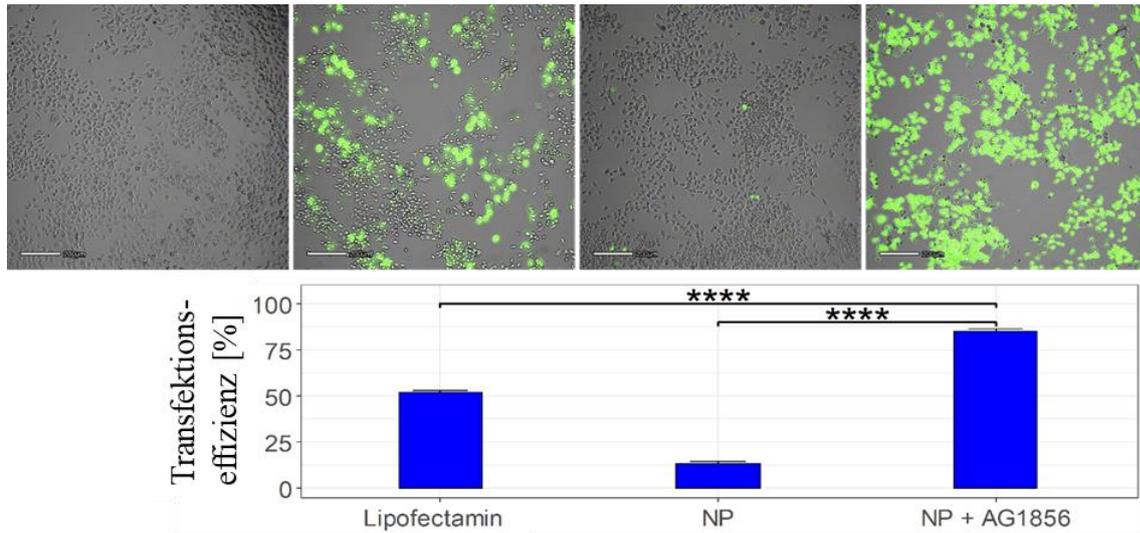


Abb. 37 Bestimmung der Transfektionseffizienz der eGFP-Nanoplexe

Transfektion von Neuro-2A Zellen mit zielgerichteten eGFP-Nanoplexen+AG1856 (NP+AG1856) oder Lipofectamin. Untersuchung der Zellen nach 48 h Inkubation mittels Fluoreszenzmikroskopie (oben) und Durchflusszytometrie (unten). Oben, von links nach rechts: Negativkontrolle, Nanoplasmid-eGFP/ Lipofectamin, Nanoplasmid-eGFP/ Peptid Y (NP), NP+AG1856. Größte Transfektionseffizienz mit NP+AG1856 (5 µg/mL). Ergebnisse als Mittelwert ± SD, n=3. Zeitseitiger t-Test, ****p ≤ 0.0001. *Abb. nach Mitdank et al. (2022) [69], durchgeführt und ausgewertet von Meike Tröger.

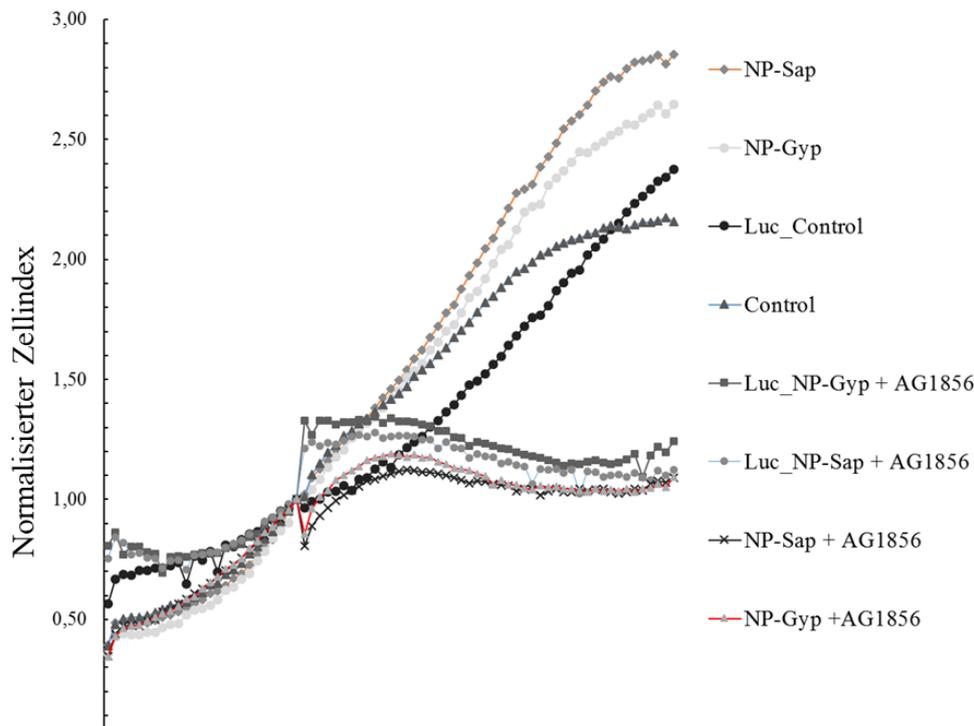


Abb. 38 Kamerabasierte (CytoSMART® Omni) Analyse der Wirksamkeit zielgerichteter Suizidgen-Nanoplexe in Neuro-2A- und Neuro-2A_Luc-Zellen

Behandlung der Zellen mit zielgerichteten Nanoplexen ± AG1856 (5 µg/mL). Zellen, die mit beiden Komponenten behandelt wurden, zeigten eine starke Hemmung der Proliferation. Die Zellproliferation wurde auf den Zeitpunkt der Intervention (Zugabe der Nanoplexe ± AG1856) normalisiert (t=24 h). Beide Suizidgen-Nanoplexe führten mit AG1856 zu deutlicher Wachstumshemmung im Vergleich zu Nanoplexen ohne AG1856 sowie zur Negativkontrolle. *Abb. nach Mitdank et al. (2022) [69], durchgeführt und ausgewertet von Alexander Sonntag.

3.2.3 In-vivo-Wirksamkeit von Suizid-Nanoplasmiden

Unbedenklichkeit der Therapie

Vor der eigentlichen Wirksamkeitsstudie wurde die Verträglichkeit der geplanten Therapie an zwei NMRI nu/nu Mäusen untersucht. Es konnten keine adversen Effekte auf die Mäuse in Folge der kombinierten Behandlung mit AG1856 und zielgerichteten Nanoplexen aus Peptid Y und Nanoplasmid-Sap (NP-Sap) festgestellt werden. Weder eine Abnahme des Körpergewichts über die Zeit der wiederholten Applikationen und darüber hinaus noch Veränderungen an wichtigen Organen (Leber, Lunge, Herz, Nieren, Darm) im Rahmen der Nekropsie am Versuchsende wurden beobachtet. Dementsprechend standen der geplanten Wirksamkeitsstudie keine Bedenken hinsichtlich der Verträglichkeit der Therapie gegenüber.

Studie:	17152	1. Messung	2. Messung	3. Messung	4. Messung	5. Messung	6. Messung
Datum	08.09.2020	KG [g]					
Gruppe	Tag	0	3	6	13	16	23
A	A1	31,7	32,4	33,3	35,5	35,7	38,8
	A2	26,3	27,9	27,6	30,7	31,1	31,0
	MW	29,0	30,2	30,4	33,1	33,4	34,9
	SD	3,8254	3,1466	3,9669	3,3870	3,2668	5,5366

	7. Messung	8. Messung	9. Messung	10. Messung	11. Messung	12. Messung	13. Messung
	KG [g]	KG [g]	KG [g]	KG [g]	KG [g]	KG [g]	KG [g]
Tag	27	31	34	36	41	45	48
A1	37,9	36,6	38,7	37,7	40,4	40,0	39,4
A2	31,5	31,3	32,5	31,9	34,0	34,2	33,4
MW	34,7	34,0	35,6	34,8	37,2	37,1	36,4
SD	4,4618	3,7406	4,4265	4,0941	4,4972	4,0588	4,2356

Abb. 39 Messreihe des Körpergewichts als Indikator für akute und chronische Toxizität

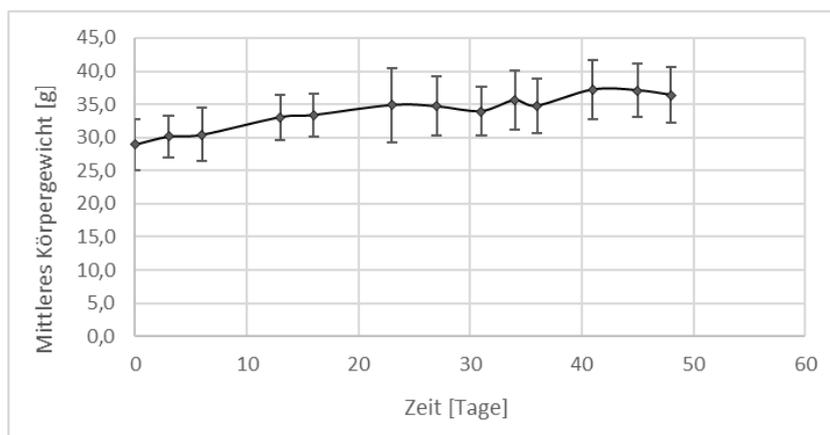


Abb. 40 Toxizitätsstudie zur Behandlung mit zielgerichteten NP-Sap-Nanoplexen und AG1856

Zur Beurteilung einer möglichen akuten oder chronischen Toxizität der Behandlung erhielten 2 NMRI nu/nu Mäuse die kombinierten Applikationen von AG1856 (s.c.) und zielgerichteten Nanoplexen mit NP-Sap (i.v.) an den Tagen 3,6, 27, 31, 34 und 36. Das Körpergewicht wurde regelmäßig bestimmt. Es war keine Abnahme des Körpergewichts feststellbar, ebenso keine Auffälligkeiten im Verhalten der Mäuse.

Wirksamkeitsstudie

Tab. 28 Tumorvolumen (TV) an Tag 4,7 und 11 der Studie zur Wirksamkeit von NP-Sap-Nanoplexen

Gruppe:	TV [mL] an Tag 4			TV [mL] an Tag 7			TV [mL] an Tag 11		
	PBS	NP	NP+ AG1856	PBS	NP	NP+ AG1856	PBS	NP	NP+ AG1856
1	0,126	0,064	0,083	0,362	0,074	0,068	1,926	0,972	0,202
2	0,004	0,004	0,018	0,374	0,004	0,014	1,813	0,121	0,014
3	0,039	0,062	0,053	0,172	0,185	0,239	0,633	0,567	1,364
4	0,035	0,028	0,035	0,105	0,061	0,160	0,541	0,168	0,811
5	0,053	0,062	0,066	0,385	0,112	0,051	0,775	0,227	0,133
6	0,068	0,038	0,034	0,089	0,141	0,036	0,526	0,864	0,676
7	0,015	0,041	0,051	0,099	0,100	0,100	1,276	0,544	0,276
8	0,048	0,083	0,114	0,163	0,126	1,569	0,124	0,950	2,731
MW:	0,0485	0,0478	0,0568	0,2186	0,1004	0,2796	0,9518	0,5516	0,7759
SD:	0,0374	0,0249	0,0307	0,1318	0,0550	0,5261	0,6507	0,3528	0,9065

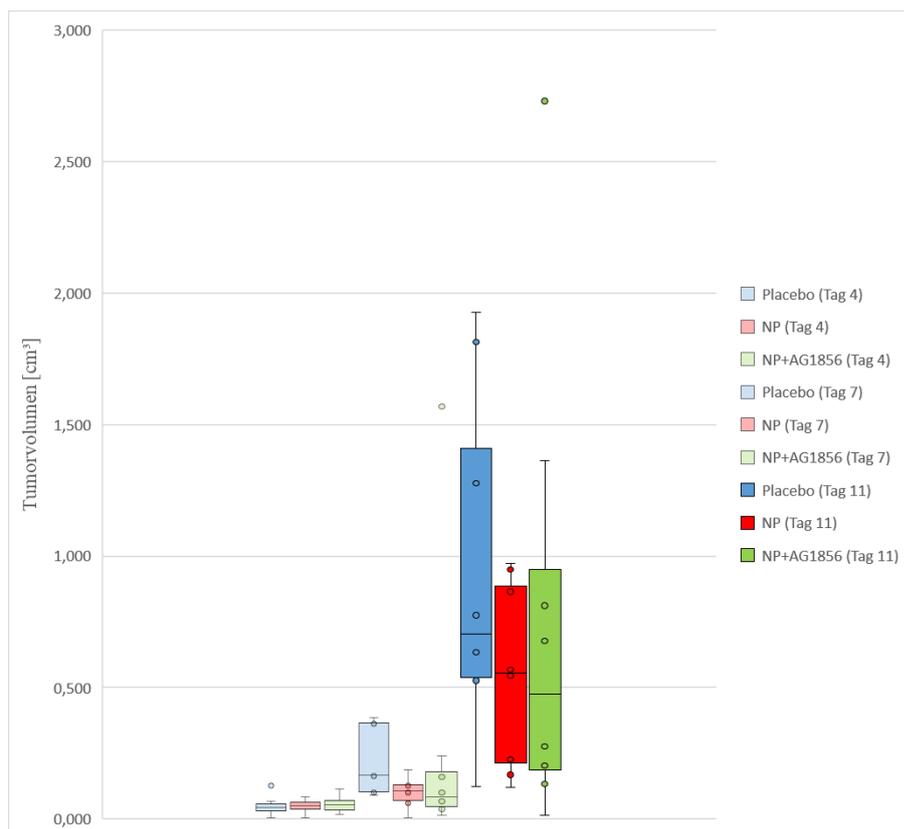


Abb. 41 Boxplot-Diagramm der antitumoralen Wirkung der NP-Sap-Nanoplexe (NP) in tumortragenden Mäusen 8 NMRI nu/nu Mäuse pro Gruppe, die entweder nur NP oder NP+AG1856 oder PBS (Placebo) erhielten. Dargestellt ist das Tumorvolumen [mL] an Tag 4,7 und 11 der Wirksamkeitsstudie. *Abb. nach Mitdank et al. (2022) [69].

Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Studiengruppen an Tag 11

Die Methode der Wahl zur Prüfung auf einen signifikanten Unterschied zwischen mehr als zwei Gruppen ist die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA). Die Nullhypothese lautet: Es gibt keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Bei Durchführung der ANOVA mit der Statistik-Software R wird ein p-Wert von 0,506 ausgegeben. Da dieser größer als 0,05 ist, gilt die Nullhypothese, d.h. die Gruppen unterscheiden sich nicht.

Jedoch sollten auch die Voraussetzungen für die Anwendung der ANOVA geprüft werden. Die Voraussetzungen sind normalverteilte Stichproben mit ähnlichen Varianzen. Die Normalverteilung kann sowohl grafisch mittels Q-Q-Plot (Quantil-Quantil-Diagramm) und Histogramm als auch analytisch mittels Shapiro-Wilk-Test überprüft werden. Für die grafische Prüfung mittels Q-Q-Plot wurden die Daten z-standardisiert. Auffällig ist ein sehr großer Wert in der Gruppe NP+AG1856 (rot markiert in Tab. 29), der als Ausreißer in Betracht kommt.

Tab. 29 Tumolvolumen [mL] der 3 Gruppen an Tag 11 sowie MW, SD, IQR und z-Werte

	PBS	z-Werte (PBS)	NP	z-Werte (NP)	NP+AG1856	z-Werte (NP+AG1856)
	1,926	1,497	0,972	1,192	0,202	-0,633
	1,813	1,324	0,121	-1,221	0,014	-0,840
	0,633	-0,490	0,567	0,044	1,364	0,649
	0,541	-0,631	0,168	-1,087	0,811	0,039
	0,775	-0,272	0,227	-0,920	0,133	-0,709
	0,526	-0,654	0,864	0,885	0,676	-0,110
	1,276	0,498	0,544	-0,022	0,276	-0,551
	0,124	-1,272	0,950	1,129	2,731	2,157
MW:	0,95175		0,551625		0,776	
SD:	0,6507		0,3528		0,9065	
IQR:	0,873		0,673		0,765	

Formel zur Berechnung des z-Werts:

$$z = \frac{x - \mu}{\sigma}$$

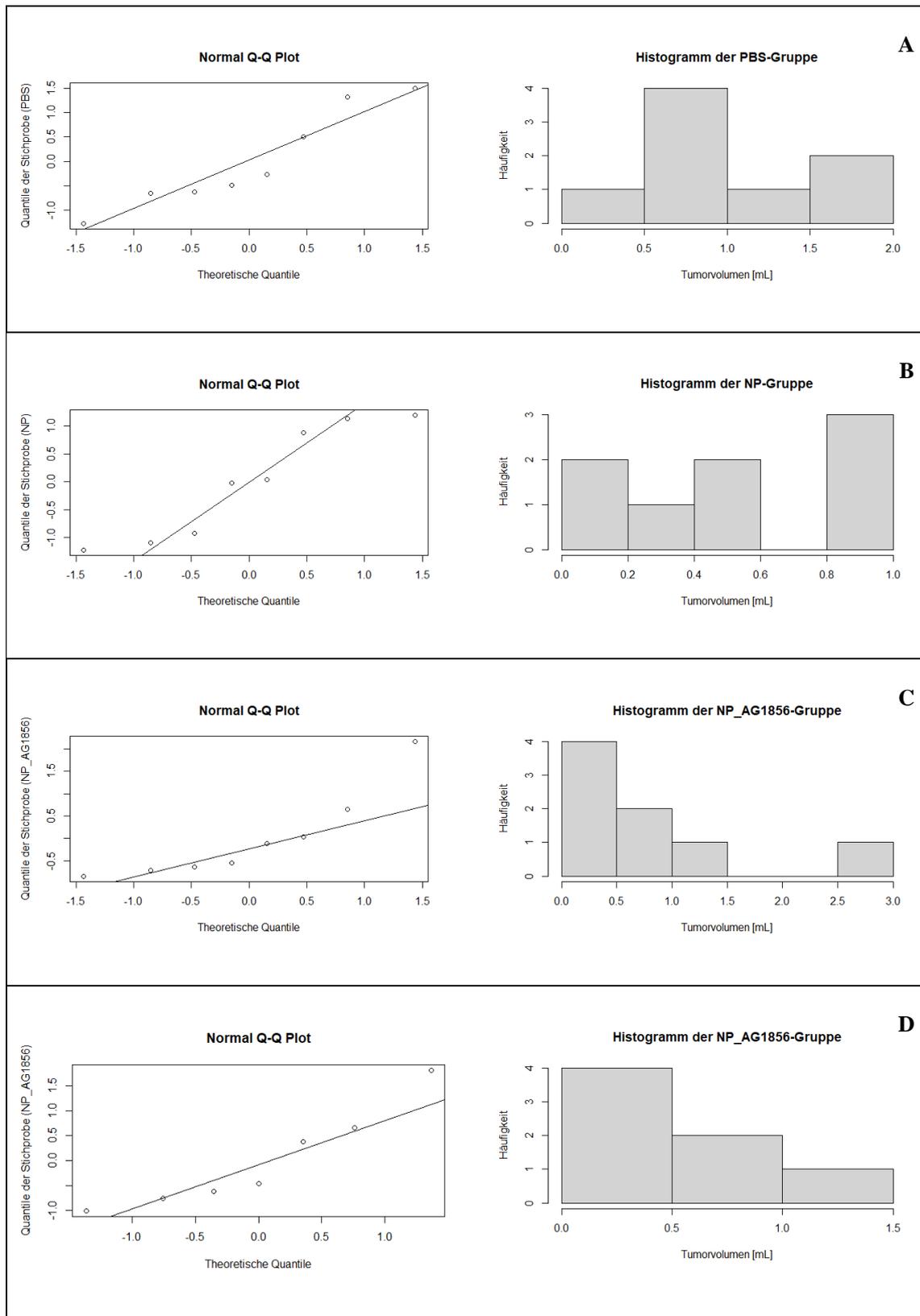


Abb. 42 Q-Q-Plots (z-standardisiert) und Histogramme der 3 Gruppen (Tag 11 der Studie)

Grafische Prüfung auf Normalverteilung mittels Q-Q-Plot (links) und Darstellung als Histogramm (rechts). Bei D wurde für die Gruppe NP+AG1856 der mögliche Ausreißer entfernt, um die Auswirkung auf die Verteilung darzustellen. Erwartungsgemäß resultierte eine Annäherung an die Normalverteilung.

Der potentielle Ausreißer wirkt sich auch auf die Abweichung der Werteverteilung der einzelnen Gruppen von der Normalverteilung aus. Während die Verteilung der Werte bei der Placebo- (Abb. 42, Zeile A) und NP-Gruppe (Abb. 42, Zeile B) als Normalverteilung angesehen werden kann, weicht sie bei der NP+AG1856-Gruppe (Abb. 42, Zeile C) aufgrund des großen letzten Werts stärker von einer Normalverteilung ab. Das Entfernen dieses Wertes führt zu einer Annäherung an die Normalverteilung (Abb. 42, Zeile D).

Das gleiche Ergebnis liefert der Shapiro-Wilk-Test: Unter Einbeziehung des möglichen Ausreißers muss die Annahme des Vorliegens einer Normalverteilung verworfen werden, ohne den Wert kann von Normalverteilung ausgegangen werden (Tab. 30).

Tab. 30 p-Werte aus Shapiro-Wilk-Test in R

Gruppe	p-Wert
PBS	0,2945
NP	0,184
NP_AG1856	0,03934 (kleiner 0,05 → Nullhypothese (Daten sind normalverteilt) muss verworfen werden.
NP_AG1856 (ohne Ausreißer)	0,3071

Der potenzielle Ausreißer führt auch zur Beeinträchtigung der anderen Voraussetzung für die Anwendung der ANOVA, dem Vorliegen ähnlicher Varianzen. Tab. 31 verdeutlicht den negativen Einfluss des großen Wertes in der NP+AG1856-Gruppe in dieser Hinsicht.

Tab. 31 Vergleich der Varianzen

Gruppe	Varianz
PBS	0,4234348
NP	0,1244683
NP_AG1856	0,8217947
NP_AG1856 (ohne Ausreißer)	0,2306626

Handelt es sich um einen Ausreißer?

Zur Identifizierung von Ausreißern können zwei gängige Regeln angewandt werden:

1. Ausreißern führen zu z-Werten von < -3 oder > 3 .

Dazu werden die Werte durch Anwendung der rechts gezeigten Formel in z-Werte umgewandelt (z-Standardisierung). Wie aus Tab. 29 ersichtlich wird, handelt es sich nach dieser Definition nicht um einen Ausreißer, da der z-Wert nur 2,157 beträgt.

2. 1,5xIQR-Regel: Ausreißer sind Werte, die mehr als das 1,5-fache des IQR unter dem ersten 1. Quartil oder mehr als das 1,5-fache des IQR über dem 3. Quartil liegen.

IQR ist der Interquartilsabstand, also die Breite des Intervalls, indem die mittleren 50 % der Werte einer Stichprobe liegen, wenn diese Stichprobe der Größe ihrer Werte nach sortiert wurde. Damit entspricht der IQR der Länge der Box im Boxplot. Für den als Ausreißer in Frage kommenden Wert wurden folgende Grenzen bestimmt:

1. Quartil: 0,18475 → $Q1 - 1,5 \cdot IQR = -0,962$
 3. Quartil: 0,94925 → $Q3 + 1,5 \cdot IQR = 2,096$

Der zu beurteilende Wert liegt mit 2,731 mehr als das 1,5-fache des IQR über dem 3. Quartil (2,096). Demnach ist der Wert als Ausreißer anzusehen. Dies kann auch direkt dem Boxplot (Abb. 43) entnommen werden, denn nach einer Definition von John W. Tukey wird die Länge der Whisker (Antennen) im Boxplot auf maximal das 1,5-fache des IQR beschränkt, wobei die Whisker bereits bei dem Wert enden, der noch innerhalb dieser Grenzen liegt. Außerhalb der Whisker liegende Werte können als Ausreißer angesehen werden.

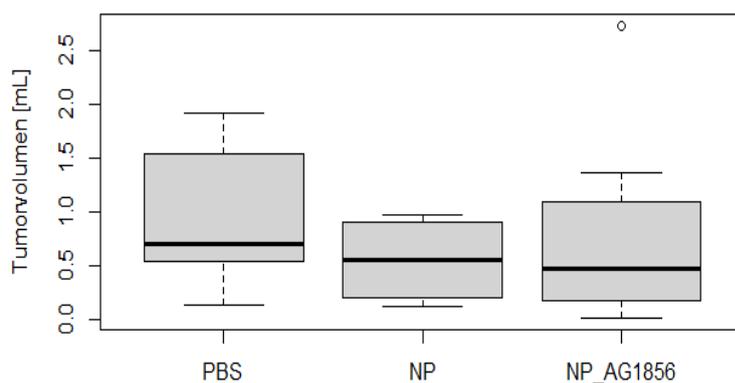


Abb. 43 Boxplot der 3 Gruppen (Tumorzellen an Tag 11)

Wird der größte Wert aus der NP_AG1856-Gruppe als Ausreißer entfernt, um die Voraussetzungen für die ANOVA zu erfüllen, verkleinert sich der ausgegebene p-Wert dadurch von 0,506 auf 0,186. Damit ist der p-Wert weiterhin größer als 0,05, d.h. es gilt die Nullhypothese: es gibt keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten der Gruppen.

Vergleicht man die 3 Gruppen der Studie hinsichtlich ihres Medians, zeigt sich nichtsdestotrotz ein kleineres Tumorzellen durch die Behandlung mit NP-Sap-Nanoplex (NP) im Vergleich zu Placebo (PBS) und ein abermals kleineres Tumorzellen durch die kombinierte Behandlung mit NP und AG1856.

Tab. 32 Statistische Werte zur Entwicklung des Tumorzvolumens in den 3 Studiengruppen bis Tag 11

Gruppe	Tag:		0	4	7	11
Placebo	(n)		8	8	8	8
	Tumorzvolumen [cm ³]	Median	0,004	0,044	0,168	0,704
		MW	0,004	0,049	0,219	0,952
		SD	0,0000	0,0374	0,1318	0,6507
	RTV	Median	1,0	10,9	41,9	176,1
		MW	1,0	12,2	54,7	238,0
NP	(n)		8	8	8	8
	Tumorzvolumen [cm ³]	Median	0,004	0,052	0,106	0,556
		MW	0,004	0,048	0,100	0,552
		SD	0,0000	0,0249	0,0550	0,3528
	RTV	Median	1,0	12,9	26,5	138,9
		MW	1,0	12,0	25,1	137,9
	T/C [%]		100,0	98,5	45,9	58,0
NP+ AG1856	(n)		8	8	8	8
	Tumorzvolumen [cm ³]	Median	0,004	0,052	0,084	0,476
		MW	0,004	0,057	0,280	0,776
		SD	0,0000	0,0307	0,5261	0,9065
	RTV	Median	1,0	13,1	21,0	119,0
		MW	1,0	14,2	69,9	194,0
	T/C [%]		100,0	117,0	127,9	81,5
Ohne Berücksichtigung des Ausreißers:						
NP+ AG1856	(n)		7	7	7	7
	Tumorzvolumen [cm ³]	Median	0,004	0,051	0,068	0,276
		MW	0,004	0,049	0,095	0,497
		SD	0,0000	0,0218	0,0793	0,4803
	RTV	Median	1,0	12,8	17,0	69,0
		MW	1,0	12,1	23,9	124,1
	T/C [%]		100,0	100,1	43,6	52,2

Hilfreich zur Auswertung der Wirksamkeit der Tumorthherapie ist auch das relative Tumorzvolumen (RTV), also das Tumorzvolumen an einem Tag X im Verhältnis zum Tumorzvolumen bei Versuchsbeginn. Das ermittelte RTV kann ins Verhältnis zum RTV der Kontrollgruppe am jeweiligen Tag gesetzt werden (T/C). So lässt sich die Reduktion des Tumorzwachstums in Bezug zur Kontrollgruppe nachvollziehen. In Tab. 32 ist zu erkennen, dass die NP-Gruppe bis Tag 11 nur 58 % des Tumorzwachstums der Kontrollgruppe erreichte, während die „NP+AG1856“-Gruppe eine Reduktion des Tumorzwachstums auf 81,5 % im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte. Auffällig ist, dass in dieser Gruppe die Tumore im Mittel bis Tag 4 und 7 sogar stärker gewachsen sind als die der Kontrollgruppe. Auch hier führt die Entfernung des identifizierten Ausreißers zur „Besserung“ und es zeigt sich an Tag 11 in der „NP+1856“-Gruppe eine vergleichbare, sogar minimal stärkere Hemmung des Tumorzwachstums als in der NP-Gruppe (T/C 52,2 % versus 58,0 %).

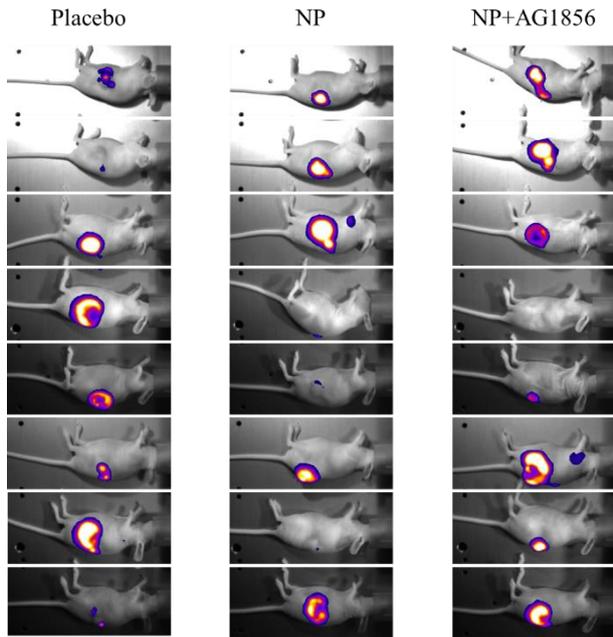


Abb. 44 Biolumineszenz-Bildgebung nach D-Luciferin-Injektion (150 mg/kg) an Tag 11

Bei optimaler Perfusion des Tumors mit dem applizierten D-Luciferin sollte dieser umso stärker biolumineszieren, je größer er ist. *Abb. nach Mitdank et al. (2022) [69].

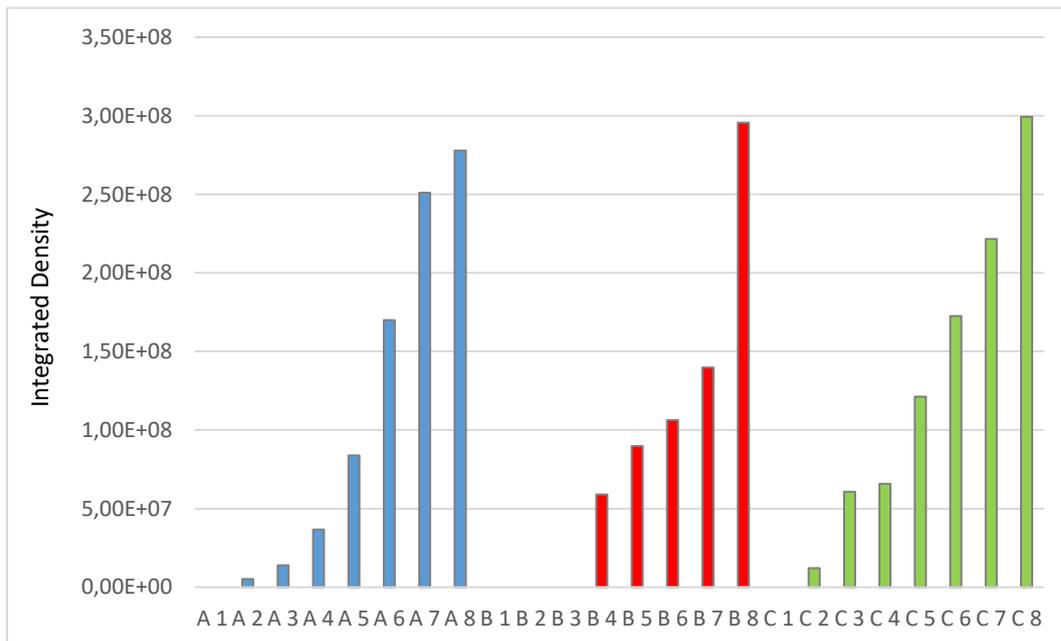


Abb. 45 Quantifizierung der BLI-Signale nach D-Luciferin-Injektion (150 mg/kg) an Tag 11

Die Ergebnisse jeder Gruppe wurden nach aufsteigender Signalintensität sortiert. A: Placebo, B: NP, C: NP+AG1856. Die Quantifizierung der BLI-Signale korreliert offensichtlich nicht gut mit den Caliper-Messungen zur Bestimmung des Tumolvolumens, sonst wäre z. B. bei den BLI-Signalen der Ausreißer in der Gruppe NP+AG1856 zu sehen. Stattdessen gibt es kaum einen Unterschied zwischen den Gruppen hinsichtlich ihres größten Signals. Für mehrere Mäuse konnte kein BLI-Signal quantifiziert werden. Möglicherweise war keine optimale Tumorperfusion mit D-Luciferin gegeben.

3.3 Isolierung des Saponins AG1856

3.3.1 Analyse des Rohextrakts

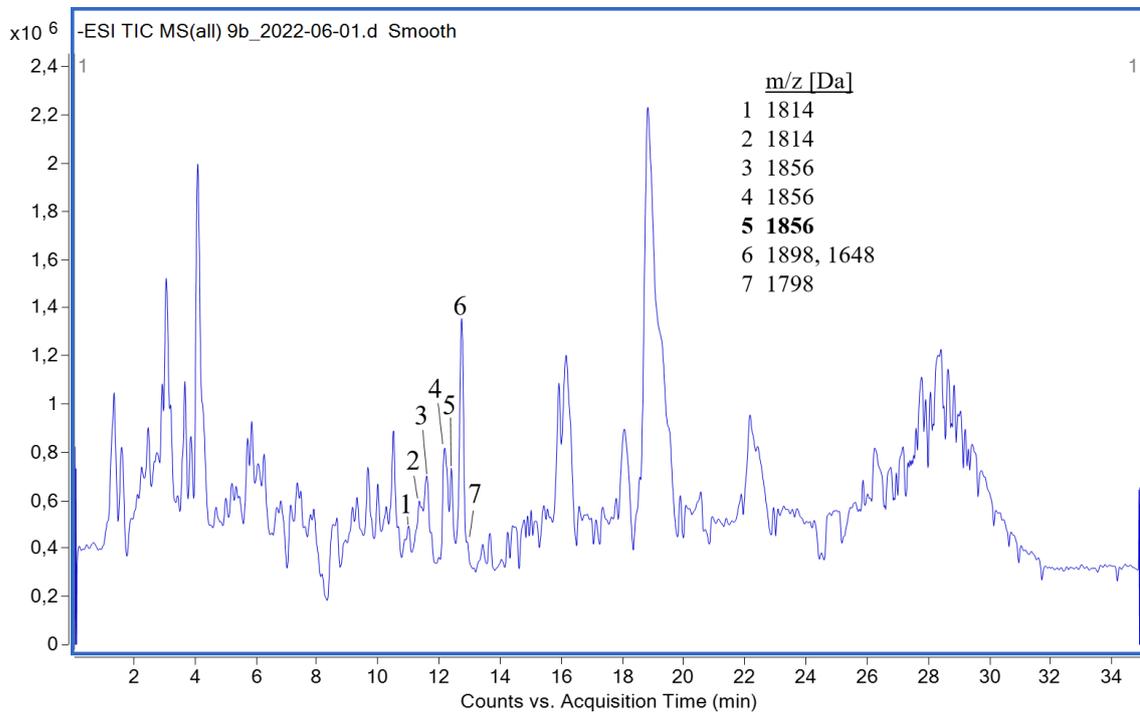


Abb. 46 LC-MS-(TIC)-Chromatogramm des Rohextrakts der Samen von *A. githago* L.
Konz.: 50 mg/mL in MeOH-H₂O (1:1, V/V), LC-MS-Methode 1a.

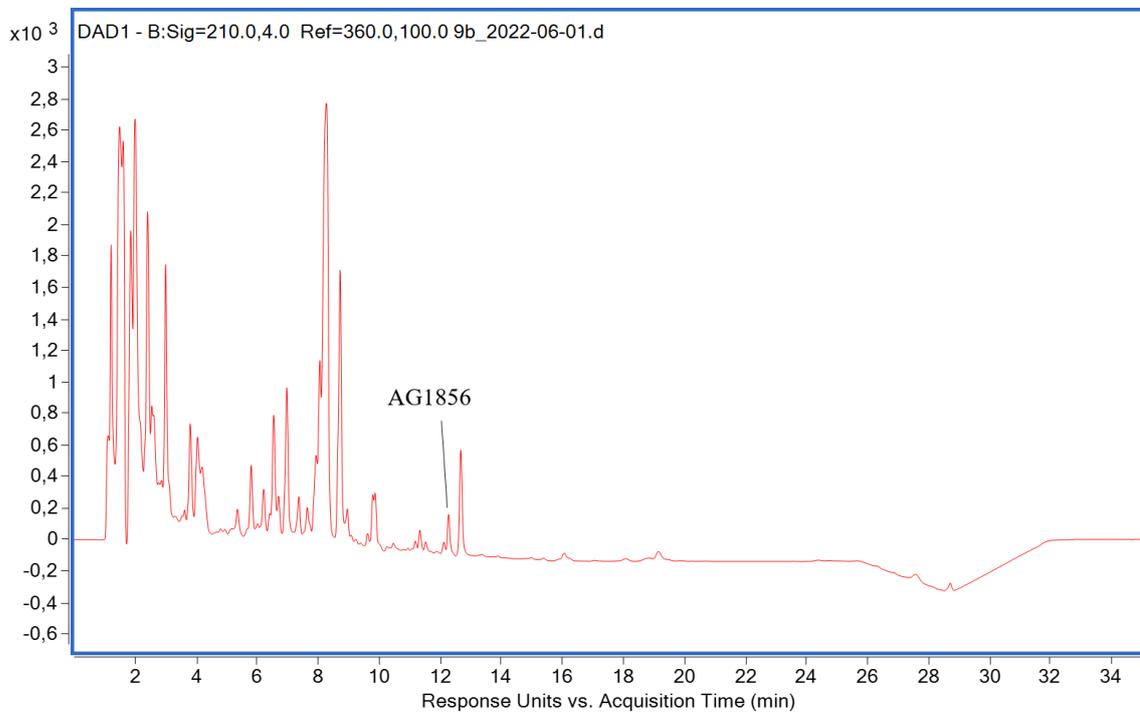


Abb. 47 LC-MS-Chromatogramm (DAD bei 210 nm) des Rohextrakts der Samen von *A. githago* L.
Konz.: 50 mg/mL in MeOH-H₂O (1:1, V/V), LC-Methode 1a.

3.3.2 Größenausschlusschromatographie (SEC)

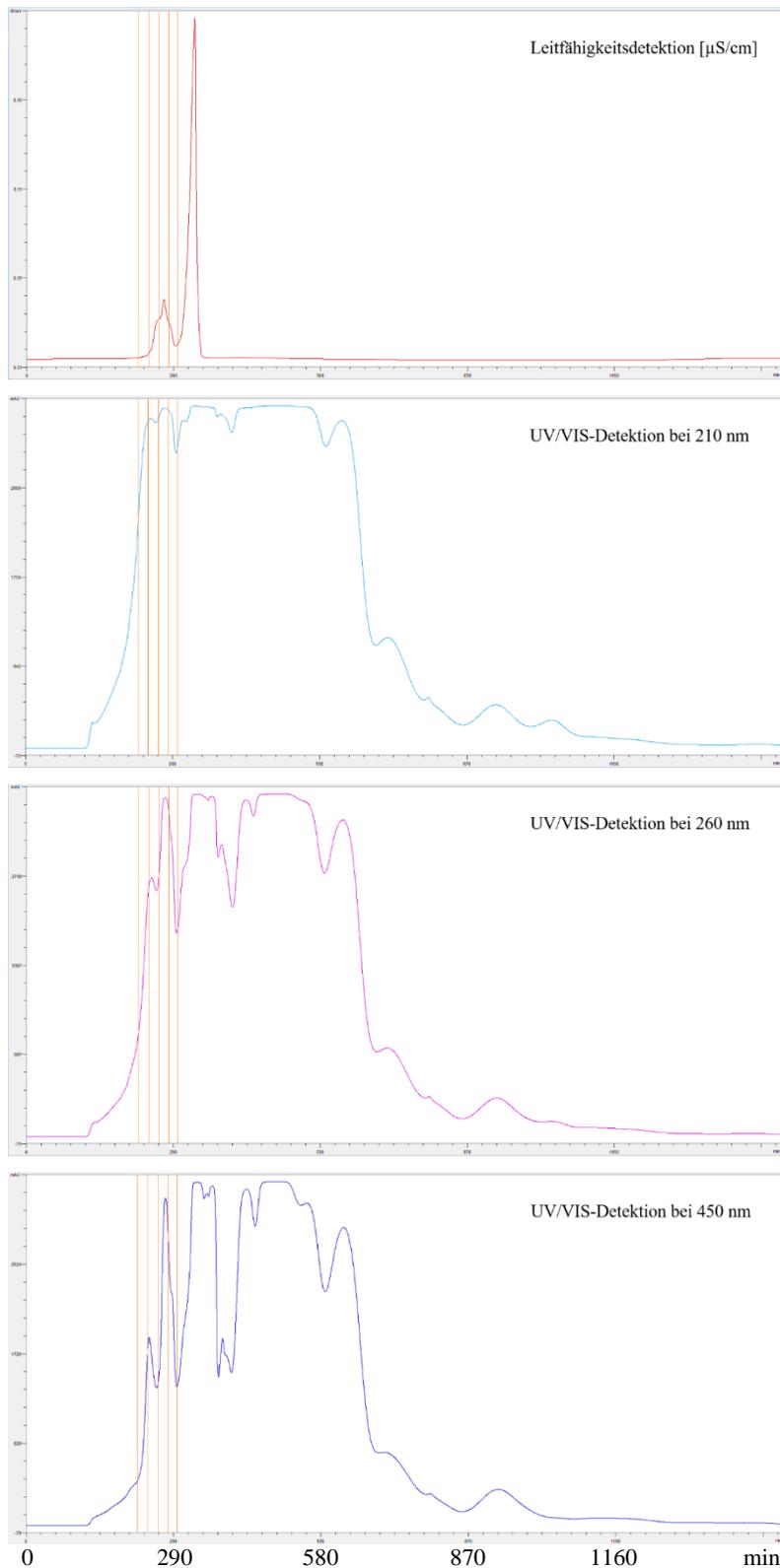


Abb. 48 Chromatogramme der SEC des Rohextrakts der Samen von *A. githago* L. Säulenbett: 10 x 1900 mm, Stationäre Phase: Sephadex LH-20, Mobile Phase: MeOH-Wasser (50:50, V/V), Flussrate: 0,3 mL/min, Probenvolumen: 2 mL (200 mg Rohextrakt), Azura LC-System (Knauer), orangefarbene Linien markieren die 4 gesammelten Fraktionen (220-240, 240-260, 260-280, 280-300 min).

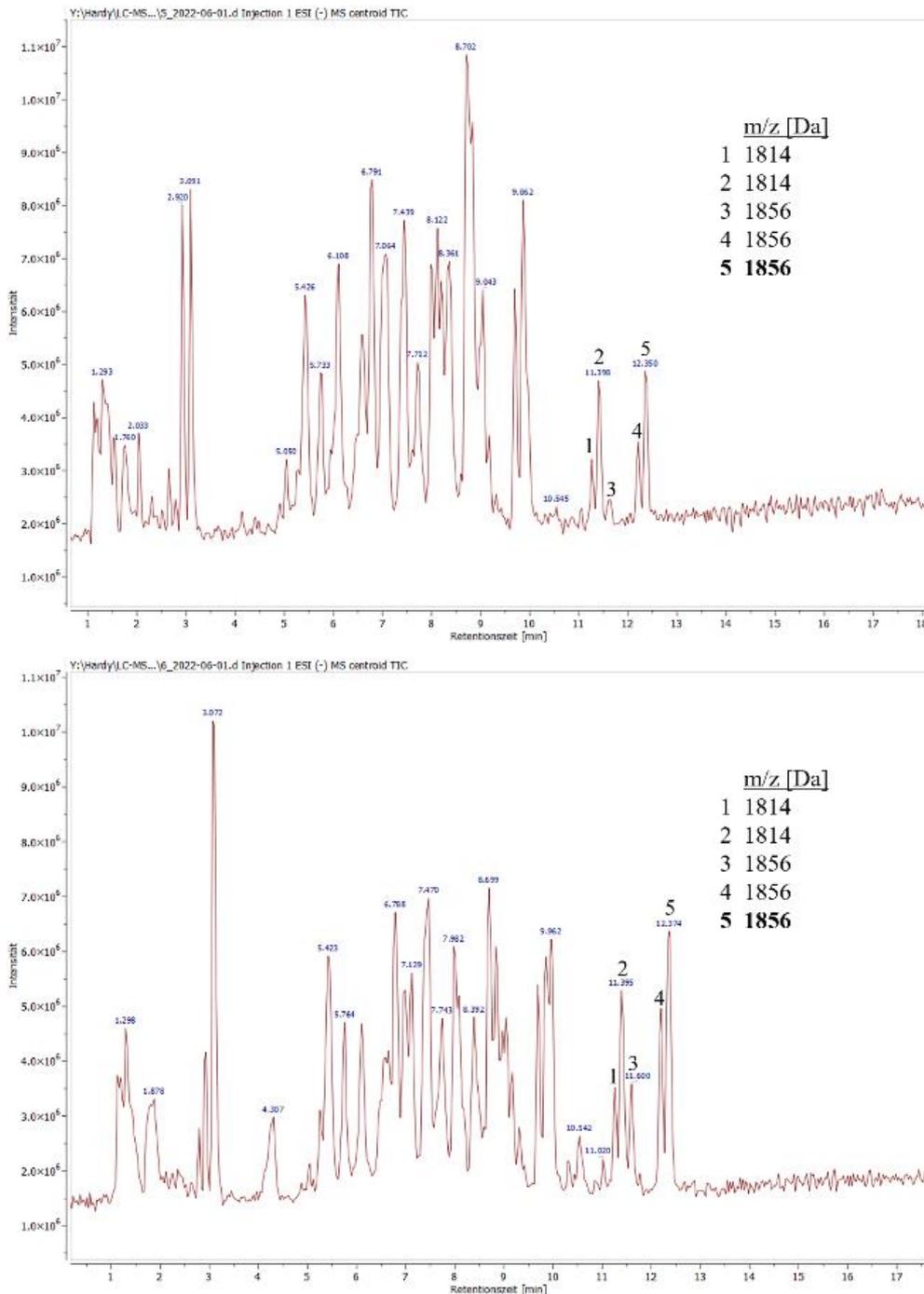


Abb. 49 LC-MS Chromatogramme der gesammelten SEC-Fractionen A (oben) und B (unten)
 SEC-Fractionen A (AG 220-240) und B (AG 240-260) wurden aufgefangen und direkt als Probe für die LC-MS (LC-MS-Methode 1) verwendet. In beiden wurden m/z 1856 und ähnliche m/z gemessen (AG1856 und strukturverwandte Saponine). Für Massenspektren und Fragment-Ionenspektren siehe Abb. A2.

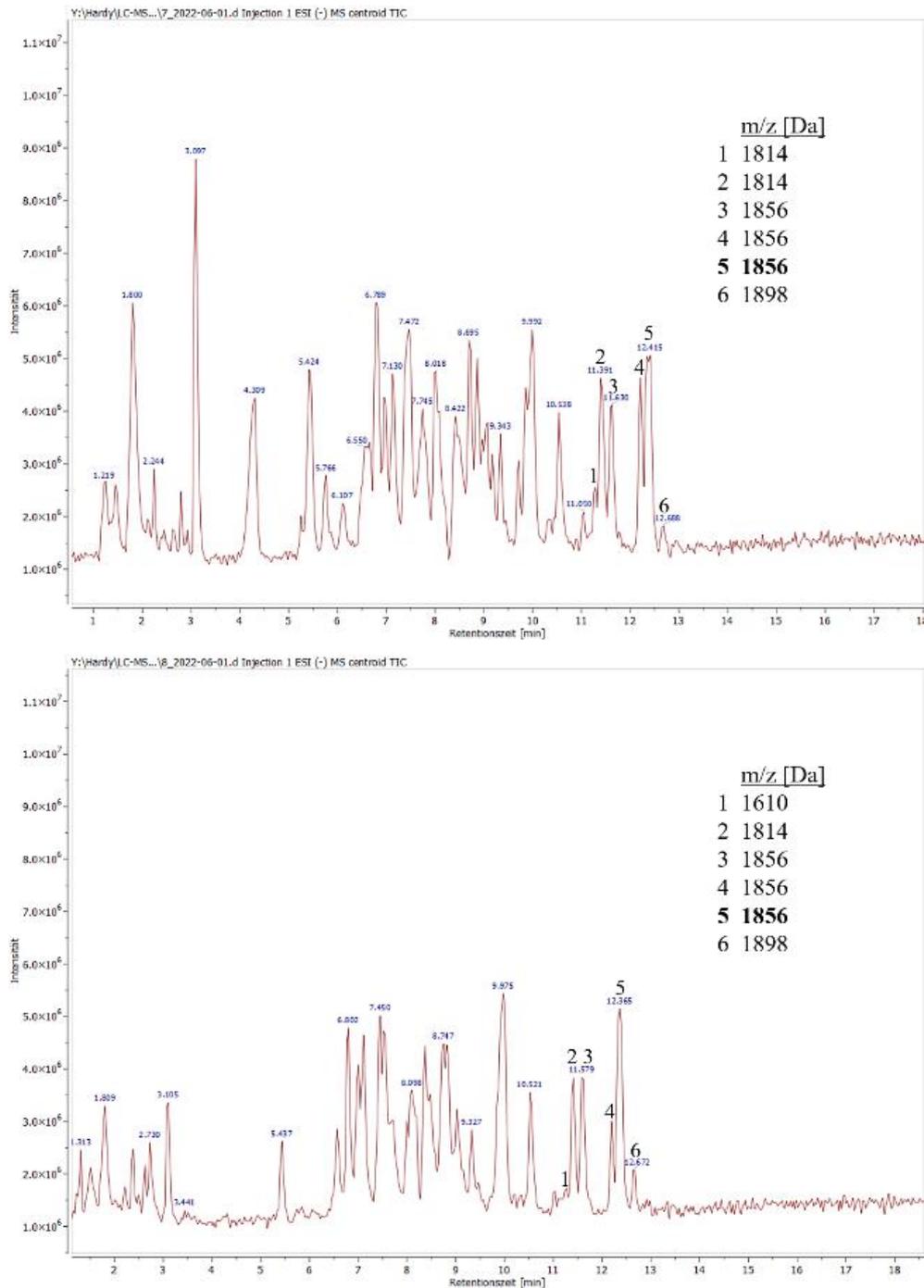
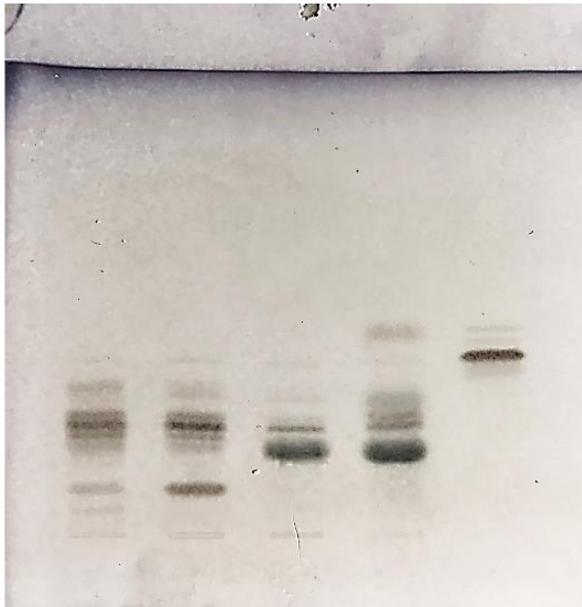


Abb. 50 LC-MS Chromatogramme der gesammelten SEC-Fractionen C (oben) und D (unten)
 SEC-Fractionen C (AG 260-280) und D (AG 280-300) wurden aufgefangen und direkt als Probe für die LC-MS (LC-MS-Methode 1) verwendet. In beiden wurden m/z 1856 und ähnliche m/z gemessen (AG1856 und strukturverwandte Saponine). Für Massenspektren und Fragment-Ionenspektren siehe Abb. A2.



Fraktion	AG 200-240	240-280	280-300	300-320	AG1856
Konz.	1 mg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL
PV	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	10 µL

Abb. 51 DC-Analyse von SEC-Fractionen im Vergleich mit isoliertem AG1856

Detektion von AG1856 in SEC-Fractionen von 200 bis 320 min. Platte: HPTLC Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck), Fließmittel: Chloroform/ Methanol/ Wasser/ Eisessig (60:40:10:5), Auftragung mit Linomat IV (CAMAG), Detektion mit VSR.
 *Durchgeführt von Marijan Czygan, Lena Sophie Bußmann.

3.3.3 Finaler Schritt – Semipräparative HPLC

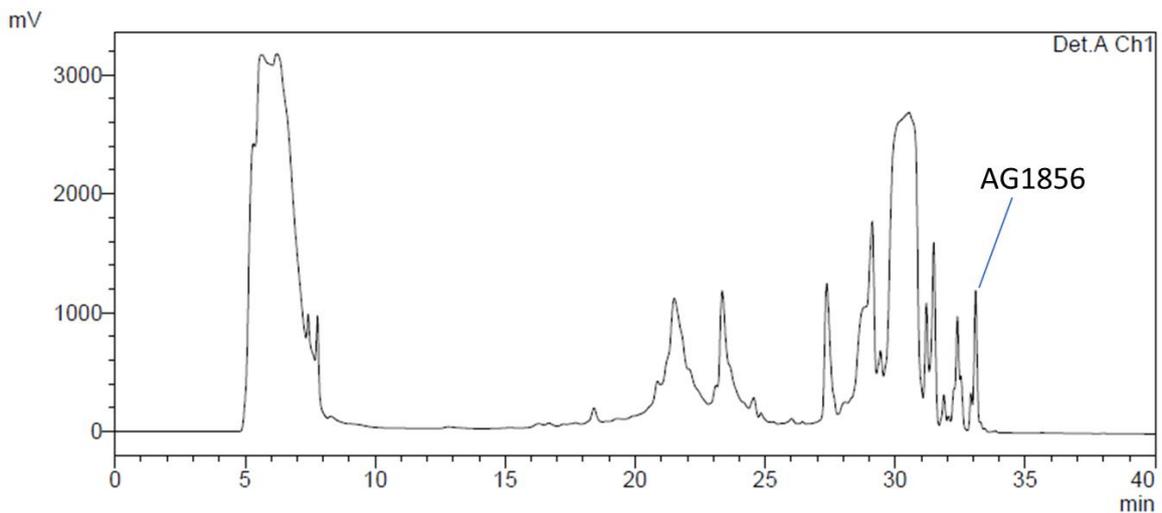


Abb. 52 Chromatogramm der semipräparativen HPLC zur Isolierung von AG1856 (210 nm)

LC-Methode 2 mit einer Flussrate von 2 mL/min, Probe: 10 mg gepoolte Sephadex-Fraktion in 2 mL ACN-Wasser (50:50, V/V).

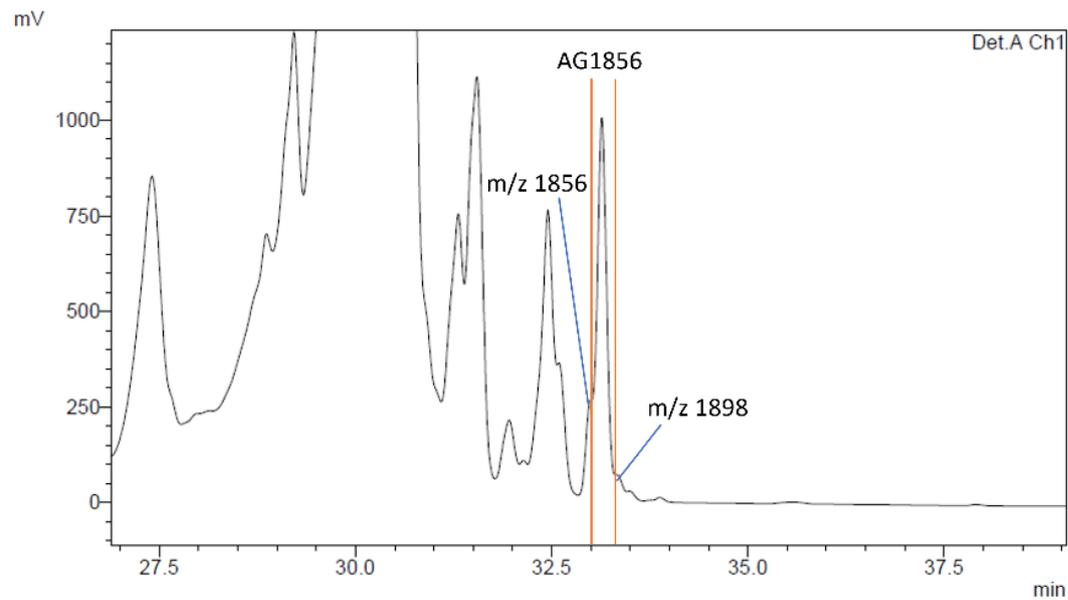


Abb. 53 Vergrößerung des Chromatogramms (Abb. 22) im Bereich der Elution von AG1856
Orangefarbene Linien markieren Beginn und Ende des manuellen Auffangens von AG1856.

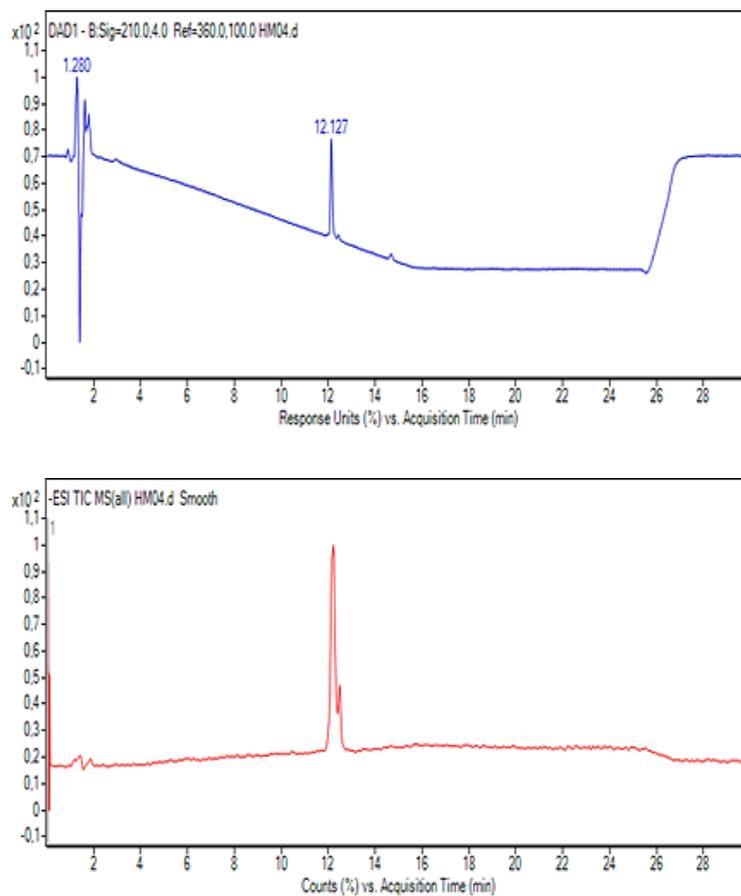


Abb. 54 Analyse des isolierten AG1856 mittels LC-ESI-MS
Oben: DAD-Chromatogramm (210 nm); Unten: TIC-Chromatogramm (LC-MS-Methode 1).

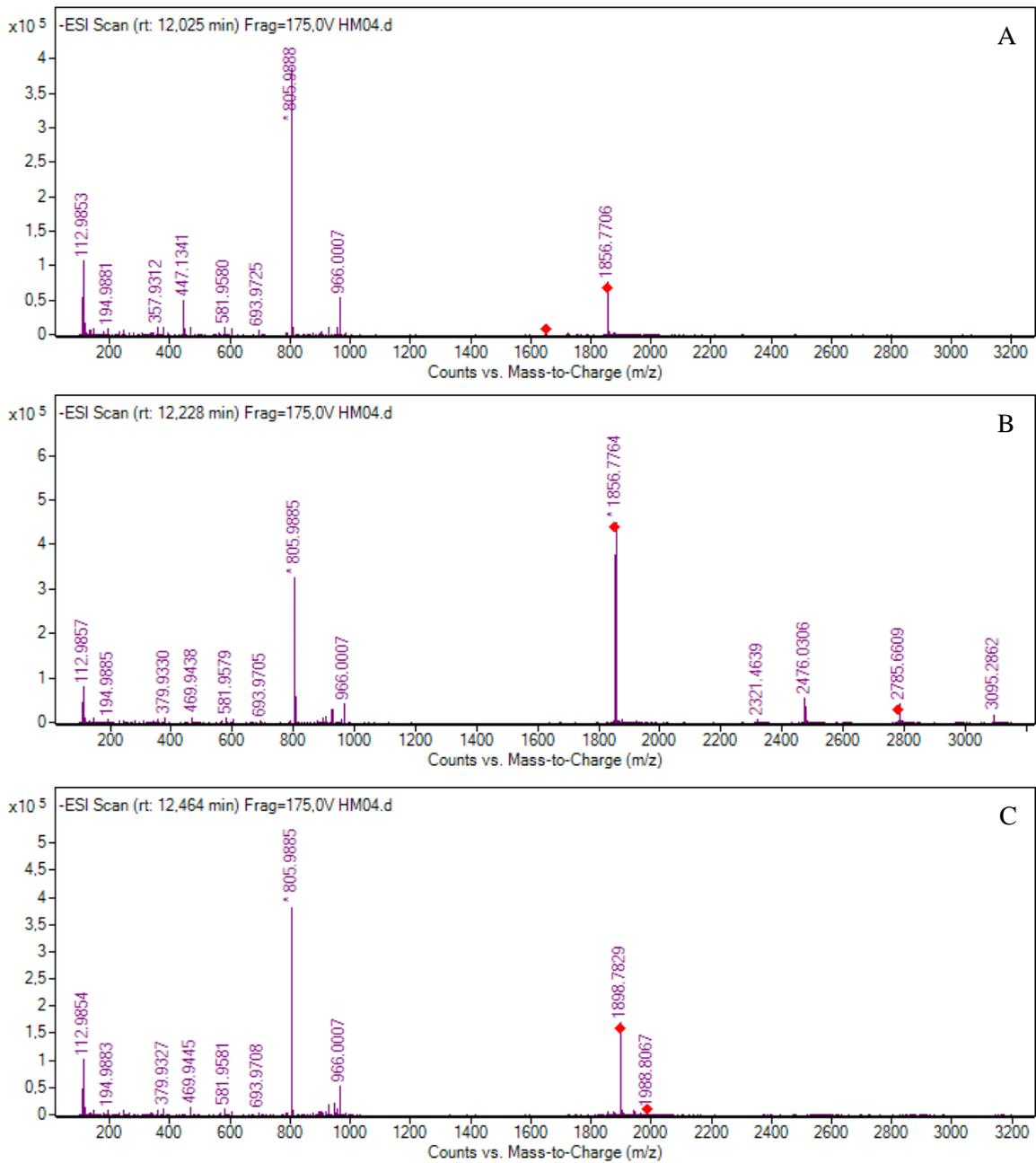


Abb. 55 Massenspektren zum isolierten AG1856

A = RT: 12,025 min (m/z 1856), B = RT: 12,228 min (AG1856), C = RT: 12,464 min (m/z 1898). B entspricht der Hauptverbindung des Isolats: AG1856. Bei A handelt es sich um ein Isomer mit der gleichen Masse. Bei C handelt es sich möglicherweise um AG1856 mit einer zusätzlichen Acetylgruppe (m+42).

3.3.4 Kalkulation der Ausbeute an AG1856

Tab. 33 Masseverlust der gemahlene Samen durch Entfetten mit Petrolether

Masse gemahlener Samen vor dem Entfetten [g]	Masse des entfetteten Samenmehls [g]	Masseverlust [%]
450	425,9	5,36
450	430,3	4,38
	Mittelwert:	4,87

Durch das Entfetten mit Petrolether ergab sich ein Masseverlust von 4,87 %. Aus 1,2 kg entfettetem Samenmehl wurden 90,2 g Rohextrakt gewonnen (Masseverlust: 92,48 %). Die Massen der 4 Sephadex-Fractionen wurden mit den Ergebnissen aus 8 Läufen à 0,2 g Rohextrakt bestimmt. Masseverlust: 49,09 %.

Tab. 34 Bestimmung der Massen der Sephadex-SEC-Fractionen des Rohextrakts

Fraktion [min]	Masse 8x [mg]	Masse pro Lauf [mg]
220-240	81,338	10,17
240-260	162,313	20,29
260-280	242,575	30,32
280-300	328,300	41,04
	Summe:	101,82

Die 4 Sephadex-Fractionen wurden gepoolt und 20-mal (à 10 mg) mittels semipräparativer HPLC fraktioniert. Es wurde die Masse des isolierten AG1856 bestimmt.

Tab. 35 Bestimmung der Masse des mit semipräparativer HPLC isolierten AG1856

HPLC-Fraktion	Tara [g]	mit Fraktion [g]	Masse 20x [mg]	Masse pro Lauf [mg]
AG1856	9,76920	9,78194	12,74	0,637

10 mg gepoolte Sephadex-Fraktion (220-300) enthalten demnach 0,637 mg AG1856. Das entspricht einem Masseverlust von 93,63 %. Aus 100 g Samen von *Agrostemma githago* L. konnten 232 mg AG1856 isoliert werden.

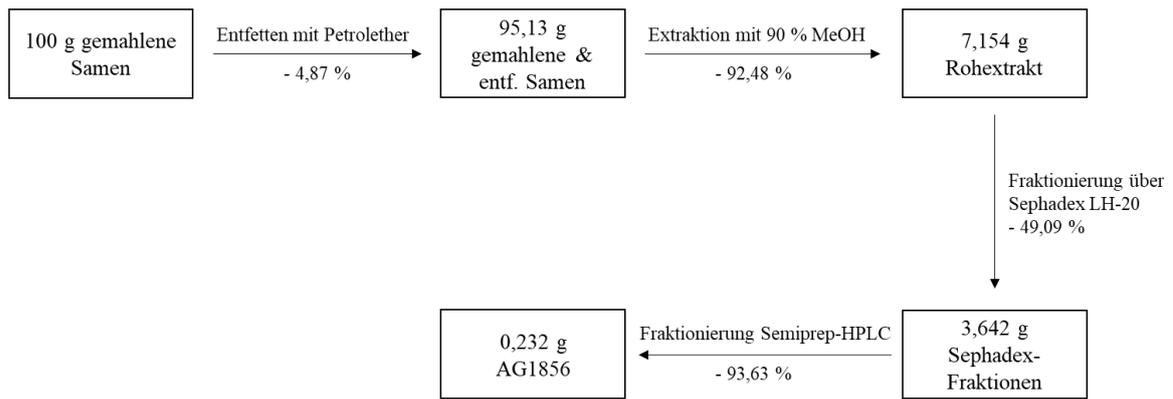


Abb. 56 Kalkulation der Ausbeute an AG1856 als Flussdiagramm

Die Ausbeute an AG1856 betrug 0,232 %.

3.4 Stabilität von AG1856

3.4.1 Lagerstabilität von AG1856

Das isolierte und gefriergetrocknete AG1856 wurde bei -20 °C langzeitgelagert. Wurde es für Experimente benötigt, wurde das entsprechende Sarstedt-Röhrchen vor dem Öffnen zunächst auf Raumtemperatur temperiert (mindestens 20 min), um die Bildung von Kondenswasser am/im Isolat zu vermeiden. Dennoch fiel bei einer LC-MS-Messung des gelagerten und wiederholt aus dem Tiefkühlschrank entnommenen AG1856 auf, dass mittlerweile zahlreiche Abbauprodukte entstanden waren, während eine Probe, welche nach der Gefriertrocknung in EtOH abs. gelöst wurde, auch nach längerer Lagerung bei -20 °C und wiederholter Entnahme für bspw. HPLC-Messungen nur ein Abbauprodukt in geringer Menge aufwies. Die Signale entsprechen hauptsächlich Abbauprodukten durch Desacetylierung (m/z 1772; 1814), in Abb. 57A ist allerdings auch ein kleiner Peak, der das Monodesmosid (nach Esterspaltung an C-28) repräsentiert (m/z 955).

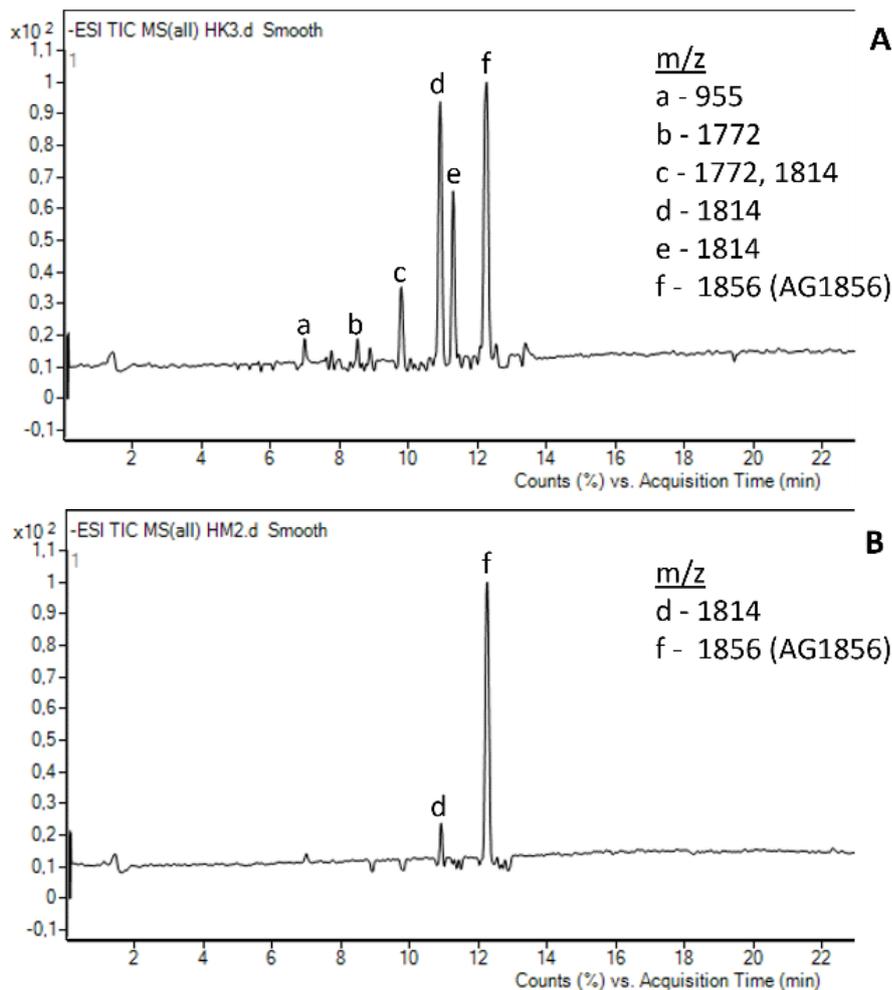


Abb. 57 ESI-TIC-Chromatogramme zur Stabilität von AG1856 im Vergleich

A: gefriergetrocknetes AG1856-Isolat nach längerer Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ & wiederholtem „Auftauen“,
 B: AG1856-Isolat nach Gefriertrocknung in EtOH abs. gelöst und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert & wiederholt „aufgetaut“,
 Konzentration: $10\text{ }\mu\text{M}$ in EtOH abs., für Massenspektren und Fragment-Ionenspektren der einzelnen Peaks siehe Abb. A3.
 *Messung durch Marie Köhn von Wedelstedt (LC-MS-Methode 1).

3.4.2 Stabilität von AG1856 in Abhängigkeit von pH-Wert und Temperatur

Die folgenden zwei Abbildungen wurden dem Bericht zum Forschungspraktikum von Fabian Bülow entnommen, der sich darin der Untersuchung der Stabilität von AG1856 widmete. Dabei analysierte er die Proben aus AG1856 in verschiedenen Puffern mittels HPLC hinsichtlich der Abnahme des AG1856-Peak-Integrals.

Die Ergebnisse offenbarten eine deutliche pH-abhängige Instabilität, in der Form, dass das Integral unter dem AG1856-Peak umso schneller abnahm, je höher der pH-Wert des verwendeten Puffers war (siehe Abb. 58). Stattdessen tauchten im Chromatogramm neue Peaks vergleichbar mit denen in Abb. 57A auf. Bereits ab neutralem pH ist die Instabilität beachtlich. Wie zu erwarten war, ist der Abbau auch von der Temperatur abhängig, bei der Untersuchung in Wasser (pH 5,65) ging das

AG1856-Signal bei 22 °C innerhalb von 2 Wochen auf knapp 75 % zurück, bei 40 °C innerhalb von einer Woche (Abb. 59).

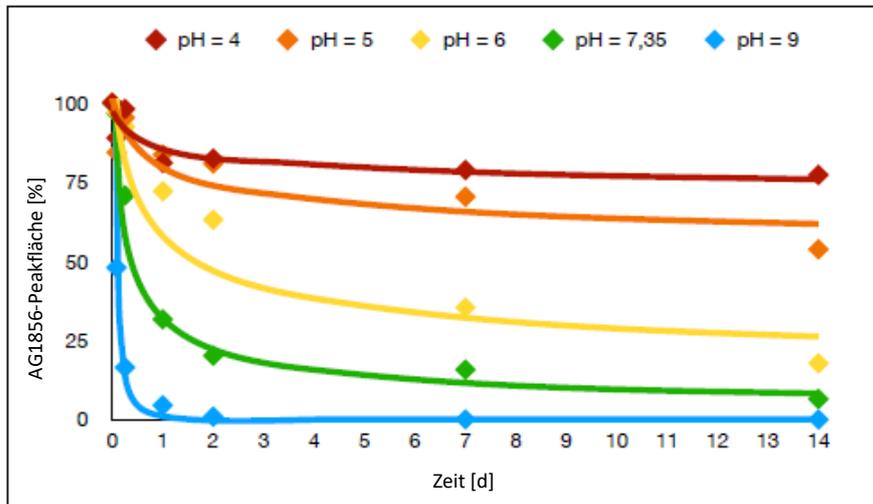


Abb. 58 pH-Stabilität von AG1856

0,2 mL einer AG1856-Stammlösung (2,5 mg/mL) wurden mit 0,8 mL des entsprechenden Puffers gemischt und während der Inkubation bei RT regelmäßig mittels HPLC analysiert. pH=4: Acetat-Puffer (25mM); pH=5: Citrat-Puffer (10mM); pH=6: Citrat-Puffer (10mM); pH=7,35: TRIS-Puffer (10mM); pH=9: TRIS-Puffer (10mM). *Durchgeführt und ausgewertet von Fabian Bülow.

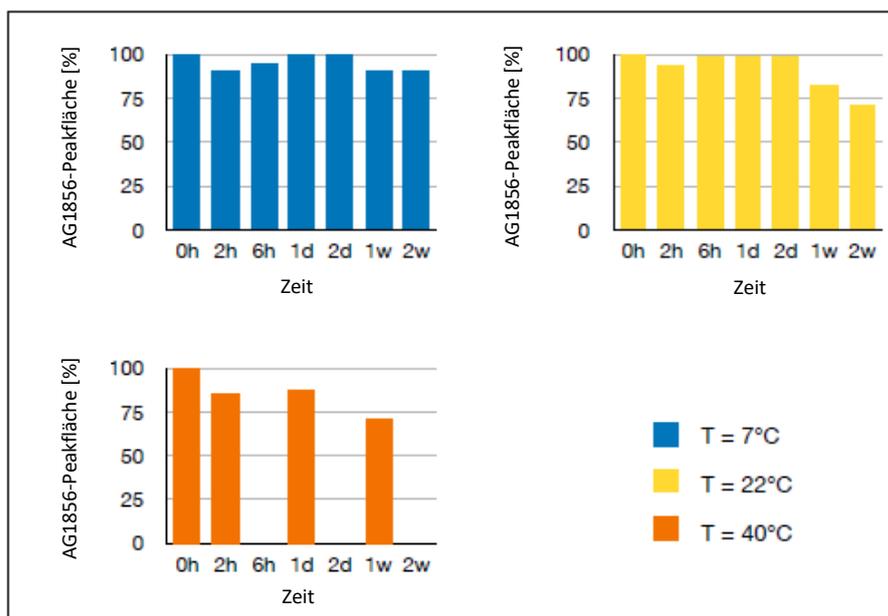


Abb. 59 Temperatur-Stabilität von AG1856

0,2 mL einer AG1856-Stammlösung (2,5 mg/mL) wurden mit 0,8 mL Reinstwasser (pH=5,65) gemischt und während der Inkubation bei der jeweiligen Temperatur regelmäßig mittels HPLC analysiert. *Durchgeführt und ausgewertet von Fabian Bülow.

3.5 DSC-Analyse von Modell-Liposomen

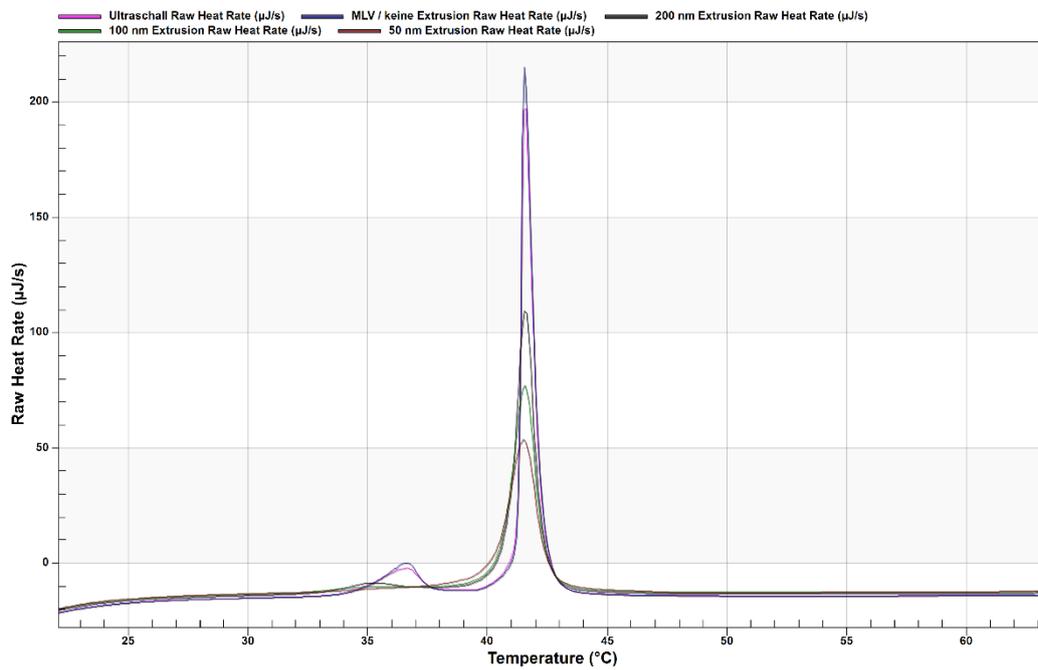


Abb. 60 DSC-Kurven unterschiedlich prozessierter DPPC-Liposomen

Endkonz.: 0,735 mg/mL DPPC, Extrusion: 15x400nm, 15x200nm, 21x100nm, Temperatur: 15-75 °C. Je kleiner die Liposomen extrudiert wurden, desto kleiner ΔH des Phasenübergangs.

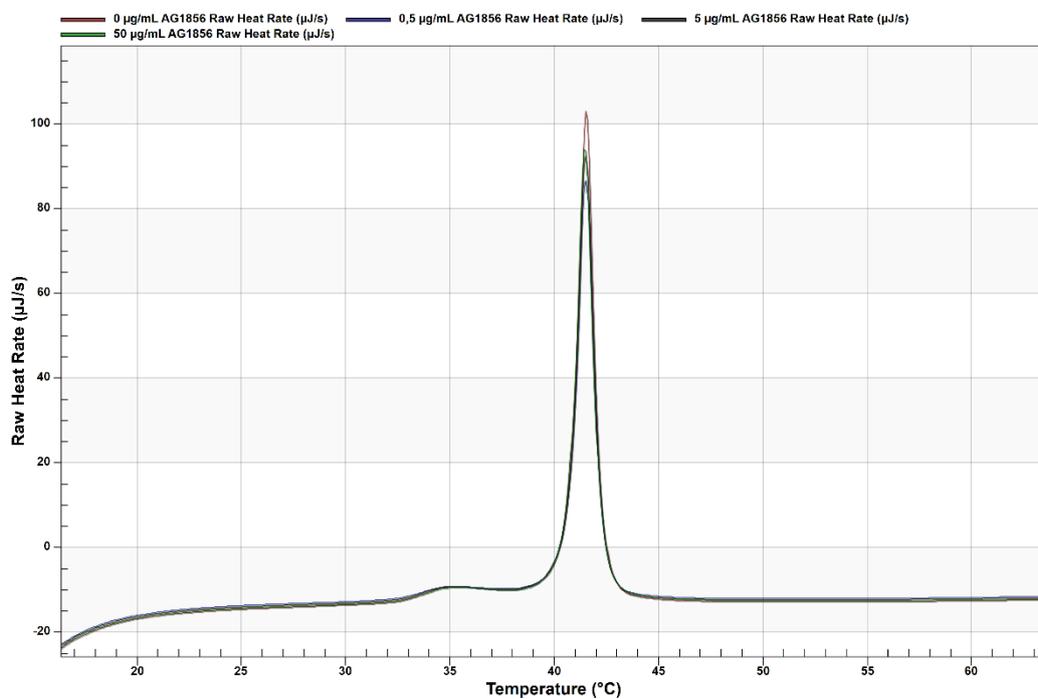


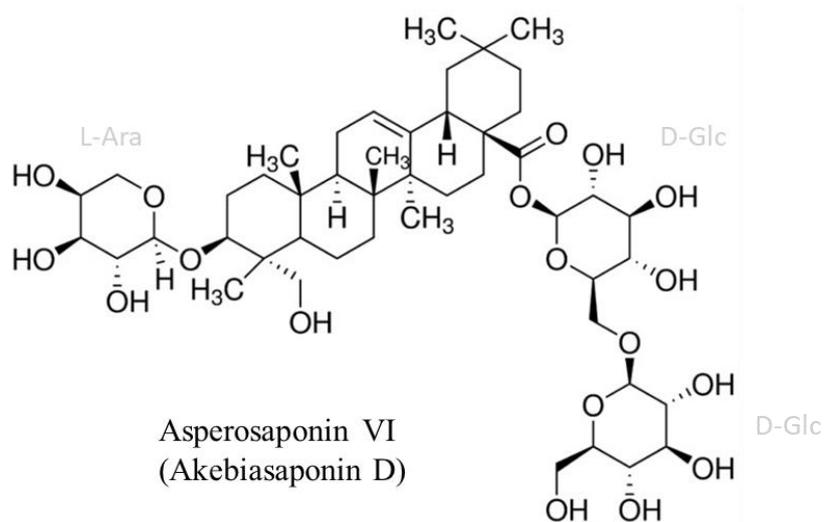
Abb. 61 Einfluss verschiedener AG1856-Konzentrationen auf DPPC-Liposomen (100 nm)

Endkonz.: 0,735 mg/mL DPPC, Extrusion: 15x200nm, 21x100nm, Saponinzugabe nach Extrusion durch 1:1 Verdünnung (V/V). Keine Integration von AG1856 in DPPC-Membran, da keine Verschiebung der T_c .

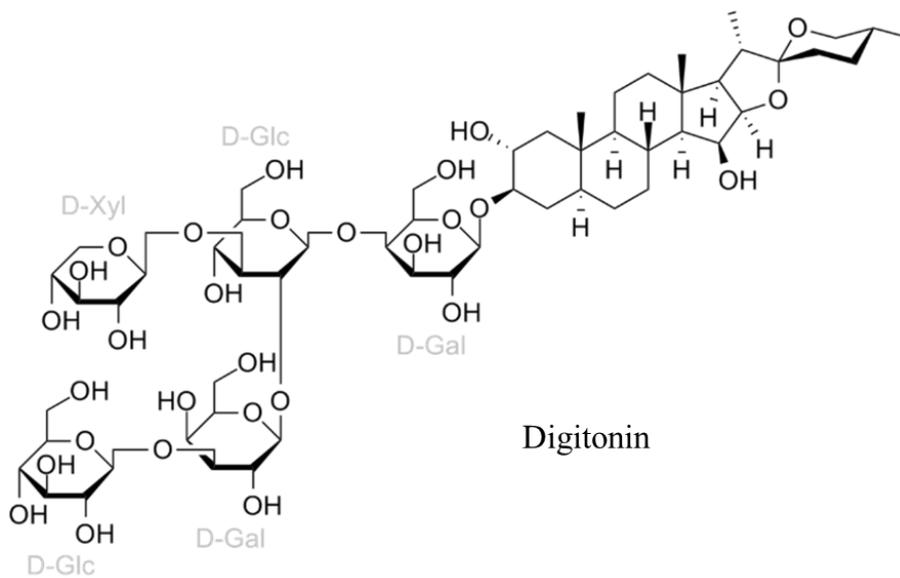
Die Temperatur des Hauptphasenübergangs T_c entspricht mit ca. 41,5 °C dem erwarteten Wert wie er in der Literatur für DPPC zu finden ist. T_p ist am deutlich kleineren ersten Peak abzulesen und beträgt für alle gemessenen DPPC-Liposomen, außer MLV und SUV, ca. 35 °C (Abb. 60). Für die beiden letztgenannten Präparationen lässt sich eine etwas höhere T_p von ca. 36,5 °C bei etwas größerer Enthalpieänderung (ΔH) ablesen. Je kleiner die Liposomen, desto kleiner ist ΔH des Phasenübergangs, mit Ausnahme der SUV, die insgesamt nahezu die gleiche DSC-Kurve ergaben wie die MLV. Dies spricht dafür, dass durch Ultraschall von DPPC-Liposomen keine SUV gebildet wurden oder sie nicht beständig waren.

Das Verdünnen von extrudierten DPPC-Liposomen (100 nm) mit AG1856-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen bis zu einer Endkonzentration von 50 µg/mL zeigte keinen Effekt auf die DSC-Kurve (siehe Abb. 61). Von da an wurden die Liposomen nur noch auf 200 nm Größe extrudiert, da die größeren Enthalpieänderungen durch größere Liposomen als vorteilhaft für die Auswertung erschienen. Liposomen aus einer Mischung von DPPC und Cholesterol im Verhältnis von 95:5 wurden 1:1 (V/V) mit Lösungen verschiedener Saponine (SO1861, Asperosaponin VI sowie Digitonin) auf eine Saponinendkonzentration von 40 µg/mL verdünnt. Eine Probe wurde nur mit Wasser verdünnt, um den Einfluss der 5 % Beimischung von Cholesterol zu beurteilen. Bereits der geringe Cholesterolanteil von 5 % führte zu einem Verschwinden des „pre-transition“-Peaks, zu einem kleineren, breiteren „main transition“-Peak sowie einer leicht erniedrigten T_c (ca. 41 °C). Nachdem das Zumischen der verschiedenen Saponine keinen Effekt auf die DSC-Kurve zur Folge hatte (Abb. 64), wurde eine zusätzliche Probe DPPC/Chol-Liposomen (95:5) mit Digitonin (zu 80 µg/mL) verdünnt und gemessen, da zumindest für Digitonin aufgrund seiner bekannten Eigenschaft, Biomembranen Cholesterol zu entziehen [121, 122], ein Effekt erwartet wurde. Tatsächlich wies die zugehörige DSC-Kurve eine „Ausbuchtung“ des „main transition“-Peaks auf der rechten Seite (größere T_c) auf.

Hederagenin

**Abb. 62 Strukturformel von Asperosaponin VI**

Hederagenin 3-O- α -L-arabinopyranosyl-28- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid; Triterpensaponin vom Oleanan-Typ aus verschiedenen Pflanzenarten, z. B. *Dipsacus asper* WALL.

**Abb. 63 Strukturformel von Digitonin**

(2 α ,3 β ,5 α ,15 β ,25R)-2,15-Dihydroxyspirostan-3-yl O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranosid; giftiges Steroid-Saponin aus dem Fingerhut, z.B. *Digitalis purpurea*.

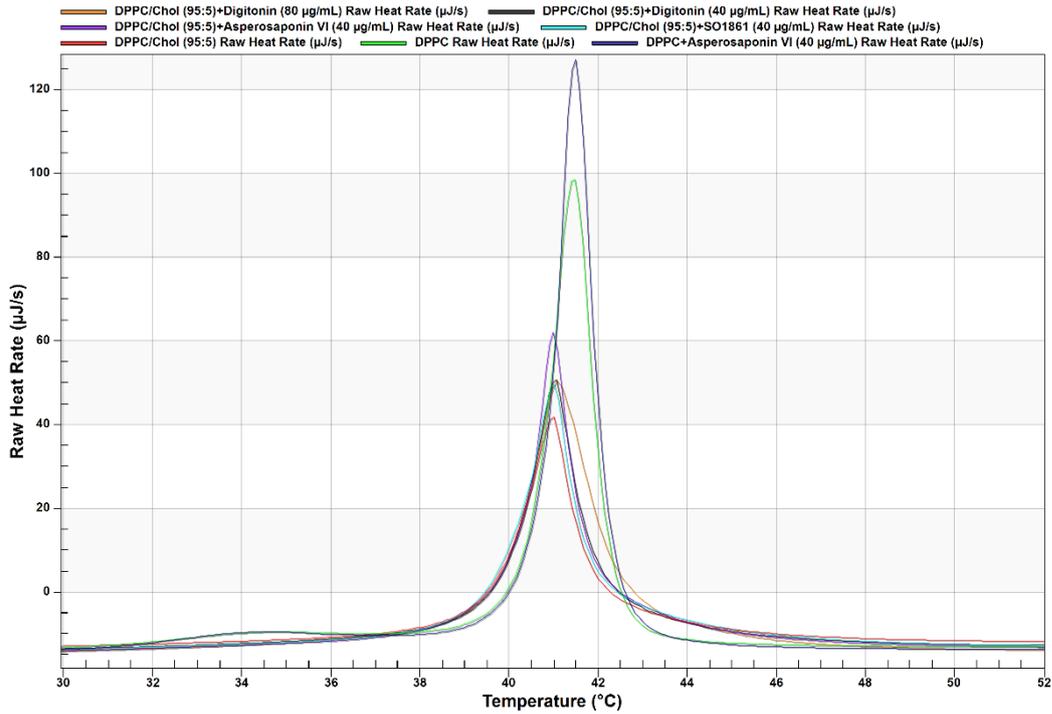


Abb. 64 Einfluss verschiedener Saponine auf DPPC- und DPPC/Chol-Liposomen (95:5)
 Endkonz. 0,95 mg/ mL DPPC (+ 0,05 mg/mL Chol), Extrusion: 21x200nm, Saponinzugabe nach Extrusion durch 1:1 Verdünnung (V/V).

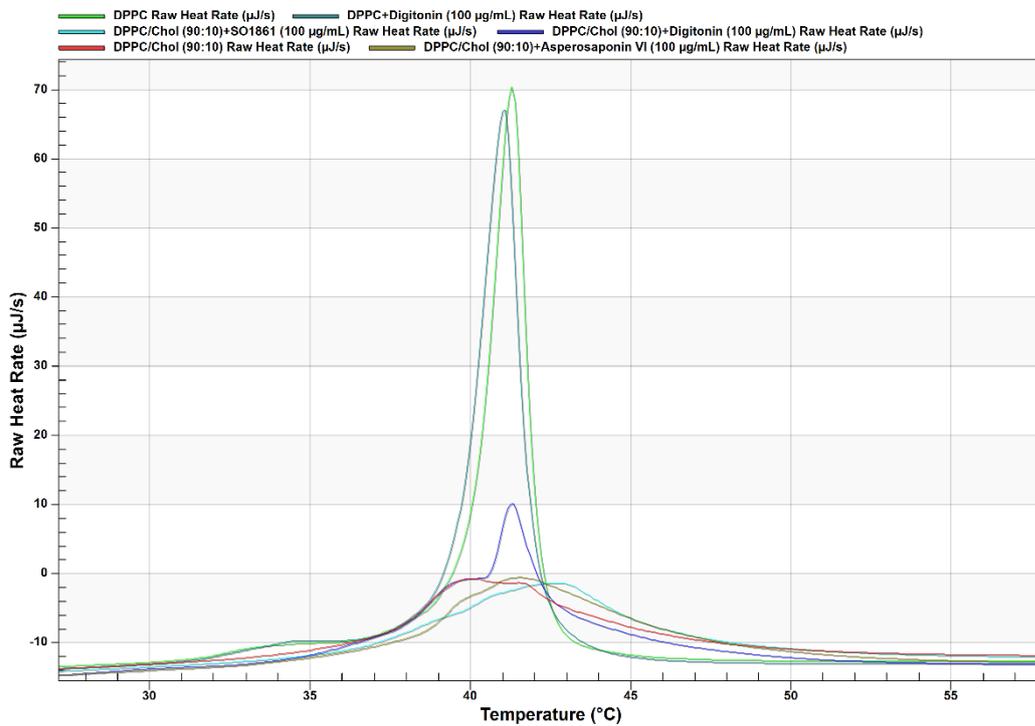


Abb. 65 Einfluss verschiedener Saponine auf DPPC- und DPPC/Chol-Liposomen (90:10)
 Extrusion: 21x200nm, Saponinzugabe nach Extrusion durch 1:1 Verdünnung (V/V), Lipidendkonz. 1 mg/mL (DPPC/Chol 1:1).

Als Reaktion auf dieses Ergebnis wurde das Experiment wiederholt, jedoch mit DPPC/Chol im Verhältnis 90:10 sowie größeren Saponinendkonzentrationen von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Abb. 65). Zum Vergleich wurden zuerst reine DPPC-Liposomen, gefolgt von DPPC-Liposomen, verdünnt mit einer Digitonin-Lösung gemessen. Die leichte Erniedrigung der T_c durch Digitonin legt eine minimale Integration in die DPPC-Membran nahe. Die Zugabe von Digitonin zu den DPPC/Chol-Liposomen führte zu einem kleinen DPPC-Peak. Sehr schwach ausgeprägt ist dieser auch in der DSC-Kurve der zuvor gemessenen DPPC/Chol-Liposomen (ohne Saponin) zu erkennen. Diese Probe wurde nach den DPPC-Liposomen (+Digitonin) gemessen. Trotz Spülung der Probenzelle muss ein Rest Digitonin darin geblieben sein, der noch immer ausreichte, um eine messbare Cholesteroldepletion der Modellmembranen in der folgenden Probe zu bewirken. Auch für die beiden anderen Saponine Asperosaponin VI und SO1861 lässt sich eine Interaktion mit den Cholesterol-haltigen Modell-Liposomen ablesen, in Form einer leichten Rechtsverschiebung des „main transition“-Peaks und zumindest für SO1861 auch einer leichten Erhöhung der T_c .

Nach einigen Monaten wurde dieses Experiment erneut aufgegriffen und mit AG1856 wiederholt (Endkonzentration: 50 und 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), allerdings mit Ultraschall-behandelten Liposomen. Dabei zeigte sich eine im Vergleich zum Einfluss von SO1861 noch stärkere Veränderung der DSC-Kurve von DPPC/Chol-Liposomen im Sinne einer Abflachung und Rechtsverschiebung (siehe Abb. 66). Das Mischen der Liposomen mit AG1856 führte zu einer Trübung.

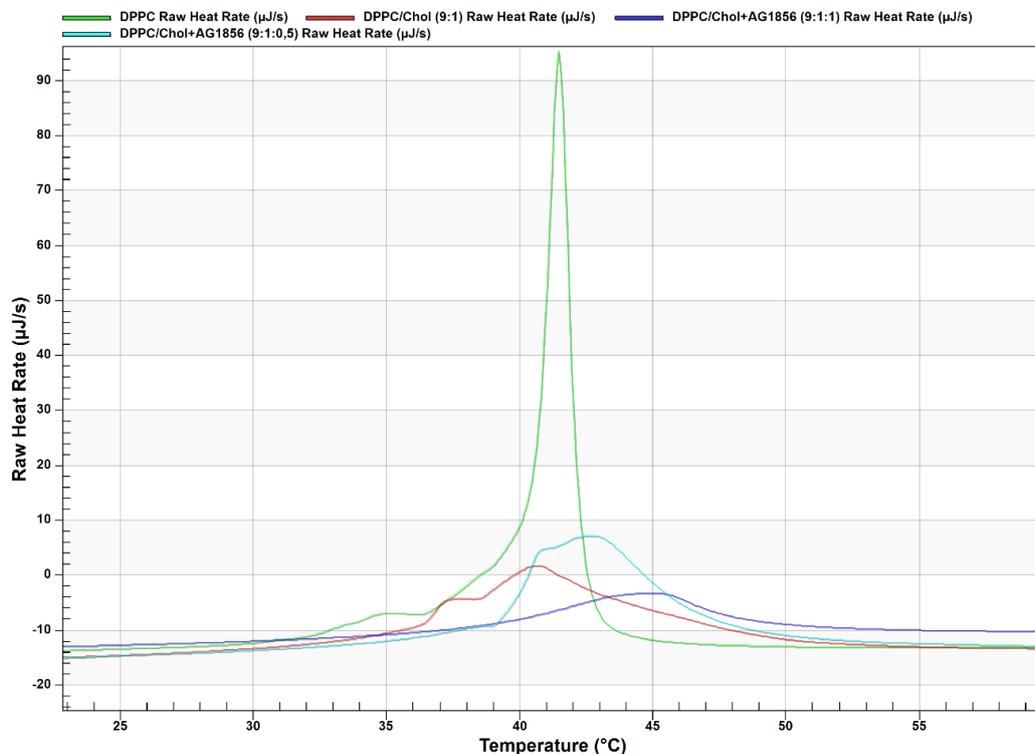


Abb. 66 Einfluss von AG1856 auf DPPC/Chol-Liposomen (90:10)

Liposomen durch Ultraschall, Saponinzugabe durch 1:1 Verdünnung (V/V) führte zur Trübung, Lipidkonz. 1 mg/mL (DPPC/Chol 1:1).

Zusätzlich war bereits an der Kurve von reinen DPPC-Liposomen eine Verunreinigung zu erkennen (bei 37,5 °C), die auch in den Thermogrammen bei diesem Versuch zu erkennen ist. Der Versuch wurde lange Zeit nach den anderen durchgeführt, es könnte sich demnach um ein Oxidations-/Abbauprodukt in Folge der längeren Lagerung handeln.

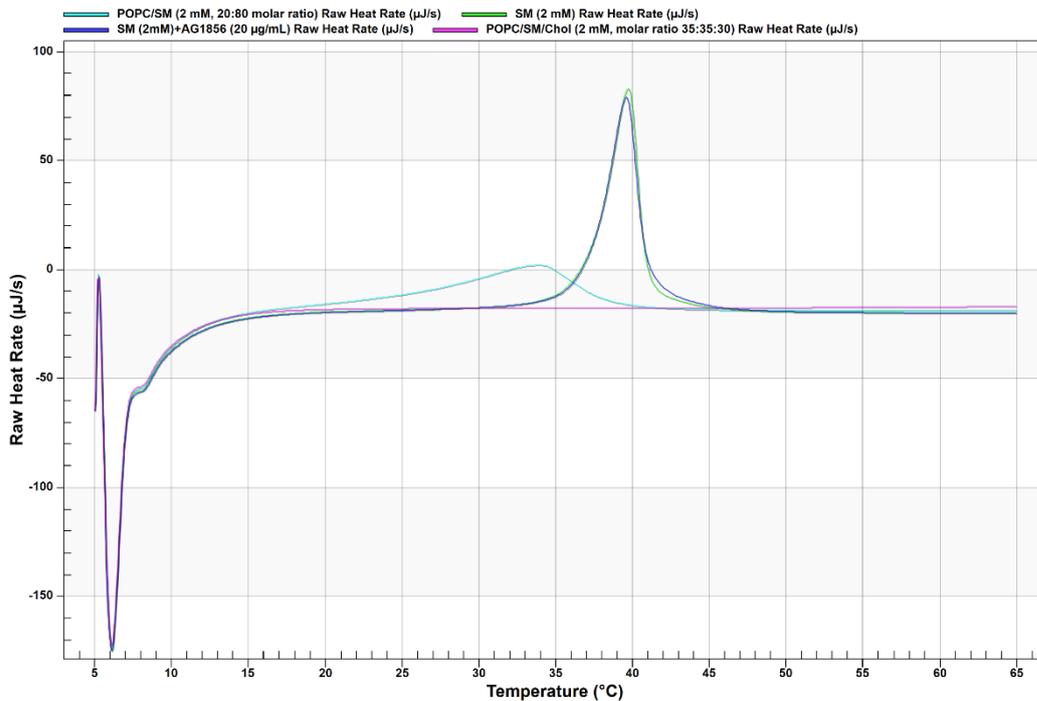


Abb. 67 Liposomen aus den Komponenten SM, POPC und Chol
Lipidkonzentration: 2 mM, Liposomen durch Ultraschall, Saponinzugabe durch 1:1 Verdünnung (V/V).

Mit einer POPC/SM/Chol-Mischung sollte die Lipidzusammensetzung von „Lipid-Rafts“ imitiert und auf eine Interaktion mit AG1856 untersucht werden (Abb. 67). SM allein zeigte in 20 µg/mL AG1856 höchstens eine minimale Verringerung der T_c. Ein größerer Anteil von POPC (T_c = -2 °C) in der Lipidmischung führt aufgrund der niedrigen Phasenübergangstemperatur zu einer Linksverschiebung und deutlichen Abflachung des Peaks. Da ein größerer Cholesterolanteil ebenfalls zu einer deutlichen Abflachung des Peaks führt, ist für die Mischung POPC/SM/Chol im molaren Verhältnis 35:35:30 bei einer Gesamtlipidkonzentration von 2 mM kein Peak detektierbar. Daher konnte auch der Einfluss von AG1856 auf diese Mischung nicht untersucht werden.

Auf eine SOPC/SM-Mischung (1,4 mM) im molaren Verhältnis von 50:50 hatte eine AG1856-Konzentration von 50 µg/mL keinen Effekt im Sinne eine Beeinflussung der T_c, die sich bei dieser Präparation auf zwei ineinanderfließende Peaks aufteilt, was wiederum auf eine ungleichmäßige Verteilung beider Lipide in den Membranen zurückzuführen sein könnte (Abb. 68).

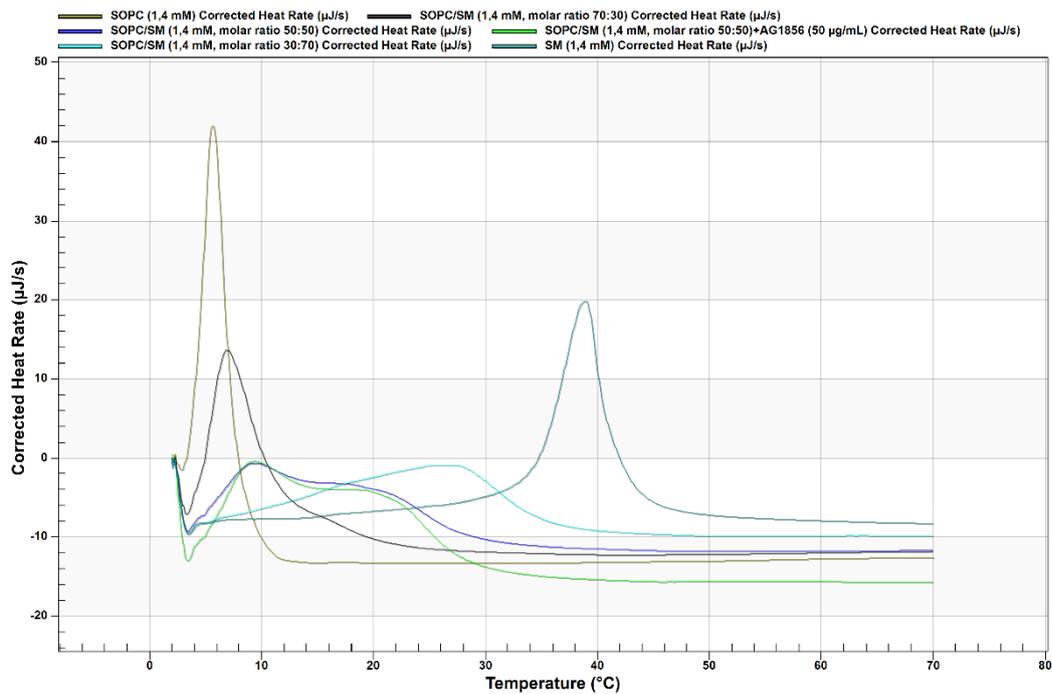


Abb. 68 Einfluss von AG1856 auf SOPC/SM-Liposomen

Lipidkonzentration: 1,4 mM, Liposomen durch Ultraschall, Saponinzugabe durch 1:1 Verdünnung (V/V).

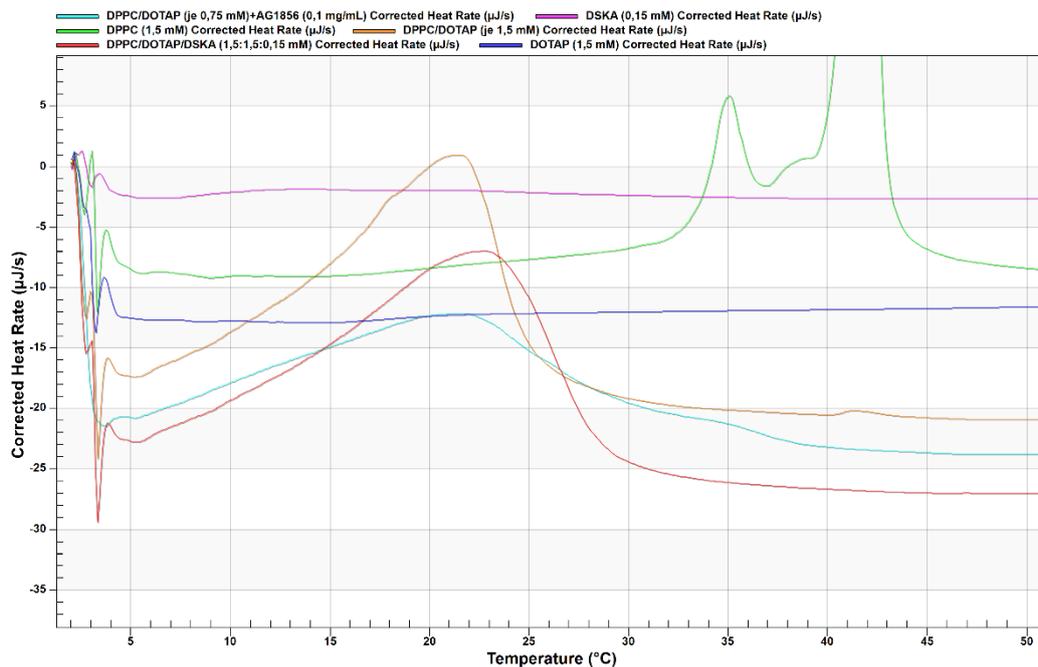


Abb. 69 DOTAP/DPPC-Liposomen mit AG1856 oder DSKA

Lipidkonzentration: 3 mM bzw. 1,5 mM, Liposomen durch Ultraschall, Saponinzugabe durch 1:1 Verdünnung (V/V). Temperaturprogramm von 2 - 92 °C.

Die Zugabe von DSKA zu DPPC/DOTAP (1:1)-Liposomen im molaren Verhältnis 1 zu 20 führte zu einer leichten Erhöhung der T_c (Abb. 69), ein Hinweis für die Integration des Konjugats. Im Gegensatz bewirkte AG1856 (100 µg/mL) keine Verschiebung der T_c .

3.6 Synthese und Isolierung der Lipid-KMUH-AG1856 Konjugate

3.6.1 Festphasenextraktion zur Isolierung der Lipid-Linker Konjugate

3.6.1.1 DC mit SPE-Fractionen der Synthese von DSPE-S-KMUH (DSK)

Bereits vor der Isolierung der Konjugate mittels SPE, wurden die korrespondierenden Banden zu DSPE-SH, KMUH und DSK unter Verwendung verschiedener Detektionsmethoden identifiziert (Abb. 70). Molybdato-phosphorsäure, auch Phosphormolybdänsäure genannt (PMS), ermöglichte dabei die sichere Identifizierung des Lipids.

Stat. Phase: HPTLC Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)
 Fließmittel: Chloroform/Methanol (60:40)
 Auftragung: Linomat IV (CAMAG)
 Entwicklung: 10x10 cm horizontale Entwicklungskammer (CAMAG)

Detektion:

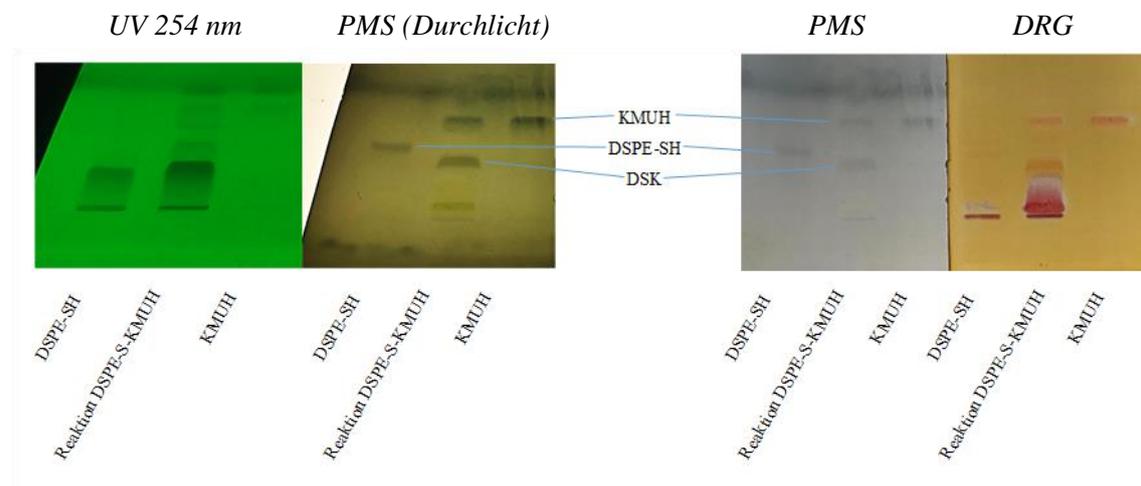


Abb. 70 Identifizierung von KMUH, DSPE-SH und Konjugat (DSK) im Reaktionsansatz
 DSPE-SH (2 mM): 10 µL, Reaktionsansatz: Vial mit 20 µL CHCl₃ gespült, KMUH (5 mM): 5 µL.

Stat. Phase:	HPTLC Kieselgel 60 F ₂₅₄ (Merck)	
Fließmittel:	Chloroform/Methanol (60:40)	
Auftragung:	Linomat IV (CAMAG)	
Entwicklung:	10x10 cm horizontale Entwicklungskammer (CAMAG)	
Detektion:	UV-Licht 254 nm	Weinsaures Dragendorff-Reagens (DRG)

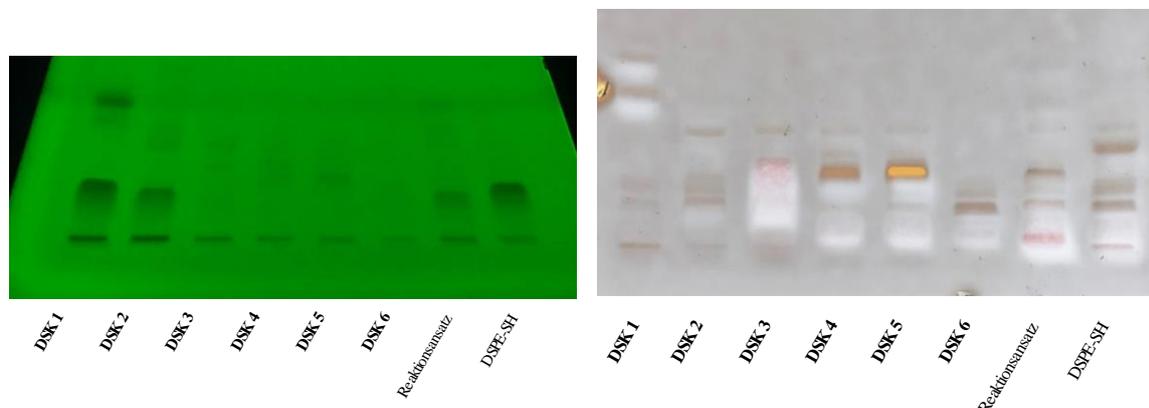


Abb. 71 DC der DSK-Fractionen nach SPE-Fraktionierung

DSK 1 bis DSK 6: 7 μ L, Reaktionsansatz: Vial mit 20 μ L CHCl₃ gespült, DSPE-SH (2 mM): 12 μ L.

Anhand der Detektion der DC mit Dragendorff-Reagens konnte die Bildung und Reinheit des isolierten Konjugats DSPE-S-KMUH (DSK) gut beurteilt werden (Abb. 71). Die Fraktionen wurden vom Lösungsmittel befreit und lyophilisiert, um ihre korrekte Masse zu bestimmen (Tab. 36). Die Fraktionen DSK 4 und DSK 5 enthielten nahezu reines DSK. Die Summe ihrer Massen wurde zur Berechnung der Ausbeute genutzt (Tab. 37). Die Ausbeute betrug 3,08 mg (45,4 %). Insgesamt wurden 7,98 mg (98,8 %) der eingesetzten Edukte wieder eluiert. Die Ursache für diesen Widerspruch ist in der mangelnden Reinheit des Lipids zu suchen. Das Triethylamin diente in der Synthesereaktion als Katalysator (Deprotonierung der Thiolgruppe) und wurde vor der SPE-Fraktionierung zusammen mit dem Lösungsmittel in der SpeedVac entfernt. Auffällig war bei der DC die deutliche Verunreinigung des verwendeten Lipids DSPE-SH; nur die stärkere obere Bande, welche im Reaktionsansatz nicht mehr zu sehen ist, entspricht diesem.

Tab. 36 Bestimmung der Massen der einzelnen DSK-Fractionen

Fraktion	Tara Vial [g]	Tara+Fraktion [g]	Masse Fraktion [mg]
DSK 1	2,34223	2,34393	1,70
DSK 2	2,36821	2,36956	1,35
DSK 3	2,39337	2,39452	1,15
DSK 4	2,39302	2,39443	1,41
DSK 5	2,36829	2,36996	1,67
DSK 6	2,33706	2,33776	0,70
		Gesamt:	7,98

Tab. 37 Berechnung der Ausbeute an DSK

DSPE-SH (835,58 g/mol) KMUH·TFA (409,4 g/mol)	6 µmol	5,0135 mg
	7,5 µmol	3,0705 mg
	Gesamt (theoret.):	8,08 mg
	Gesamt (tatsächl.):	7,98 mg (98,8 %)
Max. mögliche Ausbeute an DSK (1130,77 g/mol)	6 µmol	6,78 mg
Tatsächliche Ausbeute an DSK (DSK 4 + DSK 5)		3,08 mg (45,4 %)

3.6.1.2 DC mit SPE-Fractionen der Synthese von DSPE-PEG-S-KMUH (DPSK)

Die Synthese und Isolierung der pegylierten Variante DPSK erfolgte analog zur DSK-Gewinnung, allerdings wurde der Chloroform-Methanol-Gradient optimiert, um ein möglichst sauberes Produkt zu erhalten. Dieses eluierte in Fraktion 4 (Abb. 72).

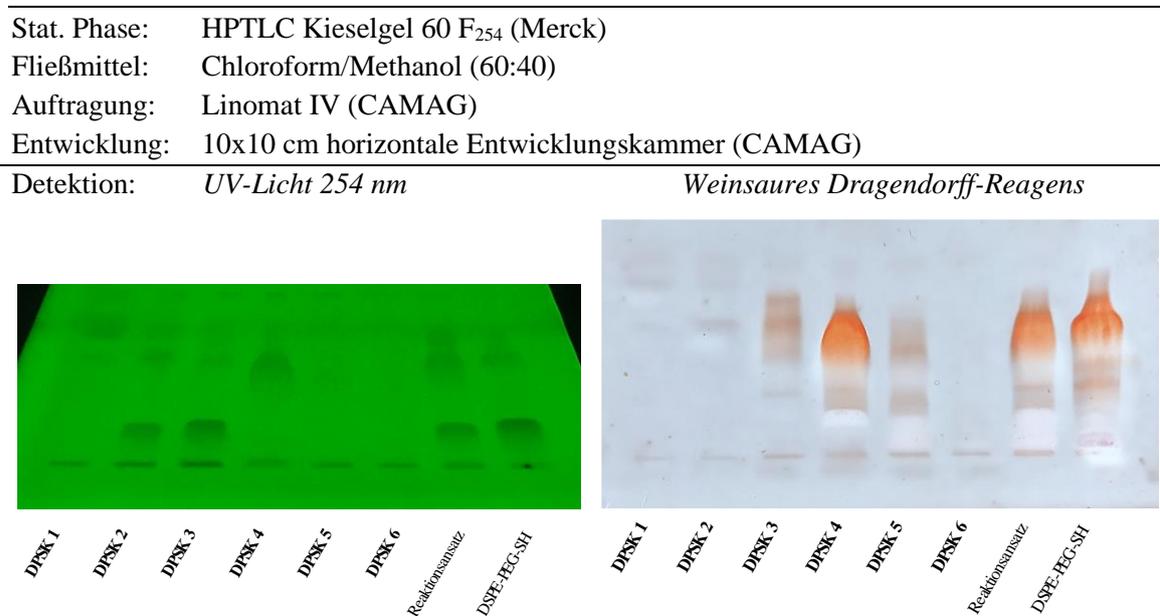


Abb. 72 DC der DPSK-Fractionen nach SPE-Fraktionierung

DPSK 1 bis DPSK 6: 10 µL, Rkt.ansatz (Vial mit 20 µL CHCl₃ gespült), DSPE-PEG-SH (2 mM): 15 µL.

Tab. 38 Bestimmung der Massen der einzelnen DPSK-Fractionen

Fraktion	Tara Vial [g]	Tara + Fraktion [g]	Masse Fraktion [mg]
DPSK 1	2,34025	2,34053	0,28
DPSK 2	2,37309	2,37340	0,31
DPSK 3	2,36127	2,36224	0,97
DPSK 4	2,36016	2,36404	3,88
DPSK 5	2,36468	2,36553	0,85
DPSK 6	2,38621	2,38645	0,24
		Gesamt:	6,53

Tab. 39 Berechnung der Ausbeute an DPSK

DSPE-PEG-SH (2890 g/mol)	2 μ mol	5,78 mg
KMUH·TFA (409,4 g/mol)	2,5 μ mol	1,02 mg
	Gesamt (theoret.):	6,8 mg
	Gesamt (tatsächl.):	6,53 mg (96,0 %)
Max. mögliche Ausbeute an DPSK (3185 g/mol)	2 μ mol	6,37 mg
Tatsächliche Ausbeute an DPSK (DPSK 4)		3,88 mg (60,9 %)

Bei der SPE-Fraktionierung des DPSK-Ansatzes wurde mit der 4. Fraktion das nahezu reine Produkt erhalten, was dennoch lediglich einer Ausbeute von 60,9 % entsprach (siehe Tab. 39). Insgesamt wurden 96,0 % der eingesetzten Edukte eluiert. Wiederum ist die Ursache für diese Diskrepanz in der mangelnden Reinheit der Lipid-Komponente zu suchen.

3.6.2 Synthese der Lipid-Linker-AG1856 Konjugate (DSKA bzw. DPSKA)

Bevor die finale Konjugation mit dem Saponin durchgeführt wurde, musste ein geeignetes DC-System für die Analytik entwickelt werden. Ausgehend vom Fließmittel Chloroform/Methanol (60:40) wurden Varianten mit Wasser als zusätzlicher Komponente getestet, unter Verwendung einer unvollständigen Konjugationsreaktion von DSK mit AG1856 zu DSKA.

Stat. Phase: HPTLC Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)
 Auftragung: Linomat IV (CAMAG)
 Entwicklung: 10x10 cm horizontale Entwicklungskammer (CAMAG)
 Detektion: Vanillin-Schwefelsäure-Reagens (VSR)
 Fließmittel: Chloroform/Methanol/Wasser

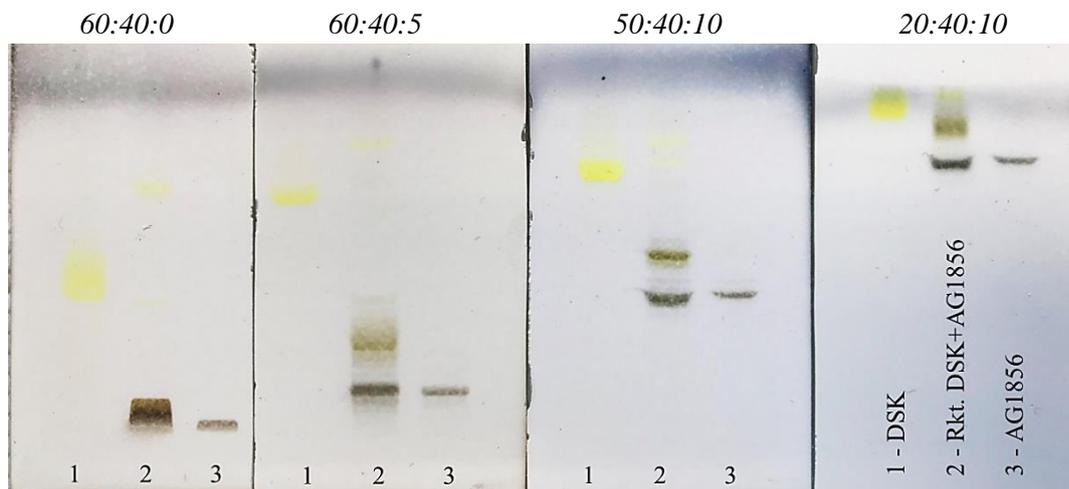


Abb. 73 Optimierung des DC-Fließmittels für die Analytik der Saponin-Konjugation

Das Fließmittel Chloroform/Methanol/Wasser (50:40:10) führte zum besten Ergebnis hinsichtlich Bandenschärfe und Trennleistung und wurde fortan für die Saponin-haltigen Konjugate verwendet (siehe Abb. 73). Bei der finalen Reaktion des AG1856 mit den Lipid-Linker Konjugaten, die initial im molaren Verhältnis 1:1,5 angesetzt wurde (siehe Abb. 74), zeigte sich, dass unter den gegebenen Reaktionsbedingungen ein noch größerer Überschuss der Lipid-Linker-Konjugate nötig war. Nach wiederholter Zugabe dieser (Tag 6 und 7 bei DSK sowie Tag 6,7 und 9 bei DPSK) war das eingesetzte AG1856 an Tag 9 nahezu vollständig durch DSK zu DSKA umgesetzt worden, während auch an Tag 10 trotz deutlichem DPSK-Überschuss immer noch AG1856 vorhanden war.

Zur Detektion der Konjugation der Lipid-Linker-Konjugate mit AG1856 eignete sich Vanillin-Schwefelsäure-Reagens. Dabei färbten sich die Lipid-Linker-Konjugate gelb, das AG1856 blau und die Lipid-Linker-Saponin Konjugate grün. Zusätzlich wurde die besprühte Platte unter UV-Licht (366 nm) betrachtet, wobei sich eine auffällige gelb-grüne Fluoreszenz der Banden zeigte, in denen Linker enthalten war.

3.6.3 Festphasenextraktion zur Isolierung der Lipid-Linker-Saponin Konjugate

3.6.3.1 DC mit SPE-Fractionen der Synthese von DSPE-S-KMUH-AG1856 (DSKA)

Stat. Phase: HPTLC Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)
 Fließmittel: Chloroform/Methanol/Wasser (50:40:10)
 Auftragung: Linomat IV (CAMAG)
 Entwicklung: 10x10 cm horizontale Entwicklungskammer (CAMAG)

Detektion:

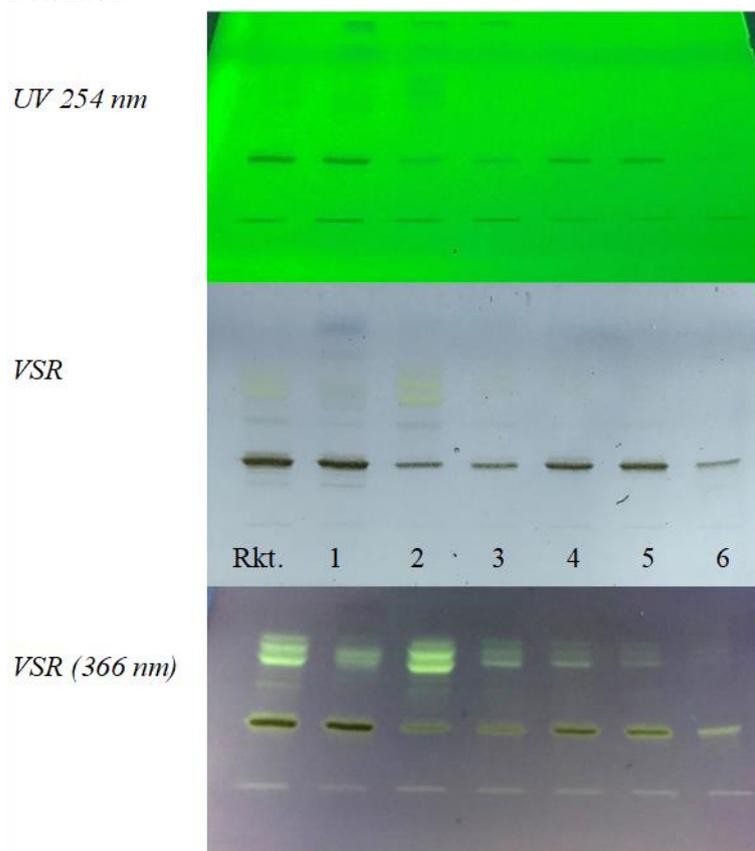


Abb. 75 DC der DSKA-Fractionen nach SPE-Fraktionierung

Rkt. (Reaktionsansatz): Vial mit 20 µL CHCl₃ gespült, 1 bis 6 (DSKA 1 bis 6): 15 µL aufgetragen.

Tab. 40 Bestimmung der Massen der einzelnen DSKA-Fractionen

Fraktion	Tara Vial [g]	Tara+Fraktion [g]	Masse Fraktion [mg]
DSKA 1	2,34668	2,34745	0,77
DSKA 2	2,35339	2,35378	0,39
DSKA 3	2,37822	2,37850	0,28
DSKA 4	2,37288	2,37344	0,56
DSKA 5	2,36669	2,36734	0,65
DSKA 6	2,35351	2,35369	0,18
		Gesamt:	2,83

Tab. 41 Berechnung der Ausbeute an DSKA

DSPE-S-KMUH (1130,2 g/mol) AG1856 (1856 g/mol)	1 μ mol	1,1302 mg
	0,5 μ mol	0,928 mg
	Gesamt (theoret.):	2,0582 mg
	Gesamt (tatsächl.):	2,83 mg (137,5 %)
Max. mögl. Ausbeute an DSKA (2968,2 g/mol)	0,5 μ mol	1,4841 mg
Tatsächl. Ausbeute an DSKA (DSKA 4 + DSKA 5)		1,21 mg (81,5 %)

Das finale Konjugat DSKA wurde prinzipiell mit jeder Fraktion eluiert, die größte Menge und Reinheit eluierte jedoch mit den Fraktionen 4 und 5, die somit auch der Berechnung der Ausbeute dienen. Diese beträgt 81,5 %, während rechnerisch insgesamt 137,5 % der Edukte in den Fraktionen wiedergefunden werden konnten. Letzteres hat seinen Grund evtl. in einer zu hohen Konzentration des eingesetzten DSPE-S-KMUH und AG1856 (Wägefehler bei sehr kleinen Massen, Hygroskopizität des Saponins).

Die Fraktionen wurden mittels SpeedVac vom Lösungsmittel befreit und gefriergetrocknet. Fraktion 4 und 5 wurden zu 1 mg/mL in Chloroform/Methanol (9:1) gelöst und für weitere Experimente verwendet.

3.6.3.2 DC mit SPE-Fractionen der Synthese von DSPE-PEG-S-KMUH-AG1856 (DPSKA)

Stat. Phase: HPTLC Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)
 Fließmittel: Chloroform/Methanol/Wasser (50:40:10)
 Auftragung: Linomat IV (CAMAG)
 Entwicklung: 10x10 cm horizontale Entwicklungskammer (CAMAG)

Detektion:

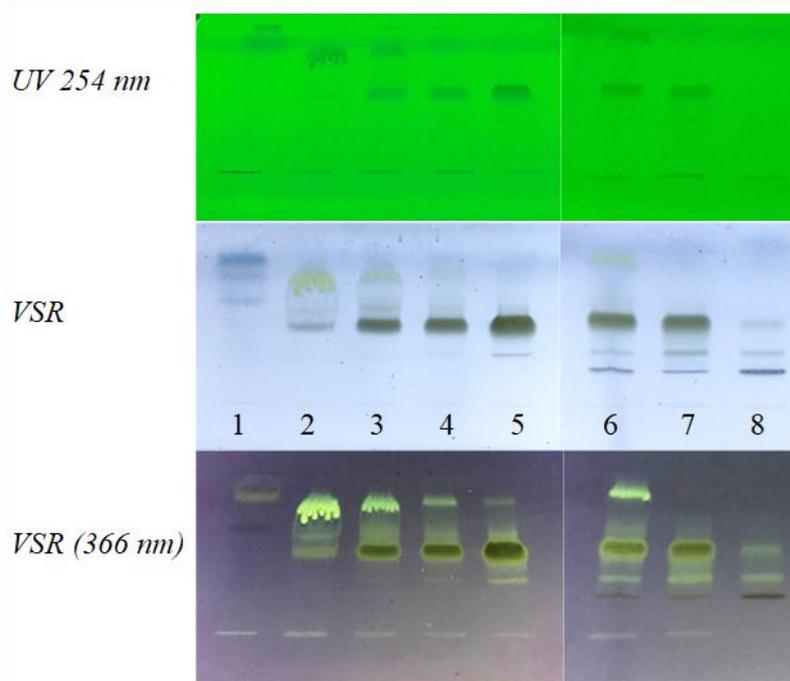


Abb. 76 DC der DPSKA-Fractionen nach SPE-Fraktionierung
 Banden 1 bis 8 (DPSKA 1 bis 8): 15 μ L aufgetragen.

Tab. 42 Bestimmung der Massen der einzelnen DPSKA-Fractionen

Fraktion	Tara Vial [g]	Tara+Fraktion [g]	Masse Fraktion [mg]
DPSKA 1	2,38305	2,38329	0,24
DPSKA 2	2,36666	2,36766	1,00
DPSKA 3	2,41549	2,41586	0,37
DPSKA 4	2,37597	2,37605	0,08
DPSKA 5	2,38269	2,38335	0,66
DPSKA 6	2,40000	2,40030	0,30
DPSKA 7	2,37743	2,37758	0,15
DPSKA 8	2,37893	2,37909	0,16
		Gesamt:	2,96

Die Fraktionen wurden mittels SpeedVac vom Lösungsmittel befreit und gefriergetrocknet. Fraktion 5 wurden zu 1 mg/mL in Chloroform/Methanol (9:1) gelöst und für weitere Experimente verwendet.

Tab. 43 Berechnung der Ausbeute an DPSKA

DSPE-PEG-S-KMUH (3185 g/mol) AG1856 (1856 g/mol)	1,5 µmol	4,7775 mg
	0,5 µmol	0,928 mg
	Gesamt (theoret.):	5,7055 mg
	Gesamt (tatsächl.):	2,96 mg (51,9 %)
Max. mögl. Ausbeute an DPSKA (5033 g/mol)	0,5 µmol	2,5165 mg
Tatsächl. Ausbeute an DPSKA (DPSKA 5)		0,66 mg (26,2 %)

3.6.4 Analyse der isolierten Konjugate mittels Massenspektrometrie

3.6.4.1 LC-ESI-MS mit DSKA

Die Messungen von DSPE-SH (2 mM in EtOH) und DSKA (1 mM in EtOH) mittels LC-ESI-MS (LC-MS-Methode 2) lieferten weder im Negativ- noch im Positivmodus Ergebnisse im Sinne der erwarteten Massen. Nur bei AG1856 (0,5 mM in EtOH) zeigte sich die erwartete Masse im Negativmodus. Sehr schwach war AG1856 zudem in der DSKA-Probe zu finden, während die Masse des Konjugats selbst (2968 g/mol) nicht nachweisbar war.

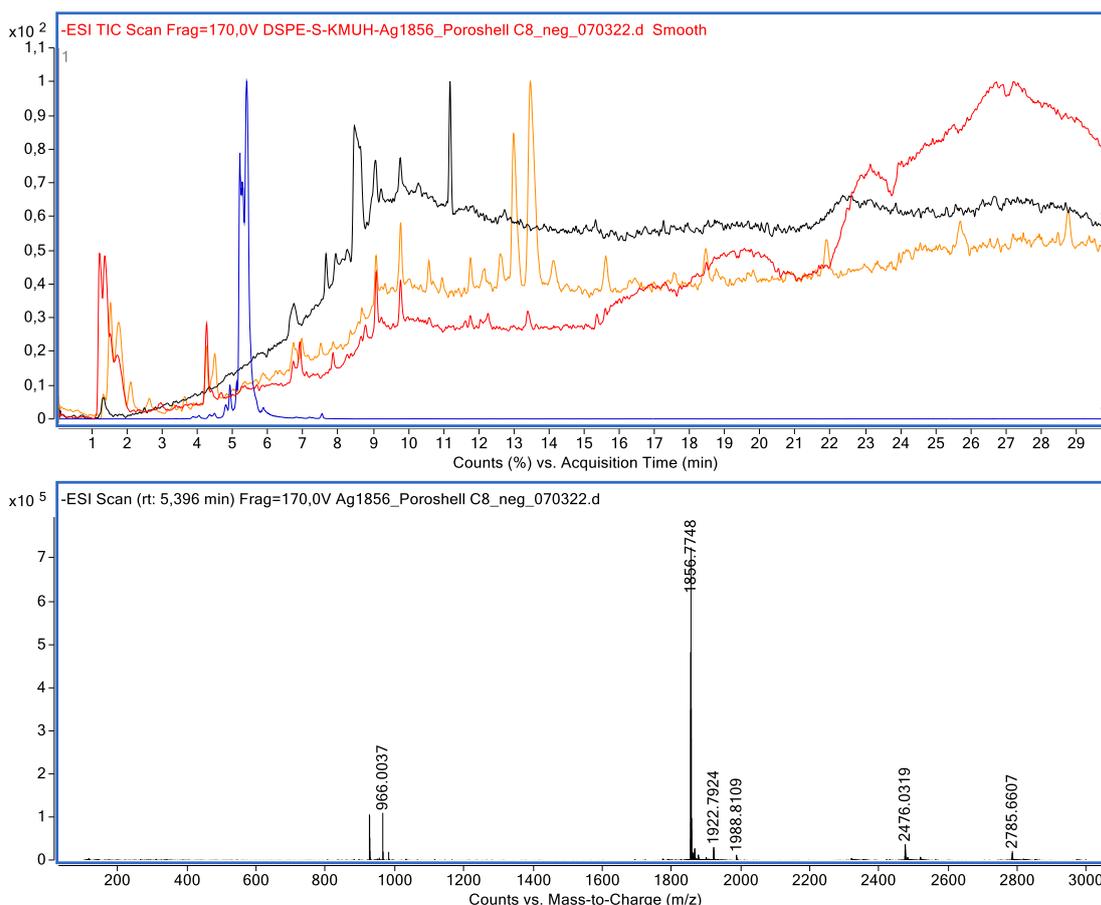


Abb. 77 Erfolgreicher LC-ESI-MS-Nachweis von DSKA (LC-MS-Methode 2, Negativmodus)

Oben: Überlagerung der Chromatogramme von DSPE-SH (gelb), AG1856 (blau), DSKA (rot) und Blank (schwarz), unten: Massenspektrum von AG1856 bei 5,396 min.

3.6.4.2 Q-TOF-MS Direktinjektion

Da die LC-MS-Messung ergebnislos verlief, wurde versucht die Masse der Konjugate per Direktinjektion, also ohne Verwendung einer HPLC-Säule am Q-TOF zu bestimmen. Zur Überprüfung des Verfahrens wurde eine Sildenafil-Probe eingespritzt. Dabei konnte die korrekte Masse (474,58 g/mol) bestimmt werden (siehe Abb. 78). Für DSKA und DPSKA (je 2 Proben zu 3 μ M bzw. 45 μ M in EtOH) konnten jedoch die entsprechenden Massen (m/z) nicht detektiert werden (siehe Abb. A4).

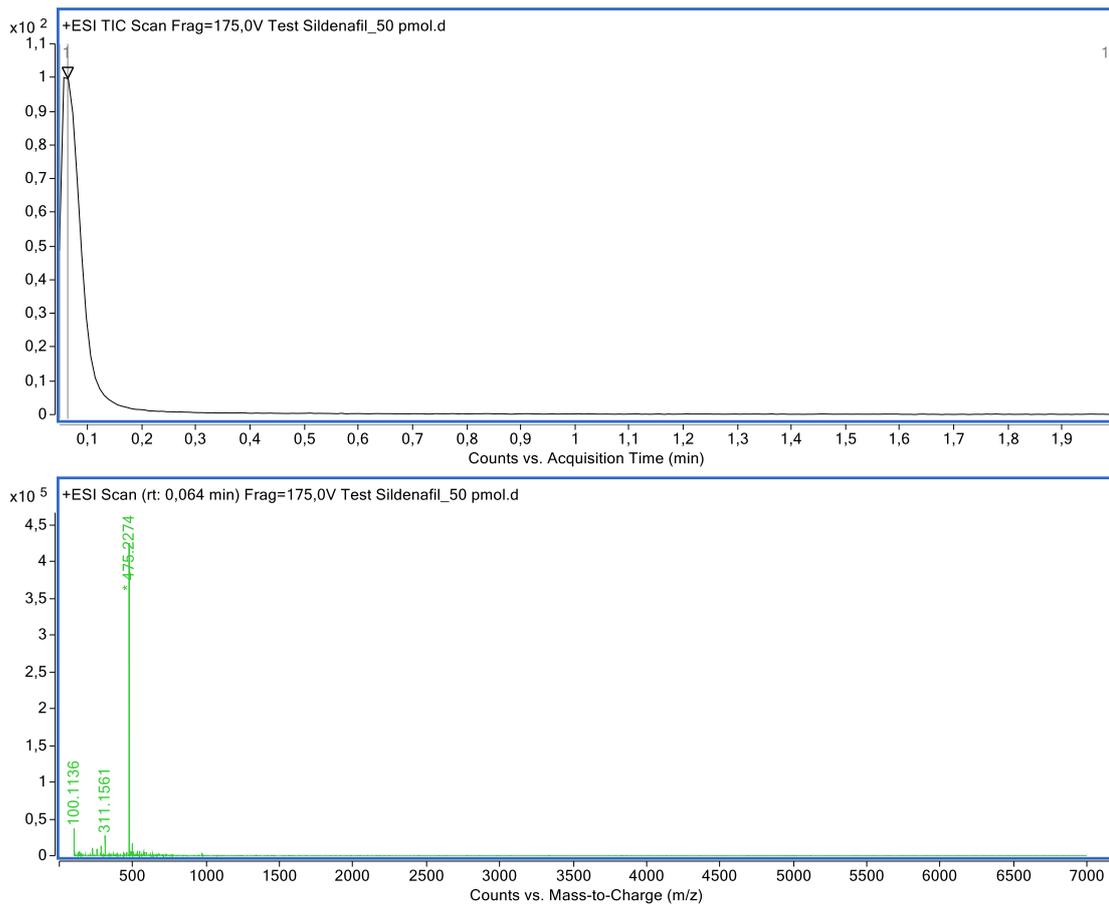


Abb. 78 Q-TOF-ESI-MS Direktinjektion am Beispiel der Testsubstanz Sildenafil
 Oben: Gesamtionenstrom (TIC), unten: Massenspektrum von Sildenafil bei 0,064 min (Positivmodus).

3.6.4.3 MALDI-MS mit DSKA und DPSKA

Bei einer ersten MALDI-TOF-MS Messung (MALDI-MS-Methode 1) sollte der Einfluss verschiedener Matrixsubstanzen untersucht werden. Auf Grundlage von Literaturangaben [123] wurden HCCA (α -Cyano-4-hydroxymizsäure), SA (Sinapinsäure: trans-3,5-Dimethoxy-4-hydroxymizsäure) und 2,5-DHB (Gentisinsäure: 2,5-Dihydroxybenzoesäure) als Matrices ausgewählt. Untersucht wurden folgende Proben (gelöst in EtOH abs.):

- AG1856 (0,5 mM)
- DSPE-SH (2 mM)
- DSPE-PEG-SH (2 mM)
- DSPE-S-KMUH-AG1856 (unbekannte Konz.)

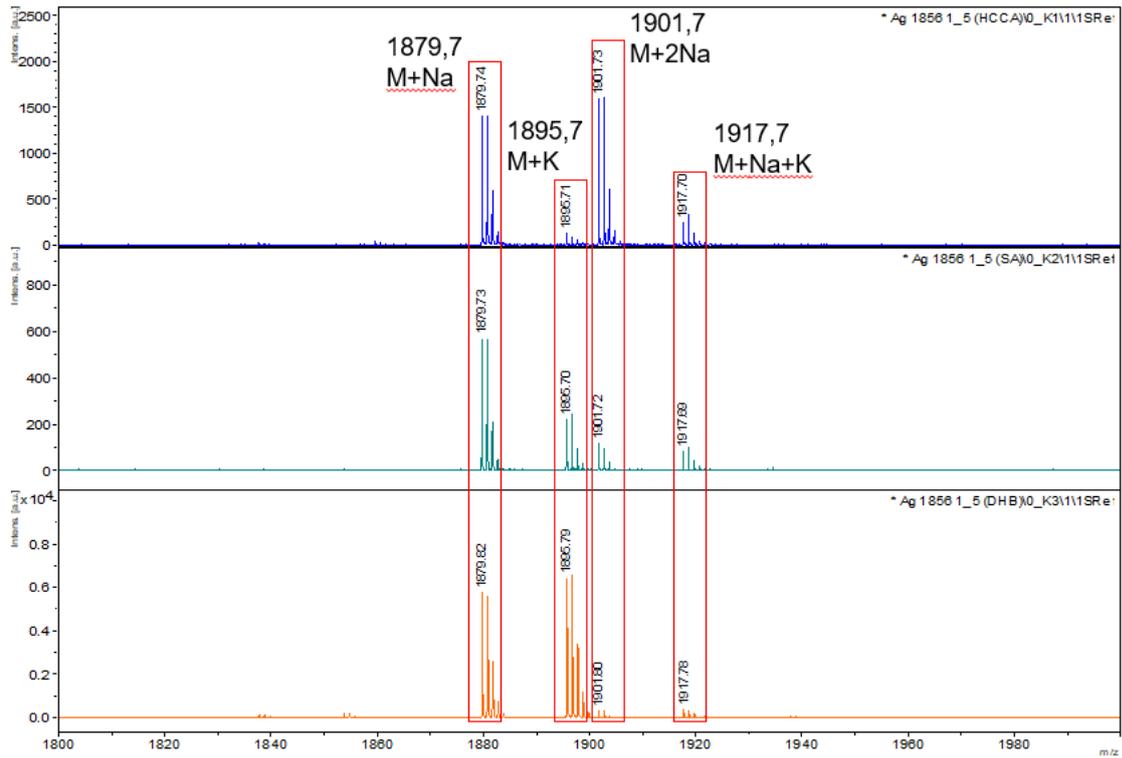


Abb. 79 MALDI-TOF-MS Spektren von AG 1856 auf verschiedenen Matrices (MALDI-MS-Methode 1) (1:5 in TA₃₃) auf HCCA (oben), SA (Mitte) und 2,5-DHB (unten); Gemessen als Alkali-Addukte. *Messung und graphische Darstellung durch Chris Weise.

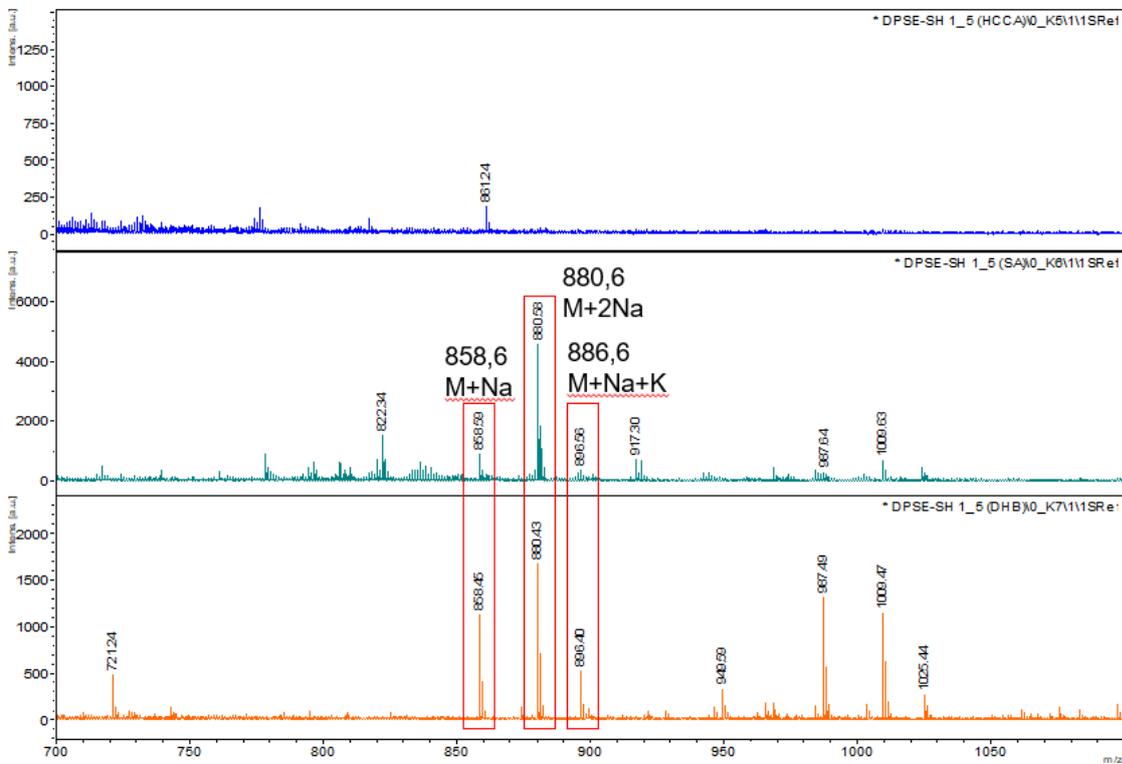


Abb. 80 MALDI-TOF-MS Spektren von DPSE-SH auf verschiedenen Matrices (MALDI-MS-Methode 1) (1:5 in TA₃₃) auf HCCA (oben), SA (Mitte) und 2,5-DHB (unten); Auf SA und 2,5-DHB als Alkali-Addukte gemessen. *Messung und graphische Darstellung durch Chris Weise.

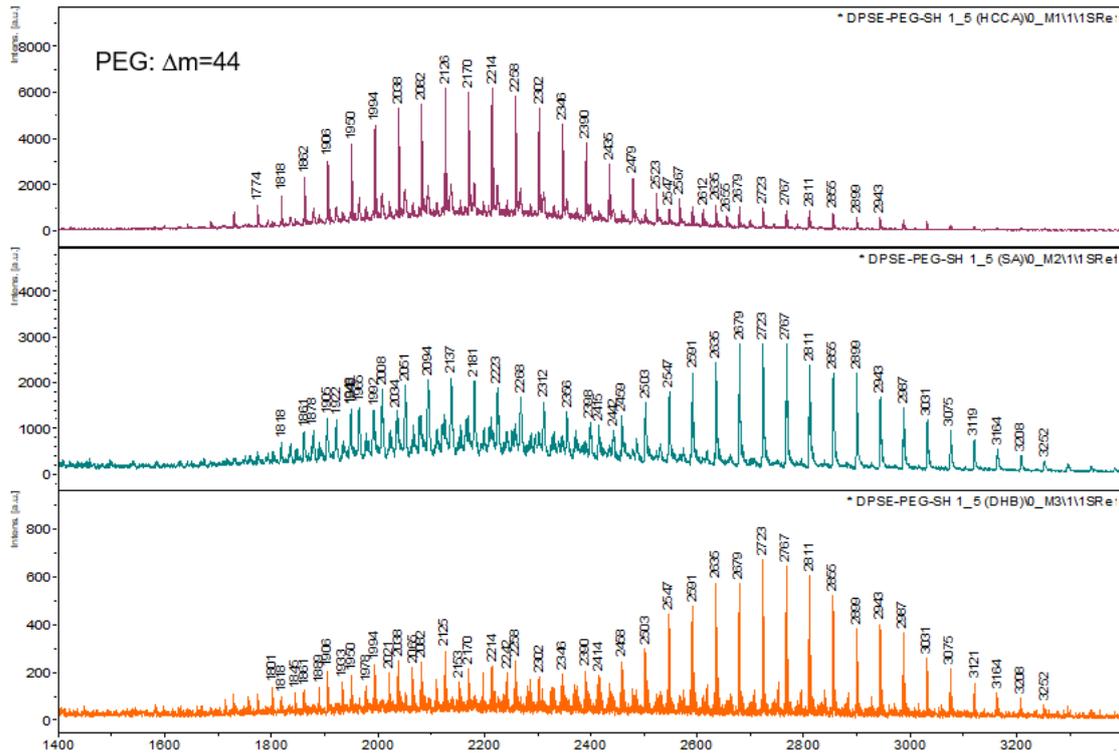


Abb. 81 MALDI-TOF-MS Spektren von DPSE-PEG-SH auf verschiedenen Matrices (MALDI-MS-Methode 1) (1:5 in TA₃₃) auf HCCA (oben), SA (Mitte) und 2,5-DHB (unten); bimodale Verteilung, mit HCCA vorderer Teil stärker, auf SA und DHB hinterer Teil). *Messung und graphische Darstellung durch Chris Weise.

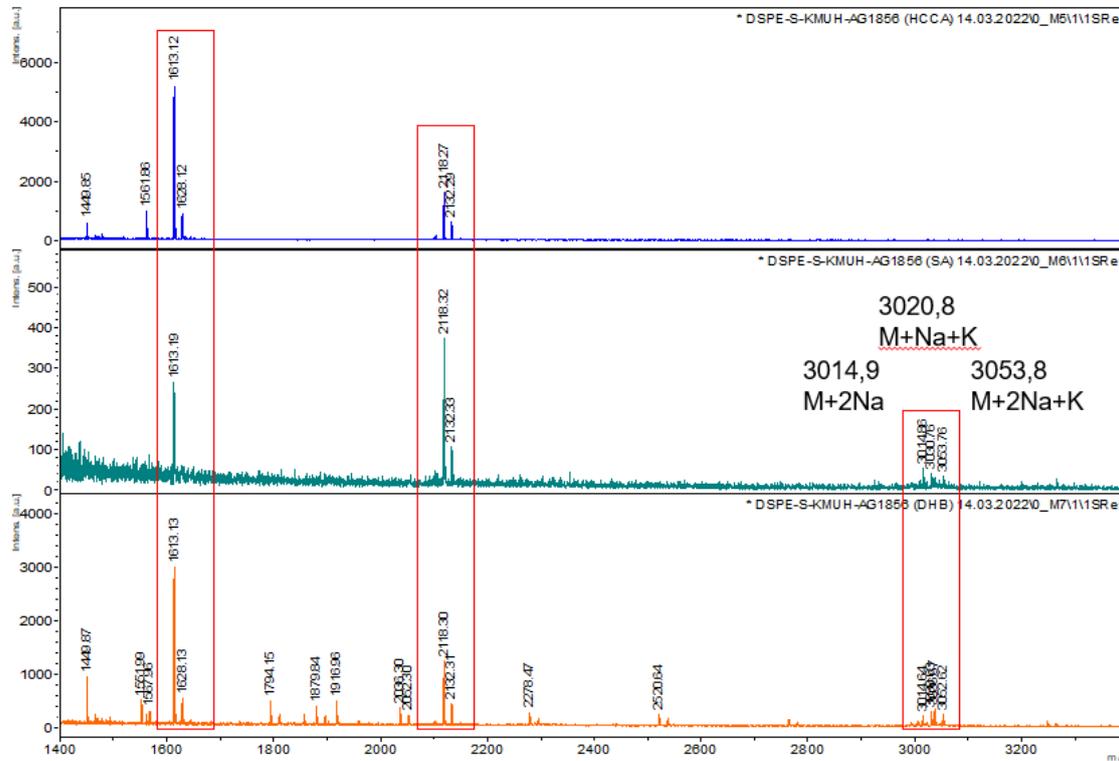


Abb. 82 MALDI-TOF-MS Spektren von DSPE-S-KMUH-AG1856 auf verschiedenen Matrices (MALDI-MS-Methode 1) (1:5 in TA₃₃) auf HCCA (oben), SA (Mitte) und 2,5-DHB (unten); Auf SA und 2,5-DHB als Alkali-Addukte gemessen, zusätzliche Peaks bei 1613.1 und 2118.3. *Messung und graphische Darstellung durch Chris Weise.

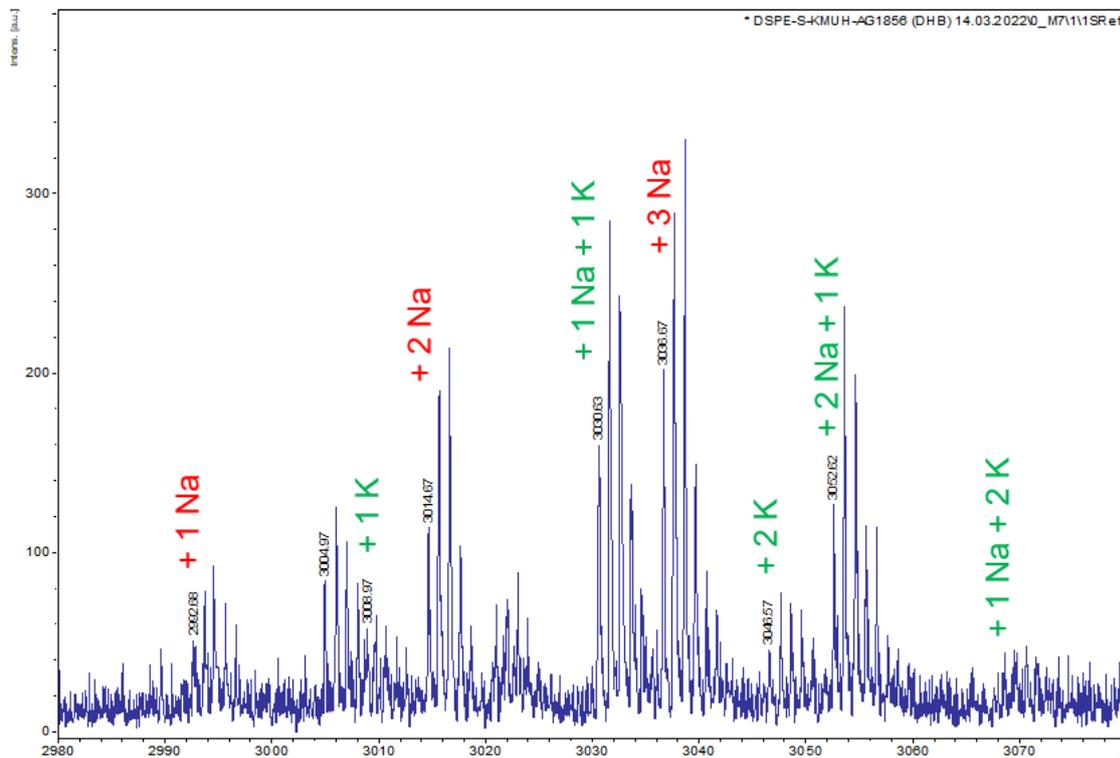
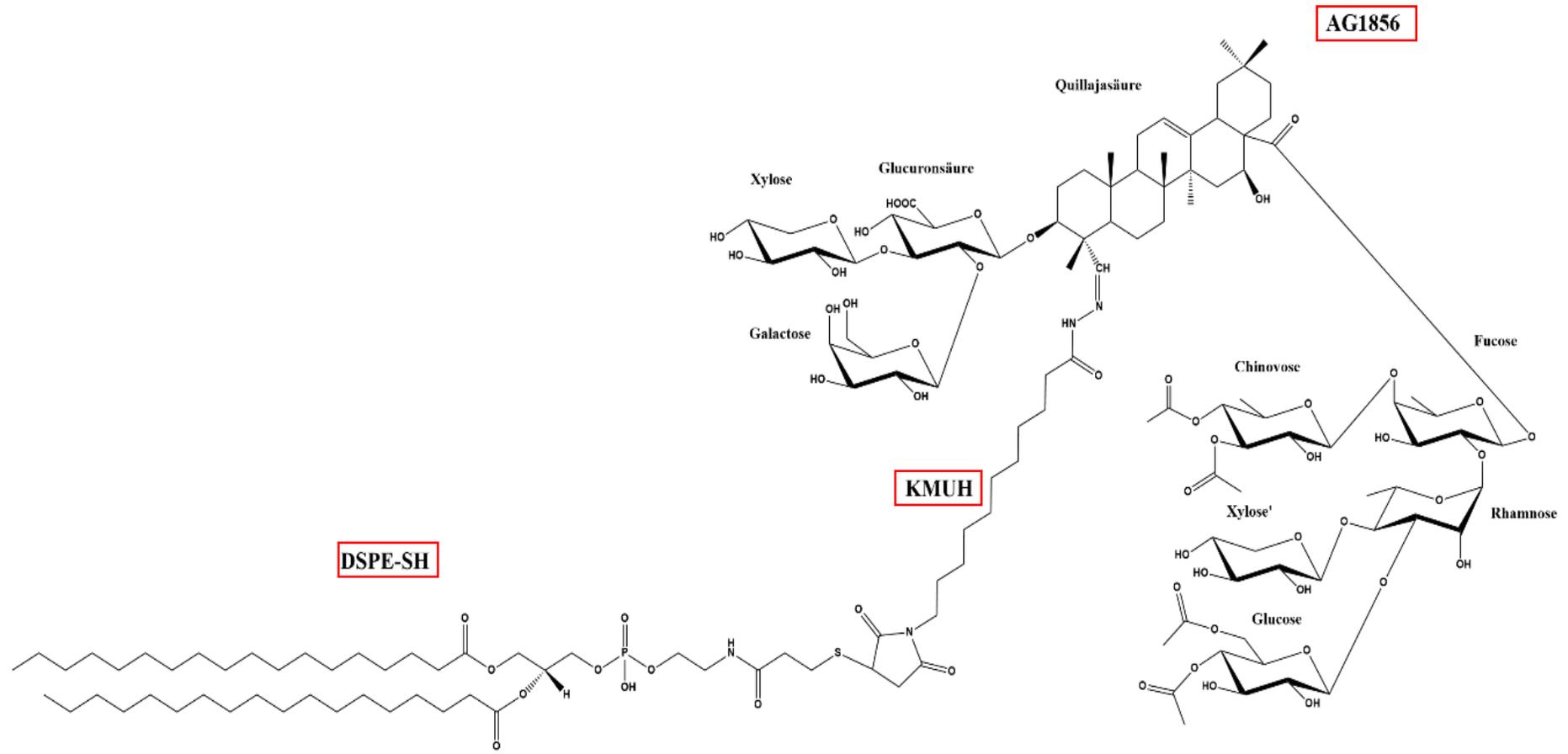


Abb. 83 Vergrößerung in das MALDI-TOF-MS-Spektrum von DSKA (MALDI-MS-Methode 1) (1:5 in TA₃₃) auf 2,5-DHB; Messung verschiedener Na- und K-Addukte. *Messung und graphische Darstellung durch Chris Weise.

Für AG1856 konnten mit allen drei getesteten Matrices verschiedene Na- und K-Addukte gemessen werden (siehe Abb. 79). DSPE-SH (835,6 g/mol) lieferte nur auf SA und 2,5-DHB Signale von Alkali-Addukten (siehe Abb. 80), zusätzliche Signale (z. B. m/z 987 oder 1009) rühren vermutlich von Verunreinigungen her. DSPE-PEG-SH hat eine deklarierte mittlere Masse von 2890 g/mol. Mit allen verwendeten Matrices ergibt sich eine bimodale Verteilung zahlreicher Signale im Bereich von ca. m/z 1800 bis 3000 (mit $\Delta m = 44$), wobei mit HCCA der vordere Teil betont ist, während mit SA und 2,5-DHB der hintere Teil, welcher mit einem Peak bei m/z 2723 nahezu der deklarierten mittleren Masse entspricht, stärkere Signale zeigt (Abb. 81).

Für das PEG-freie Konjugat DSKA (2969 g/mol), das aus einem frühen Konjugationsversuch stammte und in unbekannter (vermutlich geringer) Konzentration vermessen wurde, konnten nur mit SA und 2,5-DHB schwache Signale, wiederum von Alkali-Addukten gemessen werden (siehe Abb. 82 und 83). Zusätzliche Signale (m/z 1613,1/1627,1 bzw. m/z 2118,3/2132,3) mit $\Delta m = 14$ könnten aus einer Fragmentierung des Konjugats resultieren, die jedoch nicht exakt nachvollzogen werden kann (Abb. 82). So ist die Masse eines hypothetischen AG1856-KMUH-Fragments mit 2133 g/mol nahe an einem der beobachteten Signal-Paare.



Exakte Masse: 2969,53

Abb. 84 Strukturformel des Lipid-Linker-AG1856 Konjugats DSPE-S-KMUH-AG1856 (DSKA)
 Analog stellt sich DSPE-PEG-S-KMUH-AG1856 (DPSKA) dar, jedoch mit DSPE-PEG-SH als Lipidkomponente.

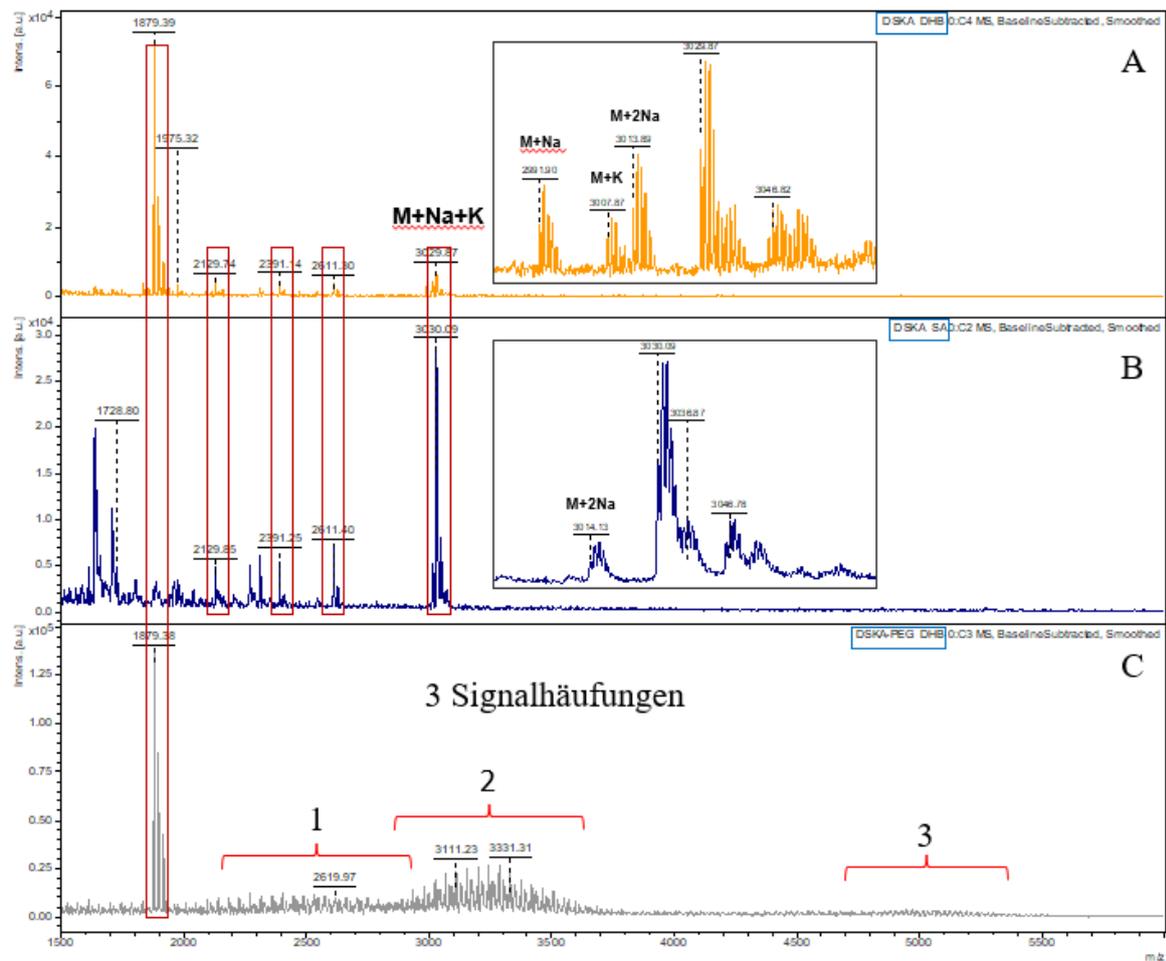


Abb. 85 MALDI-TOF-MS Spektren von DSKA und DPSKA (MALDI-MS-Methode 2)

DSKA auf 2,5-DHB (A); DSKA auf SA (B); DPSKA auf 2,5-DHB (C). *Messung und graphische Darstellung durch Benjamin-Florian Hempel.

Nach der Herstellung und Isolierung größerer Mengen von DSKA und DPSKA wurde erneut eine MALDI-TOF-MS Messung, jedoch an einem leistungsstärkeren Gerät durchgeführt (MALDI-MS-Methode 2). Beide Proben hatten eine Konzentration von 0,5 mg/mL (in EtOH abs.), entsprechend 0,168 mM DSKA bzw. 0,1 mM DPSKA.

Mit SA als Matrix konnten für DSKA Alkali-Addukte mit großer Signalintensität gemessen werden (siehe Abb. 85B). Mit 2,5-DHB als Matrix waren diese deutlich kleiner, dafür waren Signale von AG1856-Alkali-Addukten messbar, die mit SA nicht auftraten (siehe Abb. 85A). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass das Konjugat mit SA unter den Messbedingungen stabiler war als mit 2,5-DHB als Matrix. So konnten auch im Vorversuch (bei insgesamt deutlich schwächeren Signalen) auf 2,5-DHB AG1856-Alkali-Addukte (m/z 1879; 1917) detektiert werden, während dies mit der Matrix

SA nicht der Fall war (siehe Abb. 82). Mit beiden Matrices traten zusätzliche Signale auf (m/z 2129,7; 2391,1; 2611,3), bei denen es sich um Fragmente handeln könnte.

Für DPSKA (mittlere Masse 5023 g/mol) auf 2,5-DHB wurden wiederum Alkali-Addukte von AG1856 gemessen sowie zahlreiche Signale, die sich auf drei Signalhäufungen aufteilen, eine 1. Häufung mit Peak ca. bei m/z 2600, eine 2. mit Peak ca. bei m/z 3250 und eine 3. mit Peak ca. bei m/z 5000, letztere mit zu schwachen Signalen, um sie seriös auswerten zu können (Abb. 85C). Allerdings ist dieses Ergebnis plausibel, wenn angenommen wird, dass das Konjugat DPSKA unter den gegebenen Messbedingungen und der verwendeten Matrix (wie auch DSKA) leicht fragmentiert. Dann würde AG1856, DPSH-PEG-SH (dessen Signale bei der ersten MALDI-MS Messung um m/z 2700 lagen) – 1. Signalhäufung sowie DPSH-PEG-S-KMUH (mittlere Masse 3185 g/mol) – 2. Signalhäufung resultieren. Ein Teil des Konjugats blieb unfragmentiert – 3. Signalhäufung.

Die Signalintensität ist im Falle von DPSKA generell geringer, weil es nicht nur eine Molekülspezies des Analyten gibt, sondern sich das Signal abgesehen von eventueller Fragmentierung ohnehin schon aufgrund der Variabilität im PEG-Anteil von zahlreichen leicht unterschiedlichen Molekülspezies ableitet. Durch Erhöhung der Konzentration und Verwendung von SA als Matrix könnte vermutlich auch das PEG-haltige Konjugat sicher mittels MALDI-MS bestimmt werden.

3.7 Integration von AG1856 oder Lipid-AG1856-Konjugat in Lipid-DNA-Partikel

3.7.1 Einfluss von AG1856 auf Lipoplexe

Es wurden Lipoplexe verschiedener Lipidzusammensetzung ohne oder mit AG1856 (2 $\mu\text{g/mL}$) im Vergleich zu K16-Nanoplexen mit AG1856 (2 $\mu\text{g/mL}$) an drei verschiedenen Zelllinien getestet. Dabei wurde auch der Einfluss einer Filtration der präformulierten Liposomen durch einen 0,22 μm -Membranfilter untersucht. Diese Filtration hatte den größten Effekt auf die Transfektionseffizienz (TE) bei Hepa 1-6 Zellen, bei denen sie mit Lipoplexen aus unfiltrierten Liposomen durchweg größer war (siehe Abb. 86). Auch die Kombination von DOTAP mit Cholesterol führte bei dieser Zelllinie zu einer Steigerung der TE (bei ECV-304 und N2A nicht), ebenso wie die Zugabe von AG1856, wenn auch nur moderat. Besonders stark war die Steigerung der TE durch AG1856 bei den N2A-Zellen, in Kombination mit Nanoplexen (> 90 %) noch deutlich stärker als in Kombination mit Lipoplexen (LD_DOTAP bis 50 %). Dagegen erreichte die TE mit Nanoplexen+AG1856 bei ECV-304 und Hepa 1-6 Zellen nur deutlich kleinere Werte von ca. 1 bzw. ca. 7 %. ECV-304 lieferten generell die kleinsten TE-Werte, egal mit welchen Nanopartikeln und ob mit oder ohne AG1856. Mit Lipoplexen lag sie bei rund 10 %, bei „DOTAP_unfiltriert“ bis 20 %).

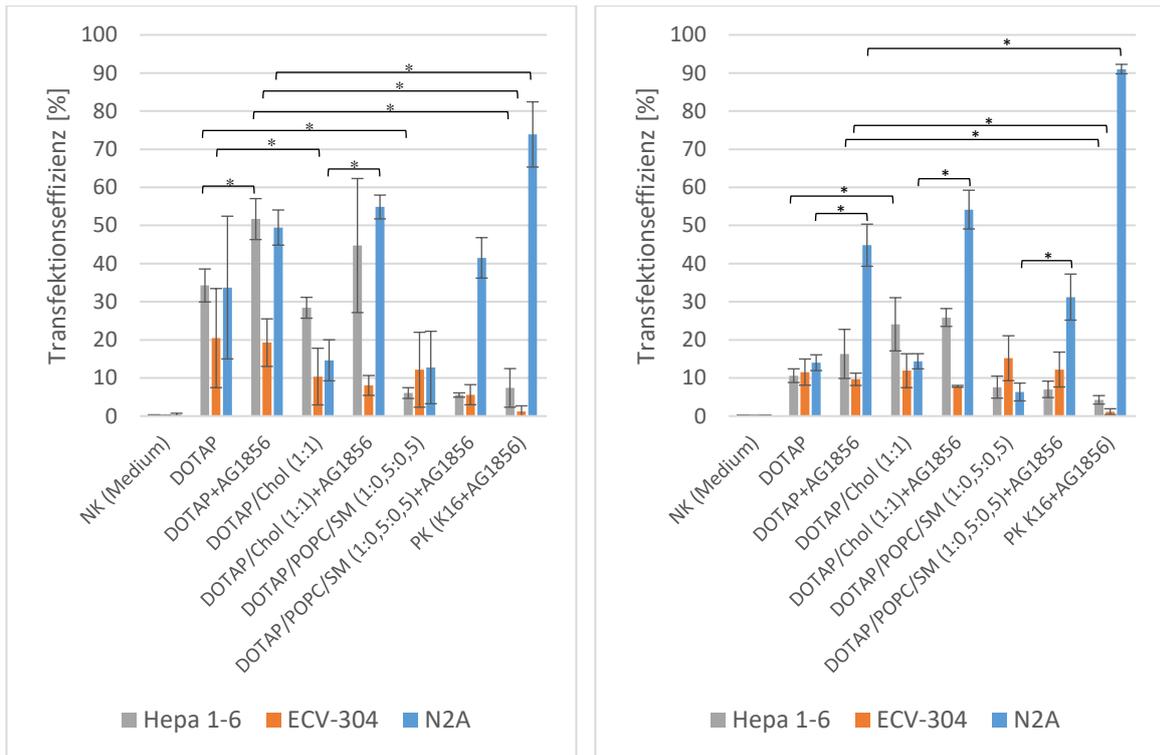


Abb. 86 Transfektionseffizienz verschiedener Lipoplexe ohne oder mit AG1856 (2 µg/mL) im Vergleich zu K16-Nanoplexen mit AG1856

Die Lipoplexe wurden aus unfiltrierten (links) oder filtrierten (rechts) präformulierten Liposomen hergestellt. Je 2 Experimente à 2 Wells (n = 4). Die Signifikanz der Unterschiede wurde via Wilcoxon-Test ermittelt (* p < 0,05).

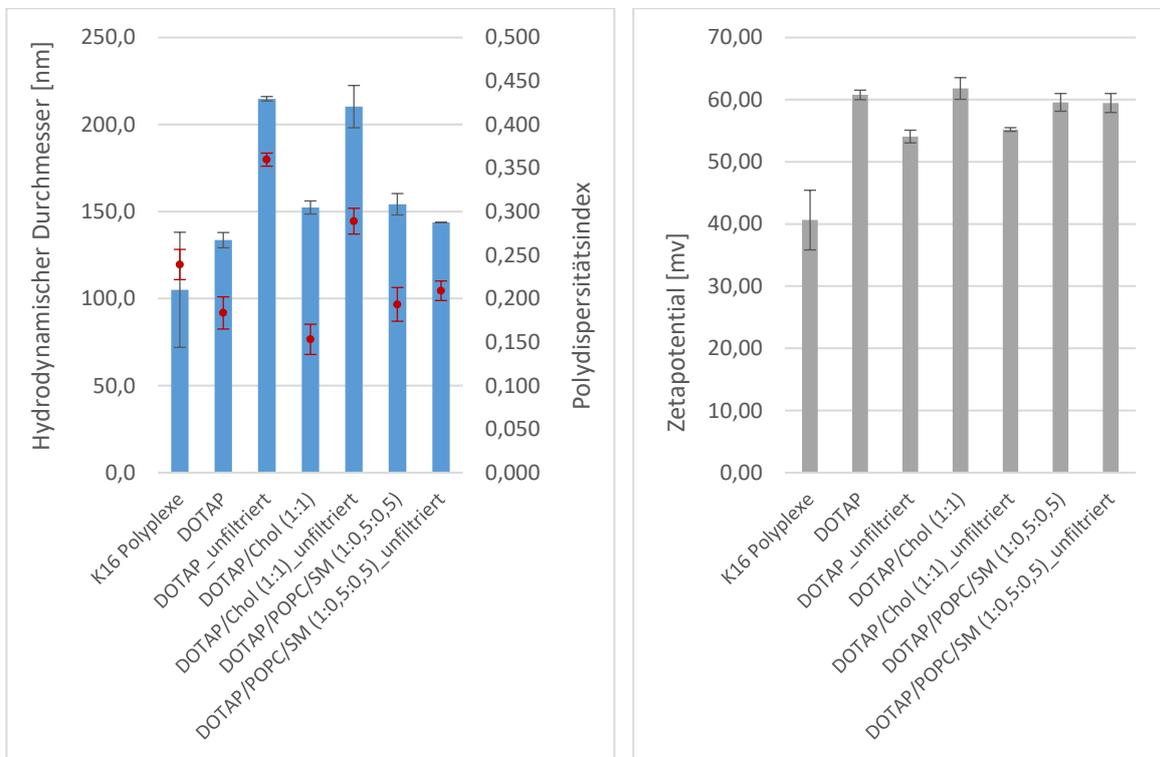


Abb. 87 Hydrodynamischer Durchmesser, PDI (rote Punkte) und Zetapotential verschiedener Lipoplexe im Vergleich zu K16-Nanoplexen

Die Lipoplexe wurden aus filtrierten oder unfiltrierten präformulierten Liposomen hergestellt. 2 Formulierungen à 3 Messwerte für H_D und PDI, 1 Formulierung à 3 Messungen für ζ -Potential.

Hinsichtlich Hydrodynamischer Durchmesser, PDI und Zetapotential zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Nanopartikel-Formulierungen (siehe Abb. 87). Erwartungsgemäß waren die Lipoplexe aus unfiltrierten Liposomen etwas größer (ca. 210 nm), bei etwas größerem PDI (0,3 bis 0,35) als die Lipoplexe aus filtrierten Liposomen (ca. 140 nm, PDI zwischen 0,15 und 0,19). Bei den Lipoplexen aus DOTAP/POPC/SM wirkte sich die Filtration jedoch kaum aus. Alle Lipoplexe wiesen ein ähnliches Zetapotential zw. 50 und 60 mV auf. Die Nanoplexe waren mit 40 mV etwas weniger positiv nach außen geladen.

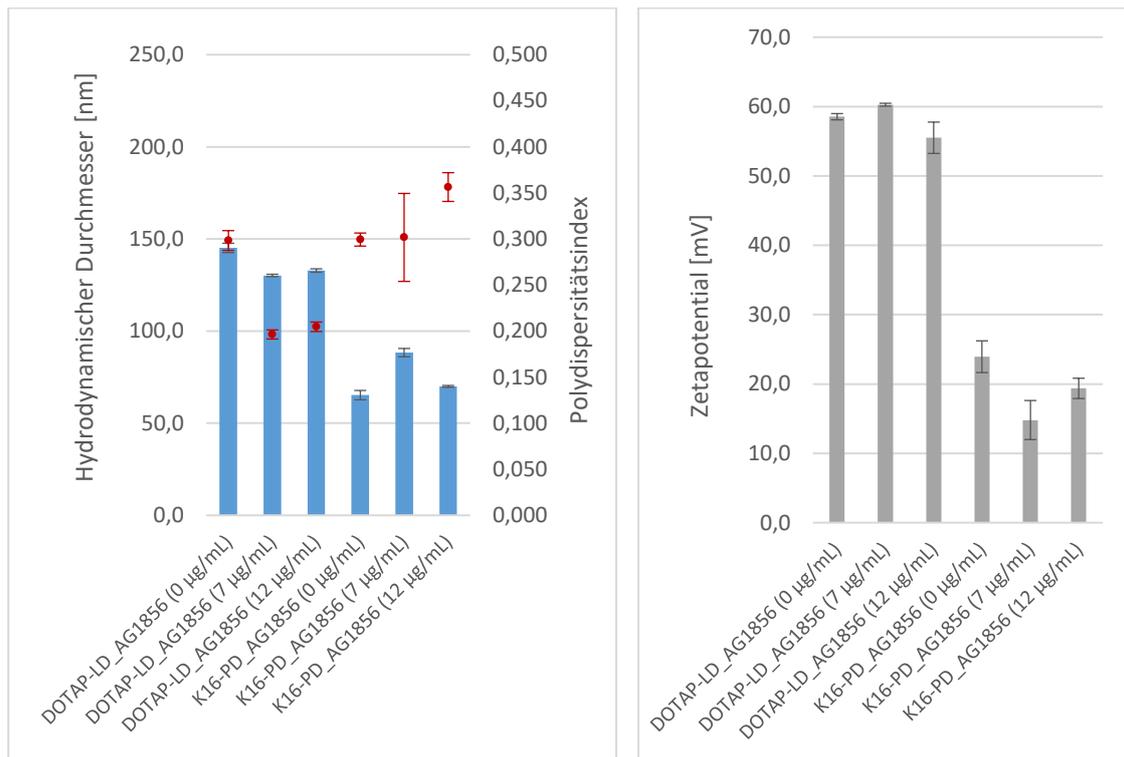


Abb. 88 Einfluss verschiedener AG1856-Konzentrationen auf DOTAP-Lipoplexe und K16-Nanoplexe
 Links: Hydrodynamischer Durchmesser und PDI; Rechts: Zetapotential; 1 Formulierung à 3 Messungen.

Die Auswirkungen einer direkten AG1856-Zugabe wurden anhand von DOTAP-Lipoplexen und K16-Nanoplexen untersucht. Wie in Abb. 88 zu sehen, scheint das Saponin in den verwendeten Konzentrationen auf Lipoplexe eher eine stabilisierende Wirkung zu haben (Abnahme des PDI), während es bei den Nanoplexen zur Aggregation führt (Zunahme des PDI, Abnahme des Anteils im Messbereich – siehe Tab. 44). Das Zetapotential wird durch AG1856 nur wenig beeinflusst.

Tab. 44 Einfluss von AG1856 auf Nanoplexe und Lipoplexe (Messbereich: 0,4-10000 nm)

Formulierung	im Messbereich [%]
LD DOTAP+AG1856 (0 µg/mL)	92,1
LD DOTAP+AG1856 (7 µg/mL)	98,1
LD DOTAP+AG1856 (12 µg/mL)	98,1
PD K16 +AG1856 (0 µg/mL)	92,7
PD K16 +AG1856 (7 µg/mL)	79,6
PD K16 +AG1856 (12 µg/mL)	87,8

Ein weiteres Experiment, bei dem den formulierten DOTAP-Lipoplexen AG1856 zugesetzt und die Partikel im Anschluss weiter mit Wasser verdünnt und dann ultrafiltriert wurden, schien den stabilisierenden Effekt des Saponins zu untermauern, denn während ultrafiltrierte DOTAP-Lipoplexe ihre Transfektionseffizienz verloren, wurde dies durch vorherigen Zusatz von AG1856 verhindert (siehe Abb. 89).

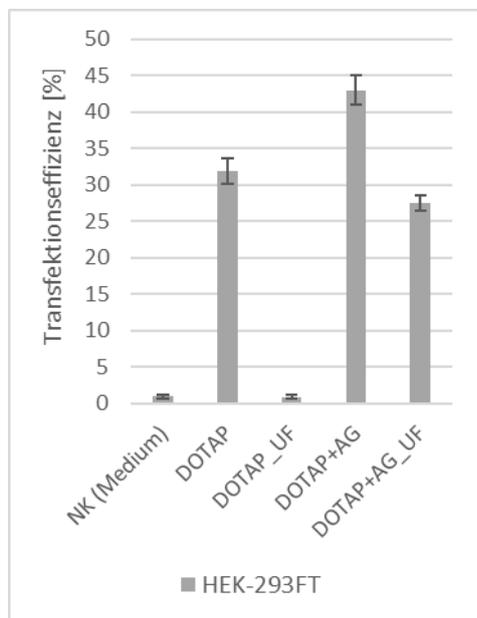


Abb. 89 Stabilisierung der DOTAP-Lipoplexe durch AG1856

N/P-Verhältnis 3; Formulierten DOTAP-Lipoplexe (75 μ L) wurden mit 325 μ L Reinstwasser (mit oder ohne 5,6 μ g AG1856) verdünnt und anschließend in 4 mL Wasser ultrafiltriert (Amicon 15 ultra-30kDa) oder nicht ultrafiltriert, die resultierenden 200 μ L wurden 1:1 mit Wasser verdünnt und von der Mischung 100 μ L als DLS-Probe entnommen, die übrigen 300 μ L wurden 1:1 mit Kulturmedium verdünnt; Zugabe von 120 μ L pro Well (rechnerisch resultierende AG1856-Konzentration: 2 μ g/mL). 1 Experiment à 3 Wells.

3.7.2 Lipoplexe aus DOTAP/Konjugat-Liposomen

Es wurde getestet, welche Auswirkung kleine Anteile der hergestellten Lipid-AG1856-Konjugate in DOTAP-Liposomen auf die Transfektionseffizienz von daraus hergestellten Lipoplexen haben. Die Zelllinien N2A, HEK-293FT und ECV-304 wurden dafür verwendet. Als Positivkontrolle wurden DOTAP-Lipoplexe verwendet. In Tab. 45 sind die theoretischen AG1856-Konzentrationen aufgelistet, die im Well maximal möglich gewesen wären, unter der Annahme kompletter Freisetzung aus dem Konjugat.

Erneut zeigen die ECV-304-Zellen die geringsten TE-Werte, die durch Involvierung der Konjugate noch kleiner ausfallen. Der gleiche Trend ist auch für HEK-293FT-Zellen zu erkennen, jedoch bei durchweg größeren TE-Werten (siehe Abb. 90). Nur die N2A Zellen zeigen eine größere TE bei Lipoplexen aus DOTAP mit 2 mol% DSKA (28 % vs. 10 %).

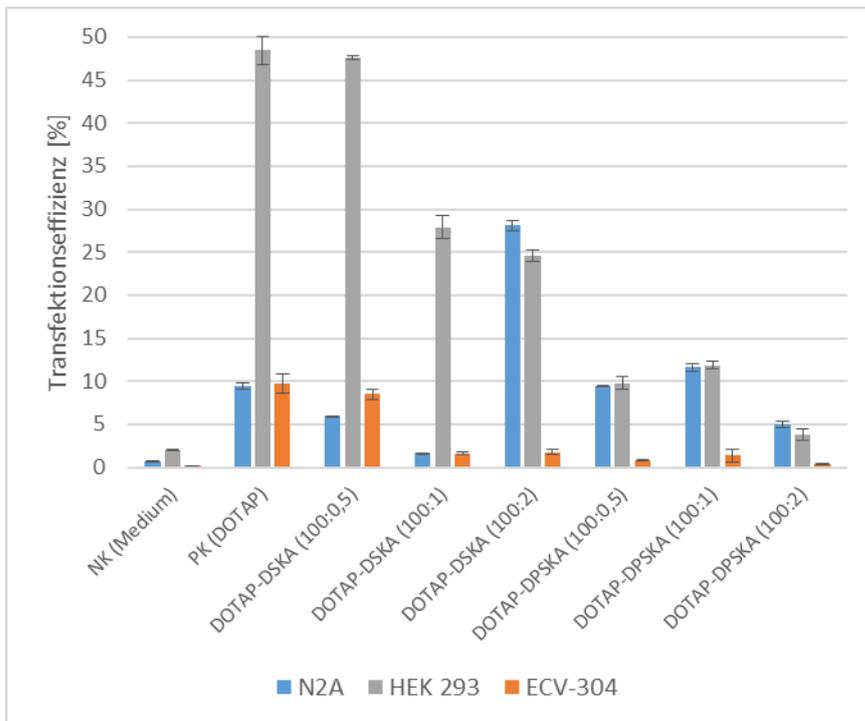


Abb. 90 Transfektionseffizienz von Lipoplexen verschiedener molarer Verhältnisse von DOTAP/Lipid-AG1856-Konjugat
 N/P-Verhältnis der Lipoplexe = 3. 1 Experiment à 2 Wells.

Tab. 45 Maximal mögliche AG1856-Konz. im Transfektionsversuch (durch theoretische Freisetzung)

Lipoplex-Formulierung	Theoretische maximale AG1856-Konzentration im Well [$\mu\text{g/mL}$]
DOTAP-Konjugat (100:0,5)	0,084
DOTAP-Konjugat (100:1)	0,168
DOTAP-Konjugat (100:2)	0,337

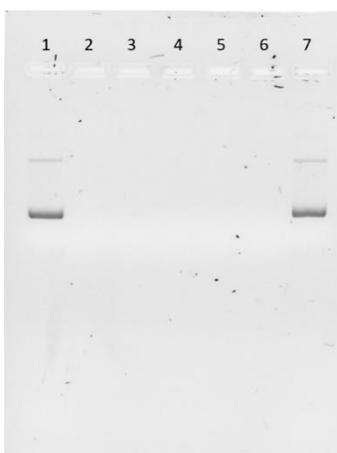


Abb. 91 DNA-Komplexierung durch Lipoplexe aus DOTAP/Lipid-AG1856-Konjugaten
 Agarosegel-Retentions-Assay; Spuren 2-6: Lipoplexe (LD) mit 800 ng peGFP. Spuren 1 und 7: 100 ng peGFP, Spur 2: LD_DOTAP/DSKA (100:1), Spur 3: LD_DOTAP/DSKA (100:2), Spur 4: LD_DOTAP, Spur 5: LD_DOTAP/DPSKA (100:1), Spur 6: LD_DOTAP/DPSKA (100:2).

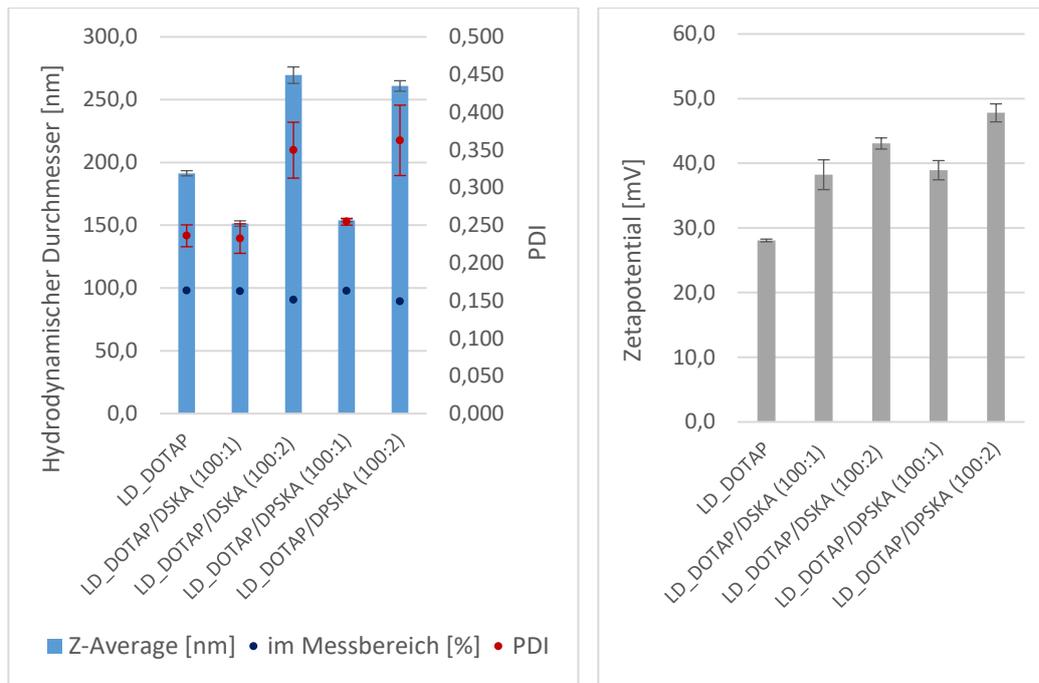


Abb. 92 Bestimmung von Größe/Größenverteilung und Zetapotential der DOTAP/Konjugat-Lipoplexe

Links: Hydrodynamischer Durchmesser, PDI, Anteil der Partikel im Messbereich; Rechts: Zetapotential. 1 Formulierung à 3 Messwerte.

Die vollständige DNA-Komplexierung in den verwendeten Lipoplexen konnte im Agarosegel-Retentions-Assay bestätigt werden (siehe Abb. 91). Die Partikelanalyse zeigte im Vergleich zu DOTAP-Lipoplexen ($H_D = 190$ nm) etwas kleinere Partikel ($H_D = 150$ nm) bei 1 mol% DSKA oder DPSKA, aber größere Partikel bei 2 mol% Konjugat (ca. 270 nm). Mit den Partikeln vergrößerte sich auch der PDI (von ca. 0,25 auf über 0,35). Mehr Konjugat schien demnach zu leichter Aggregation zu führen, was auch am kleineren Prozentsatz der Partikel innerhalb des Messbereichs zu erkennen war (Abb. 92, links, blaue Punkte). Das Zetapotential vergrößerte sich umso mehr, je größer der Anteil an Konjugat war.

Tab. 46 Partikelanalyse von DOTAP/DSKA-Lipoplexen und Komponenten

Komponenten	H_D [nm]	PDI	im Messbereich [%]	ζ -Potential [mV]
pEGFP	629,9 ± 155,8	0,651 ± 0,160	64,3	-6,4 ± 3,3
DSKA-Liposomen	216,7 ± 12,47	0,314 ± 0,026	87,8	
DOTAP-Liposomen	112,5 ± 1,6	0,321 ± 0,011	93,8	62,7 ± 1,9
DOTAP/DSKA (100:1) Liposomen	1054,9 ± 119,8	0,839 ± 0,024	34,8	49,3 ± 1,3
DOTAP/DPSKA (100:1) Liposomen	77,1 ± 1,5	0,396 ± 0,018	97,9	37,8 ± 3,6
Lipoplexe				
LD_DOTAP	191,4 ± 2,1	0,236 ± 0,015	98,0	28,1 ± 0,2
LD_DOTAP/DSKA (100:1)	151,4 ± 2,2	0,232 ± 0,020	97,4	38,2 ± 2,3
LD_DOTAP/DSKA (100:2)	269,5 ± 6,6	0,350 ± 0,037	90,6	43,1 ± 0,9
LD_DOTAP/DPSKA (100:1)	154 ± 1,1	0,255 ± 0,005	97,7	38,9 ± 1,5
LD_DOTAP/DPSKA (100:2)	260,9 ± 4,2	0,363 ± 0,047	89,4	47,8 ± 1,4

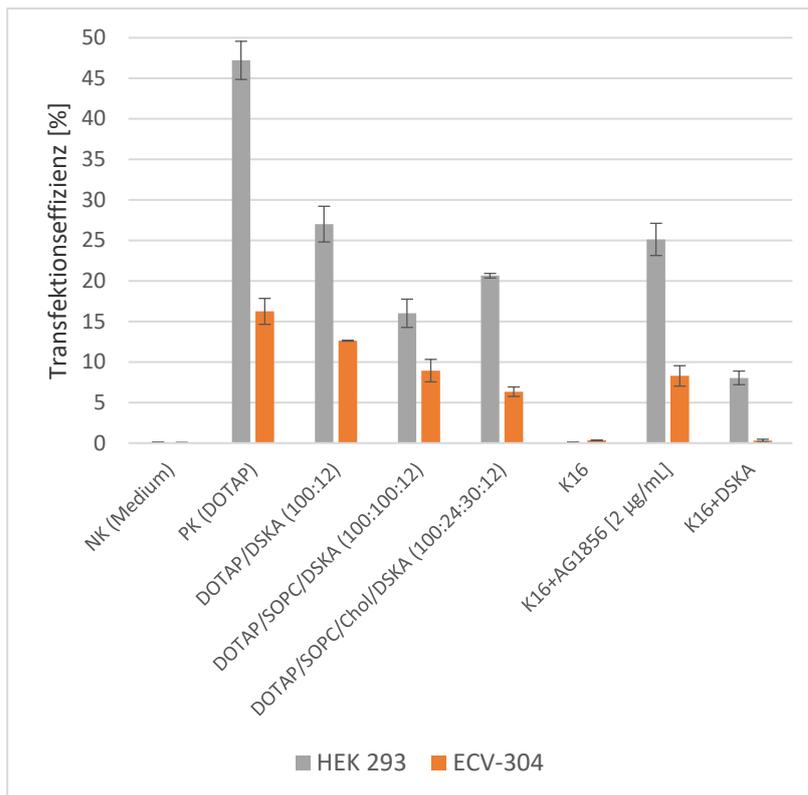


Abb. 93 Einfluss größerer DSKA-Konzentration sowie weiterer Lipidkomponenten auf die Transfektionseffizienz von DOTAP-DSKA-Lipoplexen

Im Vergleich: K16-Nanoplexe mit AG1856 oder DSKA. N/P-Verhältnis der Lipoplexe: 3. N/P-Verhältnis der Nanoplexe: 10,85. Das eingesetzte DSKA entspricht 2 µg AG1856/mL. 1 Experiment à 2 Wells.

Die Verwendung von deutlich mehr DSKA in den DOTAP-Lipoplexen, einer AG1856-Konzentration von 2 µg/mL entsprechend, führte zu ähnlichen Ergebnissen hinsichtlich TE (Abb. 93) und Partikelparameter (siehe Abb. 94). Es konnte eine noch stärkere Partikelaggregation anhand des kleineren Anteils der Messergebnisse innerhalb des Messbereichs festgestellt werden. Eine Verwendung zusätzlicher Lipide (SOPC, Chol) führte zwar zu kleineren Partikeln mit kleineren PDI, allerdings auch zu kleinerer Transfektionseffizienz. Auf geringere DNA-Komplexierung konnte die Abnahme von TE-Werten nicht zurückgeführt werden (siehe Abb. 95). Zum Vergleich wurden bei diesem Versuch K16-Nanoplexe verwendet, einmal ohne Zusätze, einmal in Kombination mit AG1856 und einmal in Kombination mit DSKA. Während das Saponin die TE der Nanoplexe deutlich steigern konnte, führte K16 nur bei den HEK-293FT-Zellen zu einer moderaten Steigerung.

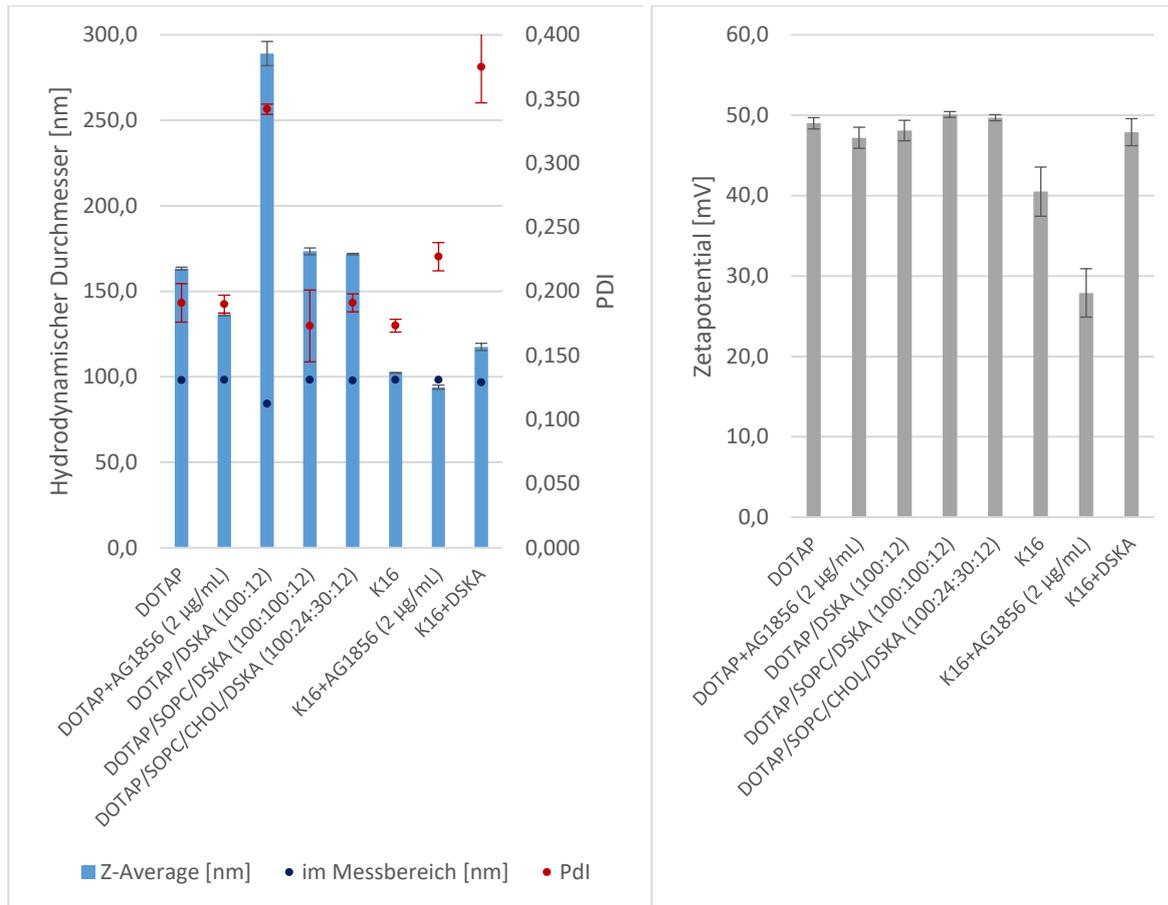


Abb. 94 Einfluss weiterer Lipidkomponenten und größerer DSKA-Konzentration auf Partikelgröße und ζ -Potential im Vergleich zu K16-Nanoplexten mit AG1856 oder DSKA

Das eingesetzte DSKA entspricht 2 µg AG1856/mL pro Well. 1 Formulierung à 3 Messwerte.

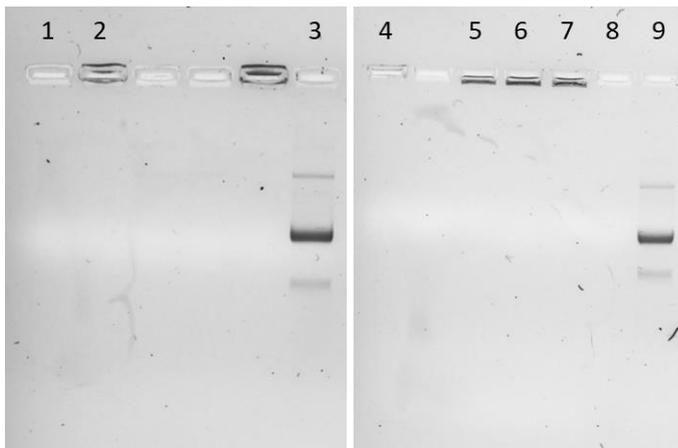


Abb. 95 Einfluss größerer DSKA-Anteile in Lipoplexten auf die DNA-Komplexierung

Agarosegel-Retentions-Assay; Spuren 1-2 und 4-8: Lipoplexe mit 1000 ng peGFP. Spuren 3 und 9: 100 ng peGFP, Spur 1: LD_DOTAP/DSKA (100:12), Spur 2: LD_DOTAP/SOPC/DSKA (100:100:12), Spur 4: LD_DOTAP/SOPC/Chol/DSKA (100:24:30:12), Spur 5: PD_K16, Spur 6: PD_K16+AG1856 (2 µg/mL), Spur 8: PD_K16+DSKA. Das eingesetzte DSKA entspricht 2 µg AG1856/mL.

3.7.3 Einfluss von AG1856 und Lipid-AG1856-Konjugaten auf LNP

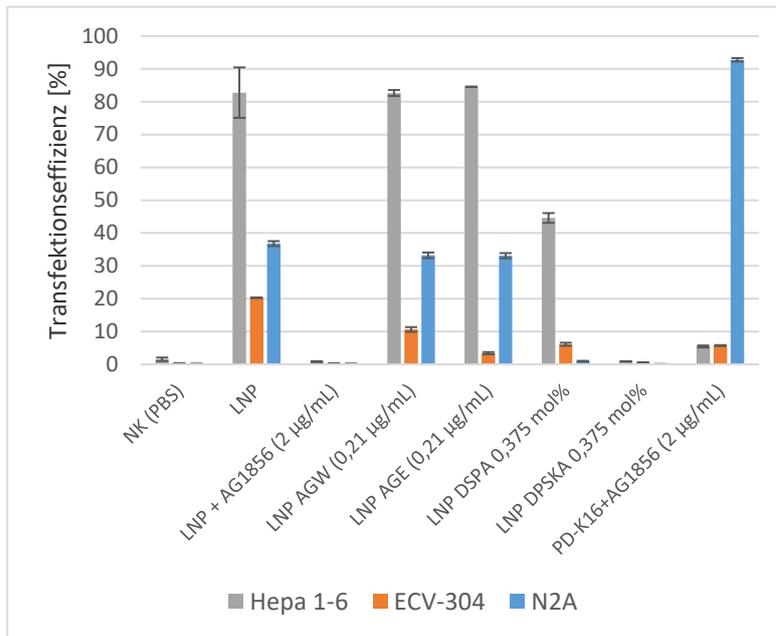


Abb. 96 Einfluss von AG1856 und Lipid-AG1856-Konjugaten auf die Transfektionseffizienz von LNP
 N/P-Verhältnis: 6. AGW: AG1856-Zugabe zur DNA bei Formulierung (AG1856 gelöst in Wasser), AGE: AG1856-Zugabe zu Lipiden bei Formulierung (AG1856 gelöst in EtOH). Das eingesetzte DSKA bzw. DPSKA entspricht 0,21 µg AG1856/mL. Bei LNP DSKA und LNP DPSKA wurden 1,5 mol% PEG-DMG verwendet. 1 Experiment à 2 Wells.

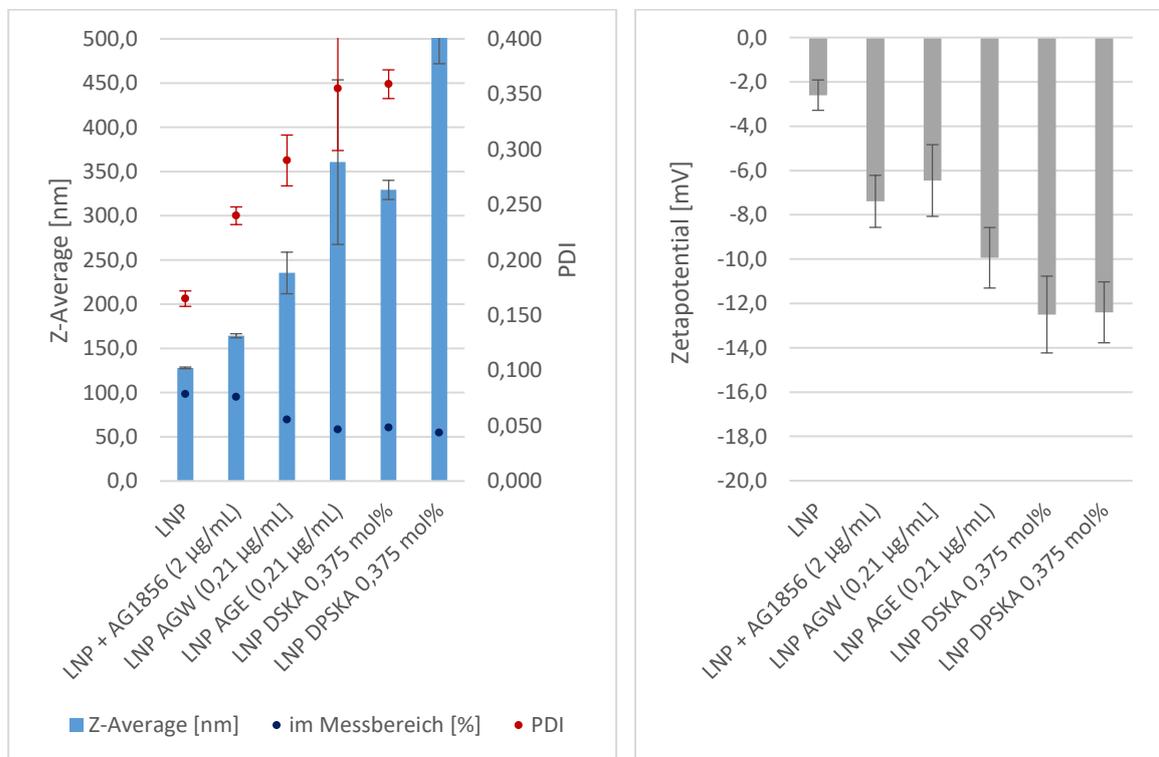


Abb. 97 DLS-Messung/Zetapotential von LNP mit AG1856 oder Lipid-AG1856-Konjugat
 Das eingesetzte DSKA bzw. DPSKA entspricht 0,21 µg AG1856/mL. Z-Average von LNP DPSKA 0,375 mol% = 527,2 nm ± 55,3 nm). AGW: AG1856-Zugabe zur DNA bei Formulierung (AG1856 gelöst in Wasser), AGE: AG1856-Zugabe zu Lipiden bei Formulierung (AG1856 gelöst in EtOH). Bei LNP DSKA und LNP DPSKA wurden 1,5 mol% PEG-DMG verwendet. 1 Formulierung à 3 Messwerte.

Die hergestellten Lipid-Nanopartikel (LNP) hatten einen kleinen hydrodynamischen Durchmesser von 130 nm und einen kleinen PDI von 0,165 sowie ein nahezu neutrales, sogar schwach negatives Zetapotential (-2,6 mV) auf (siehe Abb. 97). Ihre Transfektionseffizienz war bei ECV-304 (20 % vs. 5 %) und insbesondere bei Hepa 1-6 Zellen (85 % vs. 5 %) deutlich größer, bei N2A-Zellen kleiner (37 % vs. 93 %) als die der Positivkontrolle (K16-PD+AG1856). Ein Mischen der formulierten LNP mit PBS, welches AG1856 enthielt (Endkonzentration 12 µg/mL) führte zu moderat größeren Partikeln (H_D 160 nm) mit breiterer Größenverteilung (PDI 0,24) und negativem Zetapotential (-7,4 mV). Die Transfektionseffizienz dieser Partikel war nahezu auf 0 % gesunken.

Ein Einbringen von AG1856 während der Herstellung der LNP, entweder mit der wässrigen DNA-Lösung (AGW) oder mit der ethanolischen Lipidlösung (AGE) führte zu einer weiteren Zunahme von Partikelgröße und PDI sowie negativem Zetapotential (-6,5 mV und -9,9 mV). Die gestiegene Tendenz zur Aggregation lässt sich auch am kleinen Prozentanteil des Ergebnisses im Messbereich ablesen (70 % bzw. 60 %). Die Transfektionseffizienz änderte sich indes kaum, abgesehen von einer leichten Abnahme bei N2A- und ECV-Zellen.

Die Formulierung der LNP mit einem molaren Lipidanteil von 0,375 % DSKA oder DPSKA hatte einen negativen Einfluss auf die Partikelparameter. Die Partikel wurden sehr groß und zeigten ein hohes Maß an Aggregation (mit DPSKA noch ausgeprägter als mit DSKA), was sich in einem größeren PDI und einem kleineren Anteil der Messsignale innerhalb des Messbereichs ausdrückte. Das Zetapotential betrug ca. -12 mV. Die Transfektionseffizienz sank für LNP DSKA deutlich und lag für LNP DPSKA nahezu bei 0 %.

3.8 Konjugat-Stabilität

Stat. Phase: HPTLC Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)
 Fließmittel: Chloroform/Methanol/Wasser (50:40:10)
 Auftragung: Linomat IV (CAMAG)
 Entwicklung: 10x20 cm horizontale Entwicklungskammer (CAMAG)

Detektion:

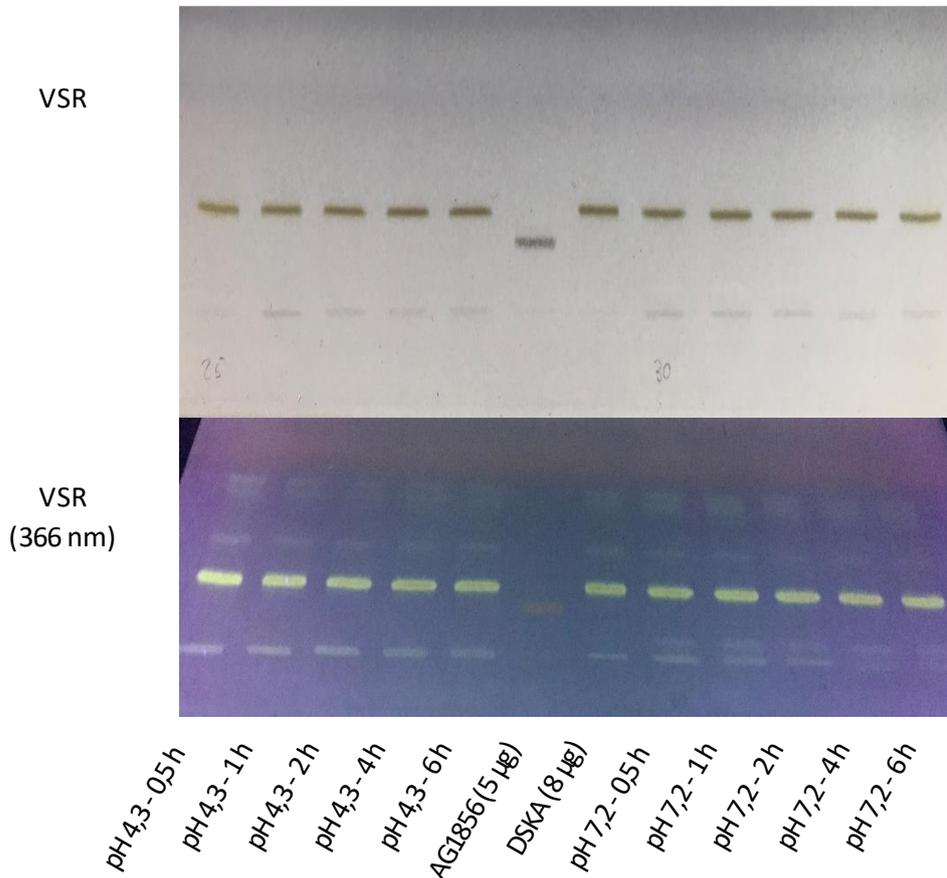


Abb. 98 Hydrolyseversuch mit DSKA in neutralem und saurem Puffer

Es wurde für jeden Puffer ein Lipidfilm aus 45 µg DSKA erzeugt, der in 120 µL Natriumacetatpuffer (10 mM, pH 4,3) oder Hepespuffer (10 mM, pH 7,2) hydratisiert wurde. Mit zunehmender Inkubationszeit bei RT wurden 20 µL-Proben entnommen und auf eine DC-Platte aufgetragen (entsprechend 7,5 µg DSKA).

Durch Inkubation von DSKA in saurem oder neutralem Puffer bei Raumtemperatur wurde innerhalb von 6 h kein AG1856 freigesetzt, das Konjugat war unter diesen Bedingungen stabil (Abb. 98)

Es wurde festgestellt, dass DSKA den DSC-Versuch (2-92 °C) kaum hydrolysiert, überstand. Wie DLS-Messungen zeigten, nahmen durch das Aufheizen im DSC-Versuch sowohl die Partikelgröße als auch der PDI ab (siehe Tab. 47).

In einem weiteren Hydrolyseversuch ausgehend von der DSC-Probe, konnte schließlich in höher konzentrierten Essigsäurelösungen die Abspaltung von AG1856 erreicht werden (siehe Abb. 99), was sich auch anhand von DLS-Messungen nachvollziehen ließ (Tab. 47).

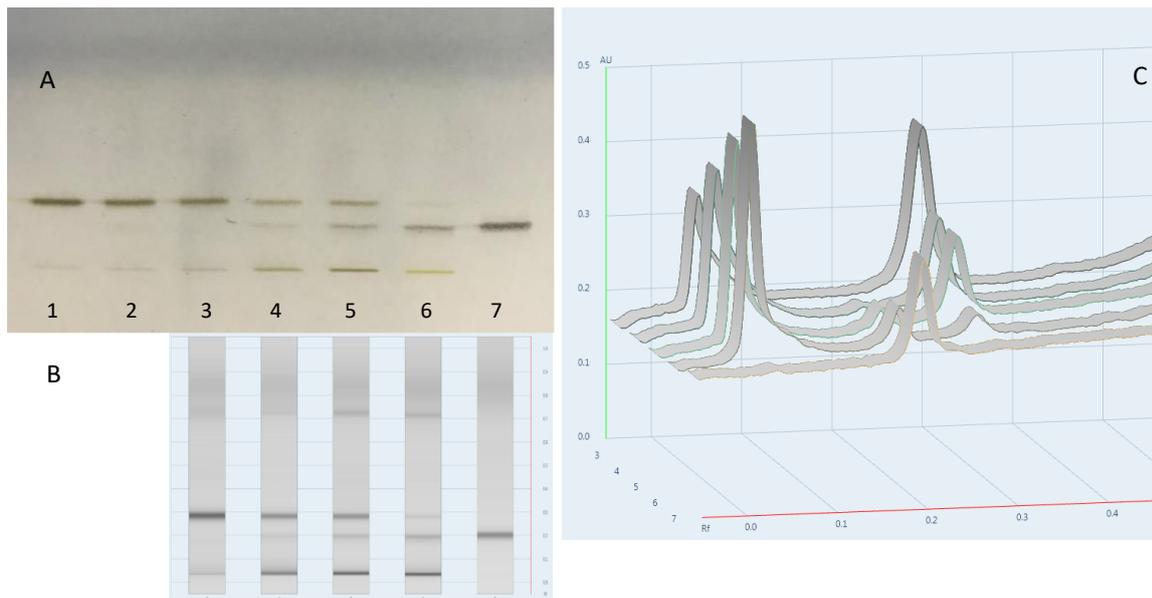


Abb. 99 Hydrolyseversuch mit DSKA in Essigsäure (AA)

1:1 Verdünnung von DSKA nach DSC-Versuch (0,15 mM) mit Wasser, 20 %iger AA oder 50 %iger AA und 1 h Inkubation bei 40 °C; Auftragung entsprechend 9 µg DSKA; 1=DSKA vor DSC, 2=DSKA nach DSC, 3=DSKA in H₂O, 4=DSKA in 10 % AA (pH 1,63), 5=DSKA in 25 % AA (pH 1,26), 6=DSKA in 50 % AA (pH 0,73), 7=AG1856 (7 µg). A) Detektion mit VSR; B) Detektion mit VSR (Scan Abs. bei 416 nm); C) Absorption bei 210 nm (vor Det. mit VSR).

Tab. 47 DLS-Messungen zur Hydrolyse von DSKA

Probe	Z-Average [nm]	PDI	% im Messbereich
DSKA vor DSC	216,7 ± 12,5	0,314 ± 0,026	87,8 ± 1,3
DSKA nach DSC	153,4 ± 3,2	0,253 ± 0,008	98,1 ± 0,2
DSKA nach DSC in 50 % AA	4295 ± 1185	0,854 ± 0,253	30 ± 3,7

Aufgrund der Struktur von DSKA und der gemessenen Partikelgröße kann von der Bildung von Liposomen ausgegangen werden.

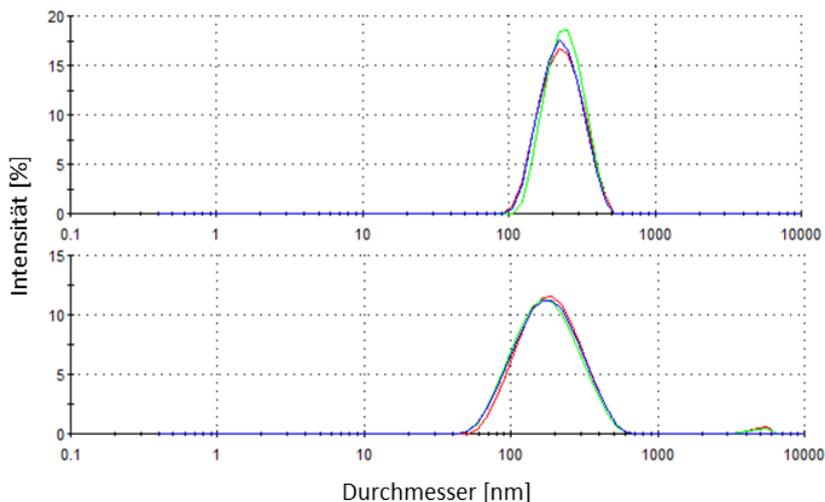


Abb. 100 DLS-Analyse von DSKA vor DSC- (oben) und nach DSC-Messung (unten)
Je 3 Messungen derselben Probe.

4 Diskussion

Innovative Plasmid-DNA

Zu Beginn dieser Arbeit lag der Fokus auf möglichen Optimierungen der Plasmid-DNA als Komponente nicht-viraler Gentransfer-Systeme. Die Verwendung von Plasmid-DNA bietet grundsätzlich einige Vorteile. Sie kann im Labor einfach und kostengünstig bearbeitet (Klonierung gewünschter Gene), in Bakterien (*Escherichia coli*) vermehrt und mit Hilfe kommerzieller Kits isoliert werden. Die Manipulation und Vermehrung viraler Vektoren in einer Zellkultur sowie ihre Isolierung und Aufreinigung ist wesentlich aufwändiger. Im Vergleich zu RNA, die permanent durch ubiquitäre RNasen von Abbau bedroht ist, zeigt sie sich wesentlich stabiler. Aber die Verwendung klassischer Plasmid-DNA birgt auch Nachteile. Ihr bakterielles Rückgrat wird von Toll-Like-Rezeptoren (TLR) als pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP) erkannt und löst Immunreaktionen aus. Dabei ist es TLR9 in der Membran intrazellulärer Vesikel wie z. B. Endosomen und Lysosomen [124], der unmethylierte CpG-Muster erkennt, welche die bakterielle DNA charakterisieren [79]. Dies reduziert die Wirksamkeit entsprechender Therapeutika. Ein weiteres Problem sind Antibiotika-Resistenzgene auf Plasmiden, die v. a. für die Positivselektion im Rahmen der Klonierung, aber auch während der Vermehrung in *E. coli* notwendig, bei der Anwendung im Menschen jedoch unerwünscht sind [80].

Ein Ansatz zur Überwindung beider Probleme ist die Produktion von Minicircle-DNA, bei der sowohl das bakterielle Rückgrat als auch das Resistenzgen während der Herstellung enzymatisch aus einem Parental-Plasmid entfernt wurden. Im Resultat sind die Minicircle wie der Name schon nahelegt kleiner als das korrespondierende Plasmid, was für sich genommen bereits die Transfektionseffizienz (TE) erhöht [75], vermutlich weil der Transport durch das Zytosol in den Kern erleichtert wird [76]. Darüber hinaus ist auch die Expressionsdauer verlängert [77, 78]. Die initiale Verwendung eines kommerziellen Kits von System Biosciences für die Minicircle-Herstellung führte zu unbefriedigenden Ergebnissen (geringe Ausbeute, Minicircle-Multimere) und erlaubte nur wenige Ansätze. Deshalb wurde aufbauend auf Erkenntnissen aus entsprechenden Publikationen [82, 100, 101] ein eigenes Herstellungsprotokoll inklusive Größenausschlusschromatographie (SEC) auf Sephacryl S-1000 SF zur Isolierung von bis zu 200 µg Minicircle-DNA (2,5 kbp) in nahezu reiner supercoiled Konformation entwickelt [95]. Dies ist die natürliche und physiologisch aktivste Plasmid-Konformation, weshalb auch die US-amerikanische Arzneimittelbehörde FDA einen Anteil von > 80 % in industriell hergestellter therapeutischer Plasmid-DNA empfiehlt [118]. Die Eignung einer solchen SEC zur simultanen Abtrennung von genomischer DNA, RNA, Proteinen und Lipopolysacchariden neben der Isolierung der supercoiled Plasmid-Konformation wurde zuvor bereits wiederholt belegt [100, 120]. Die entwickelte SEC-Methode stellt eine Optimierung

hinsichtlich der Trennung zwischen offenkettiger und supercoiled Plasmid-Konformation im Vergleich zu bisher publizierten SEC-Methoden zu diesem Zweck (Horn et al. [100], Ferreira et al. [119], Almeida et al. [120]) unter Verwendung der gleichen stationären Phase dar, die auf die Reduktion der Flussgeschwindigkeit sowie des Probenvolumens in Bezug zum Volumen der stationären Phase sowie auf eine schmalere Probenstartzone durch einen größeren Säulenquerschnitt zurückgeführt wird. Das vorgestellte Protokoll zur Herstellung und Isolierung von Minicircle-DNA wurde erfolgreich für Minicircle von 1,5 bis 4,5 kbp Größe getestet und bietet sich insbesondere zur Herstellung zahlreicher verschiedener Minicircle-Konstrukte (z. B. zu Forschungszwecken) an, die ansonsten mittels kommerzieller Kits oder in Auftragsherstellung wesentlich kostenintensiver wäre. Das ist auch der größte Nachteil der Minicircle-Technologie, sie ist aufwändig und teuer, bei relativ geringen Ausbeuten.

Diese Einschränkung wurde von NTC mit der Entwicklung der Nanoplasmide [86] sowie eines hocheffizienten Prozesses zu ihrer Herstellung [87] adressiert, wobei „nano“ als Marketingbegriff im Sinne einer Kooperation mit dem bekannteren Minicircle-Konzept angesehen werden muss, die tatsächliche Größe beider Plasmide ist vergleichbar. Bei Nanoplasmiden wurde das bakterielle Rückgrat (meist 1,5 bis 2 kbp) auf ein Minimum (< 500 bp) reduziert und die Selektion über die Levansucrase/RNA_{out}-Technologie anstelle einer Antibiotikumresistenz realisiert. Die Vorteile eines Minicircle dürften somit auch weitestgehend auf ein Nanoplasmid zutreffen. Die Feststellung einer überlegenen TE der Nanoplasmide ist vor dem Hintergrund ihres optimierten chimären CMV-HTLV-1-Promotors (inkl. β -Globin-Intron) mit deutlich gesteigerter Transgen-Expression, verglichen mit konventionellem CMV-Promotor, zu betrachten [86]. Bisher kamen Nanoplasmide v. a. zur Verbesserung von DNA-Impfstoffen in Betracht [86, 125]. Hinsichtlich möglicher zukünftiger Anwendungen könnten die Vorteile der Nanoplasmide (größere TE und geringere Immunogenität) bei gentherapeutischen Ansätzen zum Tragen kommen, wenn auf virale Vektoren verzichtet werden soll. Außerdem können sie für alle Prozesse verwendet werden, für die heute noch klassische Plasmide eingesetzt werden, insbesondere, um den Umgang mit Antibiotikaresistenzen zu vermeiden, z. B. bei der Herstellung viraler Vektoren oder therapeutischer mRNA.

Hinsichtlich einer beabsichtigten therapeutischen Verwendung optimierter Plasmid-DNA ist die Nanoplasmid- der Minicircle-Technologie vor allem aus Gründen der Wirtschaftlichkeit überlegen. Das Herstellungsverfahren von NTC ist einfach skalierbar, antibiotikafrei, GMP-konform und unschlagbar kosteneffizient.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Nanoplasמידe, ausgestattet mit einem Suizidgen zur Tumorthherapie, im Mausmodell erprobt. Der Einsatz in Form von zielgerichteten Nanoplexen (durch Komplexierung mit Peptid Y) führte zu verzögertem Tumorwachstum. Der Unterschied zur Kontrollgruppe war jedoch weder ohne noch mit AG1856 (90 µg) als Transfektionsverstärker signifikant [69]. Anders als bei einem früheren Versuch mit klassischem Plasmid in gleicher Dosierung (30 µg) und SO1861 als Transfektionsverstärker (30 µg), bei dem die Versuchsgruppe, die die Kombinationstherapie erhielt, signifikant geringeres Tumorwachstum in Bezug zur Placebogruppe zeigte [91]. Sicherlich ist der Grund für die unterschiedliche Wirksamkeit der Kombinationstherapie aus Nanoplexen (aus Plasmid-DNA mit Suizidgen und Peptid Y) und Saponin als Verstärker des „Endosomal Escape“ in diesen In-vivo-Studien nicht in der verwendeten DNA zu suchen. So könnte die bemerkenswert kleine Varianz der Tumorgröße in der Versuchsgruppe, die nur Nanoplasמיד-Nanoplexe erhielt stattdessen sogar ein Hinweis für eine größere Wirksamkeit aufgrund der verwendeten DNA sein. Dass die Kombination dieser Partikel mit AG1856 nur moderat wirksamer war, anders als im Versuch mit SO1861, könnte auf unterschiedliche Eigenschaften der verwendeten Saponine zurückzuführen sein oder einfach auf den Umstand, dass AG1856 in dreimal größerer Dosis eingesetzt wurde, was zwar als nicht toxisch bewertet wurde, sich jedoch möglicherweise negativ statt positiv auf den beabsichtigten Effekt der Transfektionsverstärkung auswirkte. Schließlich ist weder die Pharmakokinetik dieser Saponine noch der genaue Wirkungsmechanismus, der dem durch sie induzierten „Endosomal Escape“ zu Grunde liegt, bekannt. Durch ein Einkomponentensystem, d.h. die Inkorporation des Saponins in die Nanopartikel ließe sich jedoch das Problem unterschiedlicher Pharmakokinetik der bis dato einzeln mit Zeitabstand auf verschiedenen Routen applizierten Komponenten (Saponin s.c., Nanoplexe 1 h später i.v.) umgehen.

Die große Bedeutung einer Optimierung der Nukleinsäure-Komponente von Gentransfer-Systemen wird noch stärker bei RNA-Therapeutika deutlich. Chemische Modifikationen der Phosphatgruppe, Ribose oder Base der verwendeten Nukleotide tragen entscheidend zur Erhöhung der metabolischen Stabilität und der Wirksamkeit von siRNA-Therapeutika bei [126]. Die Verwendung modifizierter Nucleoside (Pseudouridin anstelle von Uridin) zur Reduktion der Immunantwort beim Einsatz von mRNA durch Katalin Karikó und Drew Weissman [127] war eine entscheidende Voraussetzung für die hohe Wirksamkeit der zu Beginn der COVID-19-Pandemie entwickelten mRNA-Impfstoffe der Unternehmen Moderna (Spikevax®) und Biontech (Comirnaty®). Curevac verzichtete bei seinem Impfstoffkandidaten auf diese Modifikationen, konnte daher aufgrund direkter Immunogenität der mRNA nur eine kleinere Dosis einsetzen und erreichte letztlich nur knapp 50 % Wirksamkeit in klinischen Studien gegenüber > 90 % bei der Konkurrenz.

Lipidbasierte Gentransfer-Systeme

Die Lipofektion stellt eine der bedeutendsten Möglichkeiten zum nicht-viralen Transfer von Nukleinsäuren (DNA oder RNA) in Zielzellen dar. Seit 1987 bekannt, als Felgner et al. Plasmid-DNA mit DOTMA/DOPE (1:1)-Liposomen komplexierten und dann erfolgreich zur Transfektion verschiedener Zelllinien verwendeten [103], wurde von Anfang an eine Kombination aus DOTMA, dem kationischen Lipid für die Nukleinsäurekomplexierung, mit DOPE, einem „Helferlipid“ zur Steigerung der TE eingesetzt. Später wurde erkannt, dass DOPE durch seine Eigenschaft bei niedrigem pH-Wert Non-Bilayer-Strukturen auszubilden (H_{II} -Phase) die Freisetzung der Nukleinsäure aus den Endosomen durch partielle Disruption der Endosomenmembran erleichtert [58]. Einschränkend ist allerdings die gegebene Toxizität der kationischen Lipide. So beschränkt sich z. B. die Anwendung des bekannten und sehr effizienten kommerziellen Produkts „Lipofectamine“ auf die Lipofektion von Zellen zu Forschungszwecken. Im Rahmen dieser Arbeit wurden anfangs DOTAP-Lipoplexe im N/P-Verhältnis 6 hergestellt und in der Zellkultur verwendet, was deutlich sichtbare toxische Effekte auf die Zellen zur Folge hatte. Mit dem darauffolgend angewandten N/P-Verhältnis von 3 hatten die Lipoplexe keine sichtbaren toxischen Effekte. Grundsätzlich ist die Toxizität von DOTAP demnach dosisabhängig. So scheiterten erfolgreiche *In-vivo*-Lipofektionen auch nicht aufgrund von Toxizität, sondern wegen unzureichender Wirksamkeit. Während Lipoplexe mit kationischen Lipiden wie DOTMA oder DOTAP *in vitro* eine hohe TE aufweisen, insbesondere in Kombination mit DOPE, zeigen v. a. DOPE-haltige Lipoplexe *in vivo* eine stark reduzierte TE. Der gleiche Effekt wurde *in vitro* bei größerem Serumanteil im Medium festgestellt. Generell sind die Lipoplexe deutlich positiv geladen, was zur Adsorption negativ geladener Serumproteine führt, die auch die Funktion einer Opsonierung mit darauffolgender Clearance der Lipoplexe durch das retikuloendotheliale System (RES) erfüllen [50]. In einigen Studien wurden größere TE *in vivo* bzw. *in vitro* (mit Serum) festgestellt, wenn Cholesterol anstelle von DOPE als Helferlipid verwendet wurde [50]. In dem Zusammenhang wurde auch eine geringere Bindung von Serumbestandteilen bei Verwendung von Cholesterol und dadurch eine verlängerte *in vivo* Zirkulation postuliert [128]. Im Gegensatz dazu konnte in einer *in vivo* Untersuchung durch Song et al. kein Vorteil durch Cholesterol als Helferlipid in DOTAP- oder DOTMA- Lipoplexen festgestellt werden, während die Verwendung von DOPE abermals zur Reduktion der TE führte [129]. Nachdem Tandia et al. 2003 eine Bindung an Lipoproteine für den *in vivo* Wirksamkeitsverlust von Lipoplexen verantwortlich machen konnten [130], belegten sie in einer Publikation aus 2005 wie die Involvierung von DOPE als „Aktivator“ des zu Grunde liegenden „Lipidmischens“ zwischen Lipoplexen und Lipoproteinen den Wirksamkeitsverlust der Lipoplexe zusätzlich verstärkt [131].

Zusammenfassend kann man schlussfolgern, dass Lipoplexe aus kationischen Lipiden weniger geeignet für *in vivo* Anwendungen sind.

Lipid-Nanopartikel (LNP) sind dagegen auch *in vivo* wirksam, wie ihre Verwendung als Gentransfer-Vehikel in mRNA-Impfstoffen und siRNA-Therapeutika bereits in der Praxis beweist. Ausschlaggebend dafür ist das neutrale Zetapotential der Partikel durch Verwendung ionisierbarer Aminolipide mit optimiertem pKa-Wert und die Abschirmung durch einen PEG-Schild, was zu verlängerter systemischer Zirkulation ohne frühzeitige Clearance durch das retikuloendotheliale System führt. Dadurch haben die Partikel länger Gelegenheit auf ihre Zielzellen zu stoßen. Für die bemerkenswerte Wirksamkeit der LNP in Verbindung mit siRNA zum „Gene-Silencing“ in Hepatozyten, wofür sie anfänglich entwickelt wurden, ist außerdem ein unbeabsichtigter „Targeting-Effekt“ verantwortlich, der erst im Nachhinein aufgeklärt wurde. LNP binden an Apolipoprotein E, wodurch eine Rezeptor-vermittelte Endozytose über entsprechende LDL-Rezeptoren ermöglicht wird [60]. Deswegen kann in Hepatozyten mit einer Dosis von nur 0,005 mg siRNA/kg KG (Maus) die Expression von Genen unterbunden werden („Gene-Silencing“) [132]. Andere Zelltypen verfügen über eine geringere Dichte an LDL-Rezeptoren, können aufgrund des EPR-Effekts und der gesteigerten Zirkulationsdauer aber dennoch erreicht werden. Allerdings wäre eine 100-mal größere Dosis nötig als bei Hepatozyten, um ein „Gene-Silencing“ z. B. in Makrophagen, Osteozyten oder Tumorzellen zu erreichen [57]. Ein Ansatzpunkt zur Erhöhung der Wirksamkeit in diesen Zellen wäre die Steigerung des „Endosomal Escape“, also der Freisetzung der therapeutischen Nukleinsäure aus den Endosomen in das Zytosol. Denn obwohl die ionisierbaren Lipide in den LNP bereits einen „Endosomal Escape“ bewirken [56, 133], werden trotzdem nur 1-2 % der in Form von LNP endozytierten siRNA in das Zytosol freigesetzt [55], während ca. 2/3 unter maßgeblicher Beteiligung von NPC1 (Niemann-Pick C1) aus späten Endosomen/Lysomen exozytiert werden [134].

Endosomal-Escape-Enhancer

Mit dieser Arbeit sollte die Möglichkeit untersucht werden, AG1856 als bekannten „Endosomal Escape Enhancer“ in lipidbasierte Gentransfer-Systeme (Lipoplexe und Lipid-Nanopartikel) zu integrieren. Das bidesmosidische Triterpensaponin AG1856 wurde dafür zunächst aus den Samen von *Agrostemma githago* L. mit einer Ausbeute von 0,23 % isoliert. Wie sich während der praktischen Arbeit herausstellte, ist AG1856 aufgrund der zahlreichen Zucker im Molekül hygroskopisch und neigt mit der Zeit (Lagerung als Lyophilisat bei -20 °C; gelegentliche Entnahme) zur Degradation in Form des Verlusts von Acetylgruppen, in geringem Ausmaß entstand sogar das Monodesmosid (Esterspaltung an C-28). Auch gewissenhaftes Temperieren des Lyophilisat-Gefäßes auf Raumtemperatur vor dem Öffnen konnte dies nicht verhindern. Daher bietet sich (wie so oft) das Arbeiten mit Aliquoten an. Nach Ergebnissen von Fabian Bülow ist die Hydrolyse von AG1856 stark abhängig vom pH-Wert. Während es in einem Puffer mit pH 4 längere Zeit stabil war, beschleunigte sich der Abbau ab pH > 6 rasant. AG1856 ist in EtOH abs. gut löslich, während zum Lösen ähnlicher Saponine in Alkohol stets ein Teil Wasser nötig ist. Die Stabilität scheint gelöst in EtOH (Lagerung bei -20 °C) größer zu sein als in gefriergetrockneter Form. Der Grund für die

Löslichkeit in purem Ethanol ist in der stärkeren Acetylierung von AG1856 z. B. im Vergleich zu SO1861 zu sehen. SO1861 („Sapofectosid“ [73]) aus der Wurzel von *Saponaria officinalis* war nach Analyse von Sama et al. eines der wirksamsten untersuchten Bidesmoside hinsichtlich Verstärkung der Transfektion [71]. Simko Sama erforschte im Rahmen seiner Promotion v. a. den transfektionsverstärkenden Effekt in Kombination mit Peptid-Nanoplexen (K16 oder K16-Derivate) im Zweikomponentensystem (Saponinzugabe mit dem Medium). Der Effekt des Saponins als Transfektionsverstärker in der Kombination mit Peptid-Nanoplexen ist beeindruckend, insbesondere bei Neuro-2A-Zellen [73], was auch bei den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit auffiel, wenn K16-Nanoplexe+AG1856 als Vergleich mitgeführt wurden. Über die Ursachen für die größere Empfänglichkeit dieser Zelllinie für eine Transfektion mit der genannten Kombination kann nur spekuliert werden, aber möglicherweise würde ihre Erforschung Erkenntnisse über den Wirkungsmechanismus des „Endosomal Escape“ durch die Bidesmoside und/oder die Art ihrer Aufnahme in die Zellen liefern. Es könnte auch die Endozytose der Partikel durch das Saponin beeinflusst werden, wie bereits für die Kombination mit Saporin [66] sowie zielgerichtetem Saporin (Fusionsprotein aus Saporin-3 und EGF) nachgewiesen [67]. Wechselwirkungen mit speziellen Glykolipiden (Ganglioside) oder Sphingomyelin, die in Neuronen in größeren Mengen vorkommen oder andere Besonderheiten in der Membranzusammensetzung könnten dabei beispielsweise eine Rolle spielen.

Einfluss von SO1861 und AG1856 auf Lipoplexe

Simko Sama testete auch den Einfluss von SO1861 auf Lipoplexe aus DOTMA/DOPE (1:1) - Liposomen. Die gebildeten Lipoplexe waren sehr groß (> 500 nm) und inhomogen (PDI > 0,5). Die Kombination mit SO1861 resultierte *in vitro* zwar dennoch in einer gesteigerten TE, gleichzeitig führte sie aber zur Freigabe von DNA aus den Lipoplexen wie der Agarose-Retentions-Assay offenbarte, woraufhin Sama seine Konzentration auf die Kombination aus Nanoplexen und Saponin lenkte. Der Grund für die schlechten Größenparameter und Komplexierungseffizienzen der von Sama hergestellten Lipoplexe [73] ist im verwendeten N/P-Verhältnis zu suchen. Die DOTMA/DOPE (1:1) -Liposomen wurden mit DNA im Masseverhältnis 4:1 gemischt. Da nur DOTMA für die DNA-Komplexierung eine Rolle spielt, entspricht dies einem N/P-Verhältnis von 1, empfohlen wird aber 3 (Gebrauchsanweisung für DOTAP-Liposomen-Transfektionsreagenz von Carl Roth). Dies entspräche 6 µg kationisches Lipid auf 1 µg DNA (Avanti Polar Lipids empfiehlt allgemein 10 µg kationisches Lipid zu 1 µg DNA).

In der vorliegenden Arbeit wurden Lipoplexe aus DOTAP-Liposomen und Plasmid-DNA in einem N/P-Verhältnis von 3 hergestellt, deren TE in der Zelllinie Hepa 1-6 und stärker noch in N2A-Zellen durch Kombination mit AG1856 gesteigert wurde, während sie in ECV-304-Zellen unverändert blieb. Gleichzeitig wurde der Einfluss einer Sterilfiltration (0,22 µm) der präformulierten Liposomen vor der Formulierung der Lipoplexe untersucht. Die TE reiner DOTAP-Lipoplexe wurde dadurch

deutlich reduziert, obwohl die Partikelgröße der resultierenden Lipoplexe kleiner und homogener wurde. Vermutlich wurden bei der Filtration größere Vesikel zerkleinert. Von größeren Vesikeln ist jedoch bekannt, dass die aus ihnen gebildeten Lipoplexe eine größere TE aufweisen [135]. Die zusätzliche Verwendung von Cholesterol in den präformulierten Liposomen DOTAP/Chol (1:1) hatte keinen nennenswerten Effekt auf die TE der Lipoplexe, die Verwendung von DOTAP/POPC/SM (1:0,5:0,5) sogar einen leicht negativen. Letztgenannte Formulierung wurde aufgrund einer Publikation von Korchowiec et al. aus 2022 untersucht, die nahelegte, es könnte eine teilweise Einlagerung eines isolierten sehr ähnlichen Saponins (GOTCAB = „glucuronide oleananetype triterpenoid carboxylic acid 3,28-bidesmoside“) aus der Wurzel von *Gypsophila paniculata* in Monolayer aus SM/POPC stattfinden, die durch Anwesenheit von Cholesterol infolge von dessen Interaktion mit SM gehemmt wird [136]. Deswegen sollten in der vorliegenden Arbeit zusätzlich SM/POPC-Liposomen mittels DSC auf die Integration von AG1856 untersucht werden. Allerdings wurde der Peak, der den Phasenübergang der verwendeten Modell-Liposomen markierte, schon bei geringem POPC-Anteil (20 mol%) so flach (T_c POPC -2 °C), dass eine Auswertung bei weiterer Erhöhung (Korchowiec et al. nutzten eine 1:1 Mischung) unrealistisch schien. Stattdessen wurden die Versuche mit SM/SOPC in verschiedenen Verhältnissen durchgeführt, was aufgrund der größeren T_c von SOPC (6 °C) zu besser auswertbaren Peaks führte. AG1856 bewirkte in einer Konzentration von 50 µg/mL keine Signalverschiebung bei Verwendung von Modell-Liposomen aus SM/SOPC (1:1), weswegen nicht von einer Integration in die Liposomenmembran (Bilayer) ausgegangen werden kann. Möglicherweise macht es für die Integration einen Unterschied, dass Korchowiec et al. sie an einem Monolayer untersuchten. Eine Depletion von Membran-Cholesterol konnte in den DSC-Untersuchungen nur für Digitonin nachgewiesen werden und entspricht dessen bekanntem toxischen Prinzip [121, 122].

DLS-Analysen zum Einfluss von AG1856 auf DOTAP-Lipoplexe legen einen partikelstabilisierenden Effekt nahe (Verringerung von Partikelgröße und PDI), der durch das Ergebnis eines Ultrafiltrationsexperiments untermauert wurde (AG1856 bewahrte die Lipoplexe teilweise vor dem Verlust ihrer Transfektionskapazität durch die Zentrifugation). Dazu sei angemerkt, dass Lipoplexe empfindlicher gegenüber mechanischen Belastungen sind als Polyplexe. Im Gegensatz dazu stieg der PDI der K16-Nanoplexe durch Saponinzugabe leicht an. Das Zetapotential wurde jeweils nur wenig beeinflusst. Inwieweit aber solche Ergebnisse auf die Verhältnisse in serumhaltigen Zellkulturmedium übertragbar sind, ist fraglich. Selbst wenn AG1856 DOTAP-Lipoplexe stabilisiert, bleibt offen, ob die Adsorption des Saponins auch *in vivo* erhalten bliebe und ob die adsorbierte Saponinmenge für die Steigerung des „Endosomal Escape“ ausreichend wäre. Schließlich wurde in dem Ultrafiltrationsexperiment die TE im Vergleich zu unfiltrierten DOTAP-Lipoplexen nur zu einem großen Teil erhalten, nicht gesteigert.

DSC-Messungen zum Nachweis der Integration in Lipidmembranen

Mit dem Ziel, die Integration von AG1856 in Lipidmembranen zu belegen, wurden DSC-Messungen an Modell-Liposomen durchgeführt. Weng et al. demonstrierten auf diese Weise eine Verschiebung der T_c von DPPC-Liposomen durch Zugabe von SO1861 (5 $\mu\text{g/mL}$), die als Folge einer Integration des Saponins in die Membran interpretiert wurde [137]. Merkwürdig an diesen Ergebnissen ist, dass in den gezeigten DSC-Thermogrammen die T_c der DPPC-Liposomen deutlich unter 40 °C liegt. Die T_c von DPPC-Liposomen sollte aber bei etwa 41,5 °C liegen. Dies stellt eine große Abweichung dar und lässt die Ergebnisse insgesamt invalide erscheinen. Als Ursache dafür kommt die sehr lange Ultraschallbehandlung (3 h) der Liposomen in Betracht. Es ist bekannt, dass eine übermäßige Einwirkung von Ultraschall zur Degradation von Phospholipiden führt [138]. DSC ist die geeignete Methode, um solche „Verunreinigungen“ zu detektieren. In diesem Fall kann man annehmen, dass nur durch die Abbauprodukte von DPPC eine Interaktion mit dem Saponin bewirkt wurde. Denn der Einfluss von AG1856 in verschiedenen Konzentrationen auf DPPC-Liposomen wurde für die vorliegende Arbeit mittels DSC extensiv untersucht. Die Ergebnisse zeigten stets keine Verschiebung der T_c , also keine Integration des Saponins in die Modell-Membranen. Ebenso konnte keine Integration in DOTAP/DPPC-Liposomen nachgewiesen werden. Es wurde auch untersucht, ob eine Cholesterol-Beimischung Einfluss auf die Interaktion von PC-Liposomen mit AG1856 oder SO1861 haben würde. Dabei konnten maximal 10 % Cholesterol verwendet werden, weil der Phasenübergang bei größerem Cholesterolanteil zunehmend flacher wird/verschwindet. Tatsächlich führte die Zugabe von SO1861 (100 $\mu\text{g/mL}$) zu extrudierten Liposomen aus DPPC/Chol (9:1) zu einer leichten Erhöhung der T_c . Mit AG1856 war der Effekt noch deutlicher, allerdings wurden dabei Ultraschall-prozessierte Liposomen verwendet. Zusätzlich war eine sehr schwache Verunreinigung detektierbar, deren Einfluss dennoch durch Wiederholung des Experiments mit frischen Lipiden ausgeschlossen werden sollte. Bemerkenswert ist auch, dass es nach AG1856-Zugabe zu einer Trübung kam.

Zusammenfassend kann von einer Interaktion zwischen den getesteten EEE und cholesterolhaltigen PC-Membranen ausgegangen werden, die auch durch frühere Veröffentlichungen belegt ist [139, 140]. Noch ausgeprägter scheint die Interaktion zwischen Monodesmosiden, wie sie nach Esterspaltung an C-28 auch aus AG1856 oder SO1861 entstehen könnten, mit cholesterolhaltigen Membranen zu sein, die nach Lorent et al. auch bei kleiner Saponinkonzentration zur Formation cholesterolreicher Domänen und mit der Zeit zur Permeation führt [141], eine plausible Hypothese zum Wirkungsmechanismus des „Endosomal Escape“ durch Saponine.

Als Komponente in Lipoplexen führte Cholesterol nicht zu einer TE-Steigerung durch eventuell verstärkte Adsorption/Inkorporation von AG1856.

Einfluss von AG1856 auf LNP

Versuche, AG1856 in sehr geringer Menge (entsprechend einer Endkonzentration im Well von 0,21 µg/mL) während der Formulierung in die LNP zu inkorporieren führten trotz signifikant schlechterer Partikelparameter (größer und inhomogener bei negativerem Zetapotential) zu kaum geringerer TE. Im Kontrast dazu führte die Zugabe von AG1856 (jedoch entsprechend einer Endkonzentration von 2 µg/mL) zu bereits formulierten LNP bei geringer Beeinflussung der Partikeleigenschaften, außer einer vergleichbaren Vergrößerung des Zetapotentials (negativer), zu einem vollständigen Wirksamkeitsverlust. Eine Erklärung dafür könnte der für LNP bekannte Aufnahmemechanismus über LDL-Rezeptoren nach Bindung an Apolipoprotein E (Apo E) sein [60]. Scheinbar schirmte AG1856 die LNP vor einer Bindung von ApoE ab.

Lipid-AG1856-Konjugate

Zwei Lipid-AG1856-Konjugate wurden erfolgreich synthetisiert und isoliert: DSKA (DSPE-S-KMUH-AG1856) ohne Pegylierung und DPSKA (DSPE-PEG-S-KMUH-AG1856). Generell vollzog sich die Konjugationsreaktion mit AG1856 sehr langsam, wobei die Pegylierung offensichtlich eine zusätzliche Hemmung bewirkte. Möglicherweise wäre die Reaktionsgeschwindigkeit in reinem Chloroform größer gewesen, was jedoch aufgrund der schlechten Löslichkeit von AG1856 in Chloroform keine Option war. Auch eine Form regelmäßigen oder kontinuierlichen Durchmischens, moderate Temperaturerhöhung, größere Konzentrationen oder einfach ein größerer Überschuss an Lipid-Konjugat könnten die Reaktion vermutlich beschleunigen.

DSKA eluierte mehrheitlich in zwei Fraktionen (Ausbeute 81,5 %), während DPSKA über mehrere Fraktionen hinweg eluierte, die größte Menge in bester Reinheit mit der 5. Fraktion. Damit wurden 26,2 % als Ausbeute für DPSKA ermittelt. Grund für die geringe Ausbeute ist z. T. das Vorhandensein des Produkts in den anderen Fraktionen. Da jedoch auch insgesamt nur 51,9 % der eingesetzten Edukte wiedererhalten wurden, kann dies nicht die alleinige Erklärung sein. Es wäre denkbar, dass ein größerer Teil der Edukte/des Produkts aufgrund der größeren Hydrophilie, begründet durch das PEG, stärker an das Kieselgel adsorbierte und mit dem verwendeten Lösungsmittelgradienten nicht eluiert wurde. Natürlich ist bei der geringen Ausbeute auch zu beachten, dass das AG1856 in der Synthese von DPSKA nicht vollständig umgesetzt wurde (wie in der Berechnung der Ausbeute angenommen).

Lipid-AG1856-Konjugate in Lipoplexen und LNP

Die Konjugate wurden in DOTAP-Lipoplexe bzw. LNP integriert. Die Zugabe von DSKA bei der Formulierung von DOTAP/DPPC-Liposomen führte im DSC-Thermogramm zu einer Erhöhung der T_c, was für eine Integration des Konjugats in Lipoplexe spricht. Die DLS-Messung lieferte Hinweise

dafür, dass die Mischung von DOTAP und DSKA (100:1) nicht zu normalen Liposomen führte (die Messung ergab sehr große und inhomogene Partikel), die Mischung von DOTAP und DPSKA scheinbar schon ($77,1 \pm 1,5$ nm). Die Lipoplexe, die aus DOTAP/Konjugat-Liposomen formuliert wurden, zeigten umso schlechtere Größenparameter und stets niedrigere TE, verglichen mit DOTAP-Lipoplexen (außer bei N2A-Zellen), je mehr Konjugat verwendet wurde. Die Beimischung von Cholesterol und SOPC konnte die Lipoplexe zwar stabilisieren, wirkte sich jedoch nicht förderlich auf die TE aus. Die vollständige Komplexbildung der DNA blieb von den Konjugaten unberührt. Zusammen mit den sogar schwach erhöhten Zetapotentialen infolge der Konjugatintegration zeichnen diese Ergebnisse dennoch das Bild einer durch das Konjugat gestörten Lipoplexbildung. Scheinbar wurde das Konjugat eher im Inneren der Lipoplexe komplexiert (das Saponin trägt eine negative Ladung). In Kombination mit K16-Nanoplexen führte DSKA nur bei den HEK-293FT-Zellen zu geringer TE-Steigerung. Dies deutet darauf hin, dass die DSKA-Liposomen entweder schlecht endozytiert werden oder das Saponin in den Endosomen nicht freigesetzt wird.

Die Zugabe der Konjugate bei der Formulierung von LNP störte massiv die Partikelassemblierung, insbesondere bei Verwendung des pegylierten Konjugats DPSKA. Dies war wiederum an großen inhomogenen Partikeln zu erkennen und korrelierte mit geringer TE. Das negativere Zetapotential der LNP mit Konjugat kann als Beleg für die Integration des Konjugats in die LNP-Oberfläche gelten.

Das sowohl Lipoplexe als auch LNP mit integriertem Konjugat deutlich reduzierte Transfektionseffizienzen zeigten, könnte neben der gestörten Partikelbildung mit der überraschend großen Stabilität der Konjugate im Zusammenspiel mit ihrem amphiphilen Charakter erklärt werden. Theoretisch sollte die Hydrazonbindung zwischen Linker und Saponin in den Konjugaten säurelabil sein. Wie gezeigt werden konnte, ist sie jedoch stabiler als erwartet. Nachdem ein Aufheizen auf 92 °C während einer DSC-Messung kaum Hydrolyse bewirkte, war DSKA erst unter harschen Bedingungen (60 min bei 40 °C , pH 1,26) zu ca. 50 % hydrolysiert (Freisetzung von AG1856). Mizellen aus dem Konjugat PE-KMUH-PEG hatten dagegen bei 37 °C und pH 5,5 nur eine Halbwertszeit von 20 min [117]. Eine ausbleibende Saponinfreisetzung allein hätte lediglich zur Folge, dass die TE nicht gesteigert wird. Das Lipid-Saponin-Konjugat könnte aber Kraft seiner Amphiphilie zur Stabilisierung der Lipid-DNA-Komplexe beitragen und die Freisetzung der DNA notwendige Desintegration der Partikel in den Endosomen behindern, so wie es für größere Anteile des PEG-Lipids bekannt ist [142] – diese Erkenntnis führte zur Verwendung eines PEG-Lipids mit kürzerem Lipid-Anker (PEG-DMG). Andererseits könnte auch die Endozytose der Partikel infolge der Integration der Konjugate reduziert sein, wie zuvor bereits für den Einfluss von AG1856 auf LNP beschrieben. Interessant sind in diesem Zusammenhang Ergebnisse von Gilleron et al. aus 2013, die nahelegen, dass LNP nach initialer Clathrin-vermittelter Endozytose (CME), die LNP-Aufnahme über Makropinozytose triggert, die schließlich den Großteil der LNP-Endozytose ausmacht [55].

Sollte die Integration von AG1856-Konjugat in LNP die Adsorption von LDL unterbinden und damit die LDL-abhängige CME hemmen, wäre eine drastische Reduktion der Transfektionseffizienz durch die gleichsam ausbleibende Makropinozytose logische Konsequenz. Wie auch immer, die beabsichtigte Steigerung der TE durch Integration von Lipid-AG1856-Konjugaten in Lipoplexe oder LNP konnte nicht erreicht werden.

Fazit & Ausblick

Auf Basis der generierten Ergebnisse muss festgestellt werden, dass die beabsichtigte Integration von AG1856 bzw. AG1856-Lipidkonjugaten in lipidbasierte Gentransfer-Systeme zur Steigerung der Transfektionseffizienz wenig Erfolg verspricht. Als Ursache dafür wurden die beiderseits gegebenen amphiphilen Eigenschaften (sowohl des Saponins/Konjugats als auch der Lipide) identifiziert, die ein unüberschaubares Interaktionspotential bedeuten und die Assemblierung der Nanopartikel stören. Auf der Oberfläche von LNP bewirkt AG1856 (adsorbiert oder als Konjugat) mutmaßlich eine reduzierte Endozytose, weil dadurch die Adsorption von Apolipoprotein E unterbunden wird, die ansonsten für die Endozytose von LNP von großer Bedeutung ist. Außerdem scheint das AG1856 sehr stabil in den Konjugaten gebunden zu sein, und nicht wie geplant und für den „Endosomal Escape“ erforderlich im schwach sauren Milieu innerhalb der Endosomen durch Hydrolyse der Hydrazonbindung abgespalten zu werden.

Einzig reine DOTAP-Lipoplexe erfuhren durch die Zugabe von AG1856 eine Partikelstabilisierung sowie eine Steigerung der Transfektionseffizienz. Wie stabil die Adsorption des Saponins ist und ob die adsorbierte Saponinmenge (ohne zusätzliches freies Saponin) zur Steigerung der Transfektionseffizienz ausreicht, könnte Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

Ansonsten erscheint es erfolgversprechender, eine Integration von Saponin in Gentransfer-Systeme mit hydrophilem Charakter zu versuchen, z. B. Peptid-, PAMAM- oder Chitosan-Nanoplexe.

Mit Blick auf die Weiterentwicklung der LNP wäre ein funktionierender „Targeting“-Mechanismus wünschenswert (wie generell bei nicht-viralen Gentransfer-Systemen). Erste Beispiele für Antikörper-gekoppelte LNP gibt es bereits [60, 143]. Die komplexe Zusammensetzung der LNP, verbunden mit dem notwendigen Optimierungsbedarf je nach Anwendung, wird allerdings schon heute negativ bewertet. So gibt es beispielsweise bereits siRNA-Therapeutika zum „Gene-Silencing“ in Hepatozyten, die ohne LNP auskommen, indem die RNA direkt mit einem (meist trimeren) N-Acetylgalactosamin-Liganden (GalNAc) konjugiert wird, der dann an den leberspezifischen Asialoglykoprotein-Rezeptor bindet und so die Endozytose des GalNAc-siRNA-Konjugats bewirkt [144]. Möglicherweise ist nach diesem Vorbild ebenso eine direkte Konjugation von Saponin an die Nukleinsäure möglich.

Publikationsverzeichnis

Artikel in Fachzeitschriften

H. Mitdank, S. Sama, M. Tröger, M. Francesca Testa, M. Ferrarese, D. Balestra, M. Pinotti, A. Weng. An advanced method for the small-scale production of high-quality minicircle DNA – International Journal of Pharmaceutics, 2021.

H. Mitdank, M. Tröger, A. Sonntag, N. A. Shirazi, E. Woith, H. Fuchs, D. Kobelt, W. Walther, A. Weng. Suicide nanoplasmids coding for ribosome-inactivating proteins – European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2022.

Posterbeiträge zu Konferenzen

H. Mitdank, M. Tröger, A. Sonntag, N. A. Shirazi, E. Woith, H. Fuchs, D. Kobelt, W. Walther, A. Weng. Suicide nanoplasmids coding for ribosome-inactivating proteins - Tag der Pharmazie, 2022, Berlin, Deutschland.

H. Mitdank, A. Weng. Minicircles or Nanoplasmids – Does Only Size Matter? - Endoscape Symposium, 2022, Berlin, Deutschland.

Patente

H. Mitdank, S. Sama, A. Weng. **Europäisches Patent 3 838 910** vom 18.12.2019:

„Efficient gene delivery tool with a wide therapeutic margin“ (Freie Universität Berlin)

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist aus Gründen des Datenschutzes nicht in der Online-Version enthalten.

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Professor Melzig und Alexander Weng dafür, dass ich einige Jahre mit maximalen Freiheiten in ihrer Arbeitsgruppe forschen durfte und mich dabei menschlich stets wohl aufgehoben fühlte, wofür ich mich auch bei allen anderen Mitgliedern der AG Melzig/Weng bedanke möchte. Weiterhin gilt mein Dank Simko Sama für seine Vorarbeit auf dem Gebiet der Sapofektion und den ein oder anderen hilfreichen Hinweis in seiner Funktion als Postdoc.

Mein größter Dank geht an Meike Tröger, die freundlicherweise die in den Zellkulturexperimenten verwendete Plasmid-DNA präparierte und mir zur Verfügung stellte. Darüber hinaus danke ich ihr für ihren sehr großen Anteil an der Publikation über die Nanoplasmide, deren Erstautorschaft ihr mehr zusteht als mir. Ich danke ihr für die perfekte Organisation des Zellkulturlabors und für ihre allgemeine Hilfsbereitschaft. Unsere gemeinsamen Dienstreisen werden mir in guter Erinnerung bleiben.

Für die Durchführung der MALDI-MS-Messungen bedanke ich mich bei Chris Weise und Benny Hempel. Ich danke auch Eleonore Christmann und Fabian Schumacher für die zahlreichen LC-MS-Messungen. Ich danke zudem Alexander Sonntag und Eric Woith für ihren Anteil am Nanoplasmid-Paper, genau wie Dennis Kobelt, Ole Daberkow und Professor Wolfgang Walther von der EPO GmbH für die Durchführung des Tierversuchs. Ich danke Nima Amini Shirazi und seinen Wahlpflichtfachstudenten für die Etablierung des optimalen Fließmittels für die Saponin-DC. Ich danke Professor Kleuser für die Möglichkeit, am CytoFLEX zu messen, genau wie Sven Staufenbiel von der pharmazeutischen Technologie für die Möglichkeit, den dortigen Zetasizer Nano zu nutzen. Ich möchte auch Conny Görick danken für ihre zuverlässige Verfügbarkeit zur Lösung kleiner und großer Probleme an HPLC-Anlagen und anderem Labor-Equipment. Ich danke dem Glasbläser der FU Berlin Dirk Busold für den Bau der 2 m langen Glassäule. Ich möchte herzlich Stefan Böttger danken für die angenehme Zusammenarbeit in der Lehre und die vielen interessanten Gespräche auf ungezählten gemeinsamen Pendelfahrten. Außerdem danke ich ihm und Nils Wadehn dafür, dass sie ihre fundamentale Begeisterung für die Pflanzen mit mir geteilt haben. Stefan Böttger und Louisa Schlaak danke ich besonders für das Rezensieren meiner Dissertation, das mir sehr geholfen hat. Louisa möchte ich auch für das angenehme gemeinsame Arbeiten in unserem Labor und den regelmäßigen Gedankenaustausch danken. Nicht vergessen werden sollen der Masterstudent Daniel Bergmann und die Erasmus-Praktikantin Pinelopi Argyropoulou sowie meine zahlreichen Wahlpflichtfachpraktikanten Jan Kutzki, Julie Posledni, Jennifer Boldt, Alina Jasmin Carstensen, David Grünwald, Ebru Gönültas, Marijan Czygan, Lena Sophie Bußmann, Isabella Hoppe, Vanessa Ehrentraut, Abby Schmidt, Marie Köhn von Wedelstedt, Alexander Sonntag und Fabian Bülow, von denen die drei letztgenannten zudem als Diplomandin bzw. Masteranden wiederkehrten. Ich danke ihnen allen für ihre Unterstützung.

Literaturverzeichnis

1. Gensthaler, B.M., Gießen, H., Pharmazeutische Forschung - Interdisziplinär und facettenreich, Pharmazeutische Zeitung 41 (2016).
2. Lagasse, H.A., Alexaki, A., Simhadri, V.L., Katagiri, N.H., Jankowski, W., Sauna, Z.E., Kimchi-Sarfaty, C., Recent advances in (therapeutic protein) drug development, F1000Res. 6 (2017) S. 113.
3. U.S. Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products, online (2019).
4. Wissenschaftliche Dienste (Bundestag), Regelungen zu genbasierten Impfstoffen, Aktenzeichen: WD 9 - 3000 - 116/20 (2021).
5. Die forschenden Pharmaunternehmen (vfa-bio) / Boston Consulting Group (BCG), BIOTECH-REPORT 2022, online.
6. Die forschenden Pharmaunternehmen (vfa-bio), Innovationsbilanz 2022, online, PRESSEMITTEILUNG 038/2022.
7. Paul-Ehrlich-Institut, ATMP, <https://www.pei.de/DE/Arzneimittel/atmp/atmp-node.html> (2022).
8. Wang, D., Wang, K., Cai, Y., An overview of development in gene therapeutics in China, Gene Ther. 27 (2020) S. 338-348.
9. EMA, Glybera Produktinformation, https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/glybera-epar-product-information_de.pdf (2022).
10. DAZ, Glybera-Therapie kostet 1,1 Millionen Euro, <https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/news/artikel/2014/11/28/glybera-therapie-kostet-1-1-millionen-euro> (2014).
11. Europäische Kommission, Rare diseases, https://health.ec.europa.eu/non-communicable-diseases/steering-group/rare-diseases_en (2022).
12. Cyranoski, D., Ledford, H., Genome-edited baby claim provokes international outcry, Nature 563 (2018) S. 607-608.
13. Paul-Ehrlich-Institut, Genterapeutika, <https://www.pei.de/DE/Arzneimittel/atmp/genterapeutika/genterapeutika-node.html> (2022).
14. Szybalska, E.H., Szybalski, W., Genetics of human cell line. IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 48 (1962) S. 2026-2034.
15. Ginn, S.L., Amaya, A.K., Alexander, I.E., Edelstein, M., Abedi, M.R., Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update, J. Gene Med. 20 (2018) S. e3015.
16. Rosenberg, S.A., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R.A., Moen, R., Karson, E.M., Lotze, M.T., Yang, J.C., Topalian, S.L., et al., Gene transfer into humans-immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction, N. Engl. J. Med. 323 (1990) S. 570-578.
17. Blaese, R.M., Culver, K.W., Miller, A.D., Carter, C.S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., Greenblatt, J.J., Rosenberg, S.A., Klein, H., Berger, M., Mullen, C.A., Ramsey, W.J., Muul, L., Morgan, R.A., Anderson, W.F., T lymphocyte-

- directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years, *Science* 270 (1995) S. 475-480.
18. Russell, C.J., Acid-induced membrane fusion by the hemagglutinin protein and its role in influenza virus biology, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 385 (2014) S. 93-116.
 19. Stephen, S.L., Montini, E., Sivanandam, V.G., Al-Dhalimy, M., Kestler, H.A., Finegold, M., Grompe, M., Kochanek, S., Chromosomal integration of adenoviral vector DNA in vivo, *J. Virol.* 84 (2010) S. 9987-9994.
 20. Naso, M.F., Tomkowicz, B., Perry, W.L., 3rd, Strohl, W.R., Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy, *BioDrugs* 31 (2017) S. 317-334.
 21. Kuzmin, D.A., Shutova, M.V., Johnston, N.R., Smith, O.P., Fedorin, V.V., Kukushkin, Y.S., van der Loo, J.C.M., Johnstone, E.C., The clinical landscape for AAV gene therapies, *Nat. Rev. Drug Discov.* 20 (2021) S. 173-174.
 22. Kassiotis, G., Stoye, J.P., Making a virtue of necessity: the pleiotropic role of human endogenous retroviruses in cancer, *Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.* 372 (2017).
 23. Buzdin, A.A., Prassolov, V., Garazha, A.V., Friends-Enemies: Endogenous Retroviruses Are Major Transcriptional Regulators of Human DNA, *Front. Chem.* 5 (2017) S. 35.
 24. Meyer, T.J., Rosenkrantz, J.L., Carbone, L., Chavez, S.L., Endogenous Retroviruses: With Us and against Us, *Front. Chem.* 5 (2017) S. 23.
 25. Cavazzana, M., Six, E., Lagresle-Peyrou, C., Andre-Schmutz, I., Hacein-Bey-Abina, S., Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency: Where Do We Stand?, *Hum. Gene Ther.* 27 (2016) S. 108-116.
 26. Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.L., Bousso, P., Deist, F.L., Fischer, A., Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease, *Science* 288 (2000) S. 669-672.
 27. Blanco, E., Izotova, N., Booth, C., Thrasher, A.J., Immune Reconstitution After Gene Therapy Approaches in Patients With X-Linked Severe Combined Immunodeficiency Disease, *Front. Immunol.* 11 (2020) S. 608653.
 28. Deutsche Forschungsgemeinschaft, Entwicklung der Gentherapie, WILEY-VCH (2006).
 29. Shirley, J.L., de Jong, Y.P., Terhorst, C., Herzog, R.W., Immune Responses to Viral Gene Therapy Vectors, *Mol. Ther.* 28 (2020) S. 709-722.
 30. Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., Wivel, N.A., Bagg, A., Gao, G.P., Wilson, J.M., Batshaw, M.L., Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer, *Mol. Genet. Metab.* 80 (2003) S. 148-158.
 31. Arabi, F., Mansouri, V., Ahmadbeigi, N., Gene therapy clinical trials, where do we go? An overview, *Biomed. Pharmacother.* 153 (2022) S. 113324.
 32. Kulkarni, J.A., Myhre, J.L., Chen, S., Tam, Y.Y.C., Danescu, A., Richman, J.M., Cullis, P.R., Design of lipid nanoparticles for in vitro and in vivo delivery of plasmid DNA, *Nanomedicine* 13 (2017) S. 1377-1387.

33. Duguay, B.A., Huang, K.W., Kulka, M., Lipofection of plasmid DNA into human mast cell lines using lipid nanoparticles generated by microfluidic mixing, *J. Leukoc. Biol.* 104 (2018) S. 587-596.
34. Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., Daley, G.Q., Brack, A.S., Collins, J.J., Cowan, C., Schlaeger, T.M., Rossi, D.J., Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA, *Cell Stem Cell* 7 (2010) S. 618-630.
35. Jia, F., Wilson, K.D., Sun, N., Gupta, D.M., Huang, M., Li, Z., Panetta, N.J., Chen, Z.Y., Robbins, R.C., Kay, M.A., Longaker, M.T., Wu, J.C., A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells, *Nat. Methods* 7 (2010) S. 197-199.
36. Lächelt, U., Wagner, E., Nucleic Acid Therapeutics Using Polyplexes: A Journey of 50 Years (and Beyond), *Chem. Rev.* 115 (2015) S. 11043-11078.
37. Jeffs, L.B., Palmer, L.R., Ambegia, E.G., Giesbrecht, C., Ewanick, S., MacLachlan, I., A scalable, extrusion-free method for efficient liposomal encapsulation of plasmid DNA, *Pharm. Res.* 22 (2005) S. 362-372.
38. Vaheri, A., Pagano, J.S., Infectious poliovirus RNA: a sensitive method of assay, *Virology* 27 (1965) S. 434-436.
39. Cao, Y., Tan, Y.F., Wong, Y.S., Liew, M.W.J., Venkatraman, S., Recent Advances in Chitosan-Based Carriers for Gene Delivery, *Marine Drugs* 17 (2019).
40. Huotari, J., Helenius, A., Endosome maturation, *EMBO J.* 30 (2011) S. 3481-500.
41. Luthman, H., Magnusson, G., High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells, *Nucleic Acids Research* 11 (1983) S. 1295-1308.
42. Degors, I.M.S., Wang, C., Rehman, Z.U., Zuhorn, I.S., Carriers Break Barriers in Drug Delivery: Endocytosis and Endosomal Escape of Gene Delivery Vectors, *Accounts of Chemical Research* 52 (2019) S. 1750-1760.
43. Wang, T., Chen, Q., Lu, H., Li, W., Li, Z., Ma, J., Gao, H., Shedding PEG Palisade by Temporal Photostimulation and Intracellular Reducing Milieu for Facilitated Intracellular Trafficking and DNA Release, *Bioconjugate Chemistry* 27 (2016) S. 1949-1957.
44. Rejman, J., Wagenaar, A., Engberts, J.B.F.N., Hoekstra, D., Characterization and transfection properties of lipoplexes stabilized with novel exchangeable polyethylene glycol-lipid conjugates, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1660 (2004) S. 41-52.
45. Moghimi, S.M., Symonds, P., Murray, J.C., Hunter, A.C., Debska, G., Szewczyk, A., A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy, *Molecular Therapy* 11 (2005) S. 990-995.
46. Mukherjee, S.P., Lyng, F.M., Garcia, A., Davoren, M., Byrne, H.J., Mechanistic studies of in vitro cytotoxicity of poly(amidoamine) dendrimers in mammalian cells, *Toxicology and Applied Pharmacology* 248 (2010) S. 259-268.
47. Ahmad, A., Evans, H.M., Ewert, K., George, C.X., Samuel, C.E., Safinya, C.R., New multivalent cationic lipids reveal bell curve for transfection efficiency versus membrane charge density: lipid-DNA complexes for gene delivery, *J. Gene Med.* 7 (2005) S. 739-748.

48. Saito, Y., Kawakami, S., Yabe, Y., Yamashita, F., Hashida, M., Intracellular trafficking is the important process that determines the optimal charge ratio on transfection by galactosylated lipoplex in HEPG2 cells, *Biol. Pharm. Bull.* 29 (2006) S. 1986-1990.
49. Plank, C., Mechtler, K., Szoka, F.C., Jr., Wagner, E., Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery, *Hum. Gene Ther.* 7 (1996) S. 1437-1446.
50. Hoekstra, S.A.D., Cationic lipid-mediated transfection in vitro and in vivo, *Molecular Membrane Biology* 18 (2009) S. 129-143.
51. Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., Mozafari, M.R., Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems, *Pharmaceutics* 10 (2018).
52. Bertrand, N., Leroux, J.C., The journey of a drug-carrier in the body: an anatomophysiological perspective, *J. Control Release* 161 (2012) S. 152-163.
53. Conner, S.D., Schmid, S.L., Regulated portals of entry into the cell, *Nature* 422 (2003) S. 37-44.
54. Rejman, J., Bragonzi, A., Conese, M., Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes, *Mol. Ther.* 12 (2005) S. 468-474.
55. Gilleron, J., Querbes, W., Zeigerer, A., Borodovsky, A., Marsico, G., Schubert, U., Manygoats, K., Seifert, S., Andree, C., Stoter, M., Epstein-Barash, H., Zhang, L., Kotliansky, V., Fitzgerald, K., Fava, E., Bickle, M., Kalaidzidis, Y., Akinc, A., Maier, M., Zerial, M., Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape, *Nat. Biotechnol.* 31 (2013) S. 638-646.
56. Horejs, C., From lipids to lipid nanoparticles to mRNA vaccines, *Nat. Rev. Materials* 6 (2021) S. 1075-1076.
57. Cullis, P.R., Hope, M.J., Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies, *Mol. Ther.* 25 (2017) S. 1467-1475.
58. Hafez, I.M., Maurer, N., Cullis, P.R., On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids, *Gene Ther.* 8 (2001) S. 1188-1196.
59. Kowarz, E., Krutzke, L., Kulp, M., Streb, P., Larghero, P., Reis, J., Bracharz, S., Engler, T., Kochanek, S., Marschalek, R., Vaccine-induced COVID-19 mimicry syndrome, *eLife* 11 (2022).
60. Akinc, A., Querbes, W., De, S., Qin, J., Frank-Kamenetsky, M., Jayaprakash, K.N., Jayaraman, M., Rajeev, K.G., Cantley, W.L., Dorkin, J.R., Butler, J.S., Qin, L., Racie, T., Sprague, A., Fava, E., Zeigerer, A., Hope, M.J., Zerial, M., Sah, D.W., Fitzgerald, K., Tracy, M.A., Manoharan, M., Kotliansky, V., Fougères, A., Maier, M.A., Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms, *Mol. Ther.* 18 (2010) S. 1357-1364.
61. Siepmann, C., Bader, G., Hiller, K., Wray, V., Domke, T., Nimtz, M., New saponins from the seeds of *Agrostemma githago* var. *githago*, *Planta Med.* 64 (1998) S. 159-164.
62. Hebestreit, P., Melzig, M.F., Untersuchungen zur Toxizität von *Agrostemma githago* L. [Diplomarbeit], Universität Greifswald (1999).

63. Stirpe, F., Battelli, M.G., Ribosome-inactivating proteins: progress and problems, *Cell. Mol. Life Sci.* 63 (2006) S. 1850-1866.
64. Weng, A., Untersuchungen zur Wirkung von Saponinen als Verstärker der Penetration von Proteinen im Zellmodell [Dissertation], Freie Universität Berlin (2009).
65. Gilibert-Oriol, R., Mergel, K., Thakur, M., von Mallinckrodt, B., Melzig, M.F., Fuchs, H., Weng, A., Real-time analysis of membrane permeabilizing effects of oleanane saponins, *Bioorg. Med. Chem.* 21 (2013) S. 2387-2395.
66. Weng, A., Bachran, C., Fuchs, H., Melzig, M.F., Soapwort saponins trigger clathrin-mediated endocytosis of saporin, a type I ribosome-inactivating protein, *Chem. Biol. Interact.* 176 (2008) S. 204-211.
67. Bachran, D., Schneider, S., Bachran, C., Weng, A., Melzig, M.F., Fuchs, H., The endocytic uptake pathways of targeted toxins are influenced by synergistically acting Gypsophila saponins, *Mol. Pharm.* 8 (2011) S. 2262-2272.
68. Clochard, J., Jerz, G., Schmieder, P., Mitdank, H., Troger, M., Sama, S., Weng, A., A new acetylated triterpene saponin from *Agrostemma githago* L. modulates gene delivery efficiently and shows a high cellular tolerance, *Int. J. Pharm.* 589 (2020) S. 119822.
69. Mitdank, H., Tröger, M., Sonntag, A., Shirazi, N.A., Woith, E., Fuchs, H., Kobelt, D., Walther, W., Weng, A., Suicide nanoplasmids coding for ribosome-inactivating proteins, *Eur. J. Pharm. Sci.* 170 (2022) S. 106107.
70. Bottger, S., Westhof, E., Siems, K., Melzig, M.F., Structure-activity relationships of saponins enhancing the cytotoxicity of ribosome-inactivating proteins type I (RIP-I), *Toxicol.* 73 (2013) S. 144-50.
71. Sama, S., Jerz, G., Thakur, M., Melzig, M.F., Weng, A., Structure-Activity Relationship of Transfection-Modulating Saponins - A Pursuit for the Optimal Gene Trafficker, *Planta Med.* 85 (2019) S. 513-518.
72. Fuchs, H., Niesler, N., Trautner, A., Sama, S., Jerz, G., Panjideh, H., Weng, A., Glycosylated Triterpenoids as Endosomal Escape Enhancers in Targeted Tumor Therapies, *Biomedicines* 5 (2017).
73. Sama, S., Jerz, G., Schmieder, P., Woith, E., Melzig, M.F., Weng, A., Sapofectosid - Ensuring non-toxic and effective DNA and RNA delivery, *Int. J. Pharm.* 534 (2017) S. 195-205.
74. Navarro, S.A., Carrillo, E., Grinan-Lison, C., Martin, A., Peran, M., Marchal, J.A., Boulaiz, H., Cancer suicide gene therapy: a patent review, *Expert Opin. Ther. Pat.* 26 (2016) S. 1095-1104.
75. Kreiss, P., Cameron, B., Rangara, R., Mailhe, P., Aguerre-Charriol, O., Airiau, M., Scherman, D., Crouzet, J., Pitard, B., Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency, *Nucleic Acids Res.* 27 (1999) S. 3792-3798.
76. Lechardeur, D., Lukacs, G.L., Nucleocytoplasmic transport of plasmid DNA: a perilous journey from the cytoplasm to the nucleus, *Hum. Gene Ther.* 17 (2006) S. 882-889.
77. Chen, Z.-Y., He, C.-Y., Ehrhardt, A., Kay, M.A., Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo, *Molecular Therapy* 8 (2003) S. 495-500.

78. Zhi-Ying Chen, E.R., Chen-Yi He, Hui Xu and Mark A Kay, Silencing of Episomal Transgene Expression in Liver by Plasmid Bacterial Backbone DNA Is Independent of CpG Methylation, *The American Society of Gene Therapy* (2008).
79. Klinman, D.M., Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides, *Nat. Rev. Immunol.* 4 (2004) S. 249-258.
80. EMA Committee for Advanced Therapies, Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products, EMA/CAT/80183/2014 online (2018).
81. Darquet, A.M., Cameron, B., Wils, P., Scherman, D., Crouzet, J., A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle, *Gene Ther.* 4 (1997) S. 1341-1349.
82. Kay, M.A., He, C.Y., Chen, Z.Y., A robust system for production of minicircle DNA vectors, *Nat. Biotechnol.* 28 (2010) S. 1287-1289.
83. Mayrhofer, P., Iro, M., Minicircle-DNA, *Gene Vaccines*, Josef Thalhamer, Richard Weiss, Sandra Scheibhofer, Editoren, Springer Vienna (2012) S. 297-310.
84. Alves, C.P.A., Development of a method for the purification of minicircles, Universidade de Lisboa Instituto Superior Técnico de Lisboa (2014).
85. Chen, Z.Y., He, C.Y., Kay, M.A., Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences and capable of persistent transgene expression in vivo, *Hum. Gene Ther.* 16 (2005) S. 126-131.
86. Luke, J., Carnes, A.E., Hodgson, C.P., Williams, J.A., Improved antibiotic-free DNA vaccine vectors utilizing a novel RNA based plasmid selection system, *Vaccine* 27 (2009) S. 6454-6459.
87. Carnes, A., Tiwari, N., Beilowitz, J., Sampson, C., Peterson, D., Williams, J., Production of a Nanoplasmid™ with a large gene insert using the HyperGRO™ fermentation process, *Vaccine Technology VI*, Laura Palomares: UNAM Mexico., Manon Cox: Protein Sciences Corporation USA., Tarit Mukhopadhyay: University College London UK., Nathalie Garçon: BIOASTER Technology Research Institute FR., Editoren. (2016), ECI Symposium Series.
88. Zhurina, D.S., Srivastava, A., Ullrich, M.S., Bakterielle Levansucrasen - Eine zuckersüße Versuchung, *BIOspektrum Wissenschaft* (2009) S. 488 f.
89. Steinmetz, M., Le Coq, D., Djemia, H.B., Gay, P., Genetic analysis of sacB, the structural gene of a secreted enzyme, levansucrase of *Bacillus subtilis* Marburg, *Mol. Gen. Genet.* 191 (1983) S. 138-144.
90. Neuro-2A (ATCC CCL-131), <https://www.atcc.org/products/ccl-131>.
91. Sama, S., Woith, E., Walther, W., Jerz, G., Chen, W., Hart, S., Melzig, M.F., Weng, A., Targeted suicide gene transfections reveal promising results in nu/nu mice with aggressive neuroblastoma, *J. Control. Release* 275 (2018) S. 208-216.
92. Hepa 1-6 (ATCC CRL-1830), <https://www.atcc.org/products/crl-1830>.
93. EVC-304 (RRID:CVCL_2029), https://www.cellosaurus.org/CVCL_2029.
94. HEK-293FT (RRID:CVCL_6911), https://www.cellosaurus.org/CVCL_6911.

95. Mitdank, H., Sama, S., Tröger, M., Testa, M.F., Ferrarese, M., Balestra, D., Pinotti, M., Weng, A., An advanced method for the small-scale production of high-quality minicircle DNA, *International Journal of Pharmaceutics* 605 (2021).
96. BioCat GmbH, Minicircle DNA Vector Technology, <https://www1.biocat.com/categories/cloning-expression/mammalian-expression/minicircle-technology> (2021).
97. Fabbrini, M.S., Rappocciolo, E., Carpani, D., Solinas, M., Valsasina, B., Breme, U., Cavallaro, U., Nykjaer, A., Rovida, E., Legname, G., Soria, M.R., Characterization of a saporin isoform with lower ribosome-inhibiting activity, *Biochem. J.* 322 (1997) S. 719-727.
98. Legname, G., Bellosta, P., Gromo, G., Modena, D., Keen, J.N., Roberts, L.M., Lord, J.M., Nucleotide sequence of cDNA coding for dianthin 30, a ribosome inactivating protein from *Dianthus caryophyllus*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1090 (1991) S. 119-122.
99. Kokorin, A., Weise, C., Sama, S., Weng, A., A new type 1 ribosome-inactivating protein from the seeds of *Gypsophila elegans* M.Bieb, *Phytochemistry* 157 (2019) S. 121-127.
100. Horn, N.A., Meek, J.A., Budahazi, G., Marquet, M., Cancer gene therapy using plasmid DNA: purification of DNA for human clinical trials, *Hum. Gene Ther.* 6 (1995) S. 565-573.
101. Silva-Santos, A.R., Alves, C.P.A., Monteiro, G., Azevedo, A.M., Prazeres, D.M.F., Multimodal chromatography of supercoiled minicircles: A closer look into DNA-ligand interactions, *Separation and Purification Technology* 212 (2019) S. 161-170.
102. Tagalakis, A.D., He, L., Saraiva, L., Gustafsson, K.T., Hart, S.L., Receptor-targeted liposome-peptide nanocomplexes for siRNA delivery, *Biomaterials* 32 (2011) S. 6302-6315.
103. Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., Danielsen, M., Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84 (1987) S. 7413-7417.
104. Roces, C.B., Lou, G., Jain, N., Abraham, S., Thomas, A., Halbert, G.W., Perrie, Y., Manufacturing Considerations for the Development of Lipid Nanoparticles Using Microfluidics, *Pharmaceutics* 12 (2020).
105. Kulkarni, J.A., Darjuan, M.M., Mercer, J.E., Chen, S., van der Meel, R., Thewalt, J.L., Tam, Y.Y.C., Cullis, P.R., On the Formation and Morphology of Lipid Nanoparticles Containing Ionizable Cationic Lipids and siRNA, *ACS Nano* 12 (2018) S. 4787-4795.
106. Eygeris, Y., Patel, S., Jozic, A., Sahay, G., Deconvoluting Lipid Nanoparticle Structure for Messenger RNA Delivery, *Nano Lett.* 20 (2020) S. 4543-4549.
107. Margarida Bastos und Ana C.P. Aguas, Using DSC to characterize thermotropic phase transitions in lipid bilayer membranes, *Malvern Application Note* (2016).
108. Demetzos, C., Differential Scanning Calorimetry (DSC): a tool to study the thermal behavior of lipid bilayers and liposomal stability, *J. Liposome Res.* 18 (2008) S. 159-173.
109. Eeman, M., Deleu, M., From biological membranes to biomimetic model membranes, *Biotechnologie Agronomie Societe Et Environnement* 14 (2010) S. 719-736.
110. Basu Ball, W., Neff, J.K., Gohil, V.M., The role of nonbilayer phospholipids in mitochondrial structure and function, *FEBS Lett.* 592 (2018) S. 1273-1290.

111. Jimenez-Rojo, N., Garcia-Arribas, A.B., Sot, J., Alonso, A., Goni, F.M., Lipid bilayers containing sphingomyelins and ceramides of varying N-acyl lengths: a glimpse into sphingolipid complexity, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1838 (2014) S. 456-464.
112. Rigoletto Tde, P., Zaniquelli, M.E., Santana, M.H., de la Torre, L.G., Surface miscibility of EPC/DOTAP/DOPE in binary and ternary mixed monolayers, *Colloids & Surf. B: Biointerfaces* 83 (2011) S. 260-269.
113. Hang, H.C., Yu, C., Kato, D.L., Bertozzi, C.R., A metabolic labeling approach toward proteomic analysis of mucin-type O-linked glycosylation, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 100 (2003) S. 14846-14851.
114. Sletten, E.M., Bertozzi, C.R., Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (2009) S. 6974-6998.
115. Agard, N.J., Prescher, J.A., Bertozzi, C.R., A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) S. 15046-15047.
116. Kolb, H.C., Finn, M.G., Sharpless, K.B., Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angew Chem Int Ed Engl* 40 (2001) S. 2004-2021.
117. Kale, A.A., Torchilin, V.P., Design, synthesis, and characterization of pH-sensitive PEG-PE conjugates for stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers: the effect of substitutes at the hydrazone linkage on the ph stability of PEG-PE conjugates, *Bioconjug. Chem.* 18 (2007) S. 363-370.
118. U.S. Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications, online (2007).
119. G.N.M. Ferreira, J.M.S. Cabral, D.M.F. Prazeres, A comparison of gel filtration chromatographic supports for plasmid purification, *Biotechnology Techniques* 11 (1997) S. 417-420.
120. Almeida, A.M., Eusebio, D., Queiroz, J.A., Sousa, F., Sousa, A., The use of size-exclusion chromatography in the isolation of supercoiled minicircle DNA from *Escherichia coli* lysate, *J. Chromatogr. A.* 1609 (2020) S. 460444.
121. Sudji, I.R., Subburaj, Y., Frenkel, N., Garcia-Saez, A.J., Wink, M., Membrane Disintegration Caused by the Steroid Saponin Digitonin Is Related to the Presence of Cholesterol, *Molecules* 20 (2015) S. 20146-20160.
122. Frenkel, N., Makky, A., Sudji, I.R., Wink, M., Tanaka, M., Mechanistic investigation of interactions between steroidal saponin digitonin and cell membrane models, *J. Phys. Chem. B* 118 (2014) S. 14632-14639.
123. Leopold, J., Popkova, Y., Engel, K.M., Schiller, J., Recent Developments of Useful MALDI Matrices for the Mass Spectrometric Characterization of Lipids, *Biomolecules* 8 (2018).
124. Kawai, T., Akira, S., The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors, *Nat. Immunol.* 11 (2010) S. 373-384.
125. Suschak, J.J., Dupuy, L.C., Shoemaker, C.J., Six, C., Kwilas, S.A., Spik, K.W., Williams, J.A., Schmaljohn, C.S., Nanoplasmid Vectors Co-expressing Innate Immune Agonists Enhance DNA Vaccines for Venezuelan Equine Encephalitis Virus and Ebola Virus, *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 17 (2020) S. 810-821.

126. Hu, B., Zhong, L., Weng, Y., Peng, L., Huang, Y., Zhao, Y., Liang, X.J., Therapeutic siRNA: state of the art, *Signal Transduct. Target. Ther.* 5 (2020) S. 101.
127. Kariko, K., Buckstein, M., Ni, H., Weissman, D., Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA, *Immunity* 23 (2005) S. 165-175.
128. Semple, S.C., Chonn, A., Cullis, P.R., Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes, *Biochemistry* 35 (1996) S. 2521–2525.
129. Song, Y.K., Liu, F., Chu, S., Liu, D., Characterization of cationic liposome-mediated gene transfer in vivo by intravenous administration, *Hum. Gene Ther.* 8 (1997) S. 1585-1594.
130. Tandia, B.M., Vandenbranden, M., Wattiez, R., Lakhdar, Z., Ruyschaert, J.M., Elouahabi, A., Identification of human plasma proteins that bind to cationic lipid/DNA complex and analysis of their effects on transfection efficiency: implications for intravenous gene transfer, *Mol. Ther.* 8 (2003) S. 264-273.
131. Tandia, B.M., Lonz, C., Vandenbranden, M., Ruyschaert, J.M., Elouahabi, A., Lipid mixing between lipoplexes and plasma lipoproteins is a major barrier for intravenous transfection mediated by cationic lipids, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) S. 12255-12261.
132. Jayaraman, M., Ansell, S.M., Mui, B.L., Tam, Y.K., Chen, J., Du, X., Butler, D., Eltepu, L., Matsuda, S., Narayanannair, J.K., Rajeev, K.G., Hafez, I.M., Akinc, A., Maier, M.A., Tracy, M.A., Cullis, P.R., Madden, T.D., Manoharan, M., Hope, M.J., Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 51 (2012) S. 8529-8533.
133. Semple, S.C., Akinc, A., Chen, J., Sandhu, A.P., Mui, B.L., Cho, C.K., Sah, D.W., Stebbing, D., Crosley, E.J., Yaworski, E., Hafez, I.M., Dorkin, J.R., Qin, J., Lam, K., Rajeev, K.G., Wong, K.F., Jeffs, L.B., Nechev, L., Eisenhardt, M.L., Jayaraman, M., Kazem, M., Maier, M.A., Srinivasulu, M., Weinstein, M.J., Chen, Q., Alvarez, R., Barros, S.A., De, S., Klimuk, S.K., Borland, T., Kosovrasti, V., Cantley, W.L., Tam, Y.K., Manoharan, M., Ciufolini, M.A., Tracy, M.A., de Fougères, A., MacLachlan, I., Cullis, P.R., Madden, T.D., Hope, M.J., Rational design of cationic lipids for siRNA delivery, *Nat. Biotechnol.* 28 (2010) S. 172-176.
134. Sahay, G., Querbes, W., Alabi, C., Eltoukhy, A., Sarkar, S., Zurenko, C., Karagiannis, E., Love, K., Chen, D., Zoncu, R., Buganim, Y., Schroeder, A., Langer, R., Anderson, D.G., Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling, *Nat. Biotechnol.* 31 (2013) S. 653-658.
135. Felgner, J.H., Kumar, R., Sridhar, C.N., Wheeler, C.J., Tsai, Y.J., Border, R., Ramsey, P., Martin, M., Felgner, P.L., Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations, *Journal of Biological Chemistry* 269 (1994) S. 2550-2561.
136. Korchowiec, B., Korchowiec, J., Kwiecinska, K., Gevrenova, R., Bouguet-Bonnet, S., Deng, C., Henry, M., Rogalska, E., The Molecular Bases of the Interaction between a Saponin from the Roots of *Gypsophila paniculata* L. and Model Lipid Membranes, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022).
137. Weng, A., Manunta, M.D., Thakur, M., Gilibert-Oriol, R., Tagalakis, A.D., Eddaoudi, A., Munye, M.M., Vink, C.A., Wiesner, B., Eichhorst, J., Melzig, M.F., Hart, S.L., Improved intracellular delivery of peptide- and lipid-nanoplexes by natural glycosides, *J. Control Release* 206 (2015) S. 75-90.

138. Hauser, H.O., The effect of ultrasonic irradiation on the chemical structure of egg lecithin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45 (1971) S. 1049-1055.
139. Böttger, S., Melzig, M.F., The influence of saponins on cell membrane cholesterol, *Bioorg. Med. Chem.* 21 (2013) S. 7118-7124.
140. Smith, W.S., Baker, E.J., Holmes, S.E., Koster, G., Hunt, A.N., Johnston, D.A., Flavell, S.U., Flavell, D.J., Membrane cholesterol is essential for triterpenoid saponin augmentation of a saporin-based immunotoxin directed against CD19 on human lymphoma cells, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1859 (2017) S. 993-1007.
141. Lorent, J., Lins, L., Domenech, O., Quetin-Leclercq, J., Brasseur, R., Mingeot-Leclercq, M.P., Domain formation and permeabilization induced by the saponin alpha-hederin and its aglycone hederagenin in a cholesterol-containing bilayer, *Langmuir* 30 (2014) S. 4556-4569.
142. Song, L.Y., Ahkong, Q.F., Rong, Q., Wang, Z., Ansell, S., Hope, M.J., Mui, B., Characterization of the inhibitory effect of PEG-lipid conjugates on the intracellular delivery of plasmid and antisense DNA mediated by cationic lipid liposomes, *Biochim. Biophys. Acta* 1558 (2002) S. 1-13.
143. Dammes, N., Goldsmith, M., Ramishetti, S., Dearling, J.L.J., Veiga, N., Packard, A.B., Peer, D., Conformation-sensitive targeting of lipid nanoparticles for RNA therapeutics, *Nat. Nanotechnol.* 16 (2021) S. 1030-1038.
144. Springer, A.D., Dowdy, S.F., GalNAc-siRNA Conjugates: Leading the Way for Delivery of RNAi Therapeutics, *Nucleic Acid Ther.* 28 (2018) S. 109-118.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Klinische Studien mit Gentherapien von 2010-2020	6
Abb. 2 In Gentherapie-Studien verwendete Vektoren (2010-2020)	7
Abb. 3 Strukturformeln kationischer Polymere als Transfektionsreagenzien	9
Abb. 4 Strukturformeln der liposomalen Transfektionsreagenzien DOTAP und DOTMA.....	10
Abb. 5 Unterschiedliche Möglichkeiten des Eintritts in eine Säugetierzelle	11
Abb. 6 Die Kornrade (<i>Agrostemma githago</i> L.), eine Caryophyllacee	15
Abb. 7 Strukturformel von SO1861 (Sapofectosid).....	17
Abb. 8 Strukturformel von AG1856 (Agrostemmosid E).....	17
Abb. 9 Minicircle und Nanoplasmid im Vergleich zum klassischen Plasmid	21
Abb. 10 Illustration der Minicircle-Bildung.....	32
Abb. 11 Übersicht der Arbeitsschritte zur Herstellung von MC-DNA	33
Abb. 12 LNP-Formulierung durch spontane Vesikelbildung infolge der Verdünnung der ethanolischen Lipidlösung.....	50
Abb. 13 Cyro-TEM-Aufnahme (links) und Modellaufbau (rechts) von LNP mit siRNA	50
Abb. 14 Negativ geladener Partikel mit ladungsausgleichenden Ionenschichten und resultierenden Potentialdifferenzen	53
Abb. 15 Phasenübergänge in Lipidmembranen	55
Abb. 16 Einfluss von Cholesterol auf das thermotrope Phasenverhalten von Lipid- Doppelmembranen	56
Abb. 17 Einfluss der Lipide auf die Art der gebildeten flüssigkristallinen Phase.....	57
Abb. 18 Beispiel zur Auswertung der FACS-Daten nach Dubletten-Diskriminierung	62
Abb. 19 KMUH (N- κ -maleimidoundecanoic acid hydrazide · TFA).....	70
Abb. 20 Strukturformeln der eingesetzten Lipide	73
Abb. 21 Strukturformel des hergestellten Lipid-Linker Konjugats DSPE-S-KMUH (DSK)	73
Abb. 22 Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Ansätze	76
Abb. 23 Agarose-Gelelektrophorese zur Erfolgskontrolle der Zwischenklonierung	77
Abb. 24 Agarose-Gelelektrophorese der zweifach verdauten pJET-Plasmide.....	78
Abb. 25 Agarose-Gelelektrophorese der zweifach verdauten Parental-Plasmide	79
Abb. 26 Agarose-Gelelektrophorese der mittels Kit hergestellten MC-Saporin.....	80

Abb. 27 Agarose-Gelelektrophorese der mittels Kit hergestellten MC-Sap (Saporin-Minircle) vor und nach Entfernung chromosomaler DNA/Parental-Plasmid.....	81
Abb. 28 Agarose-Gelelektrophorese der mittels Kit hergestellten MC-Sap: nativ vs. linearisiert...	81
Abb. 29 Chromatogramm der SEC einer MC-Sap-Präparation (2511 bp).....	82
Abb. 30 Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse Isolation von sc MC-Sap (2511 bp).....	83
Abb. 31 Chromatogramm der SEC einer sc MC-HLP-hFIX-Präparation (4489 bp)	84
Abb. 32 Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse der Isolation von sc MC-HLP-hFIX (4489 bp) .	84
Abb. 33 Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie	86
Abb. 34 REM-Aufnahmen der Sap-Nanoplexe (7:1) wie sie im Tierversuch zum Einsatz kamen .	86
Abb. 35 Größenverteilung der verwendeten Nanoplexe	87
Abb. 36 Analyse der DNA-Komplexierung mittels Agarosegel-Retentions-Assay	87
Abb. 37 Bestimmung der Transfektionseffizienz der eGFP-Nanoplexe.....	88
Abb. 38 Kamerabasierte (CytoSMART® Omni) Analyse der Wirksamkeit zielgerichteter Suizidgen-Nanoplexe in Neuro-2A- und Neuro-2A_Luc-Zellen.....	88
Abb. 39 Messreihe des Körpergewichts als Indikator für akute und chronische Toxizität	89
Abb. 40 Toxizitätsstudie zur Behandlung mit zielgerichteten NP-Sap-Nanoplexen und AG1856..	89
Abb. 41 Boxplot-Diagramm der antitumoralen Wirkung der NP-Sap-Nanoplexe (NP) in tumortragenden Mäusen.....	90
Abb. 42 Q-Q-Plots (z-standardisiert) und Histogramme der 3 Gruppen (Tag 11 der Studie).....	92
Abb. 43 Boxplot der 3 Gruppen (Tumolvolumen an Tag 11).....	94
Abb. 44 Biolumineszens-Bildgebung nach D-Luciferin-Injektion (150 mg/kg) an Tag 11.....	96
Abb. 45 Quantifizierung der BLI-Signale nach D-Luciferin-Injektion (150 mg/kg) an Tag 11	96
Abb. 46 LC-MS-(TIC)-Chromatogramm des Rohextrakts der Samen von <i>A. githago</i> L.	97
Abb. 47 LC-MS-Chromatogramm (DAD bei 210 nm) des Rohextrakts der Samen von <i>A. githago</i> L.	97
Abb. 48 Chromatogramme der SEC des Rohextrakts der Samen von <i>A. githago</i> L.	98
Abb. 49 LC-MS Chromatogramme der gesammelten SEC-Fractionen A (oben) und B (unten)	99
Abb. 50 LC-MS Chromatogramme der gesammelten SEC-Fractionen C (oben) und D (unten) ..	100
Abb. 51 DC-Analyse von SEC-Fractionen im Vergleich mit isoliertem AG1856	101
Abb. 52 Chromatogramm der semipräparativen HPLC zur Isolierung von AG1856 (210 nm)	101
Abb. 53 Vergrößerung des Chromatogramms (Abb. 22) im Bereich der Elution von AG1856....	102

Abb. 54 Analyse des isolierten AG1856 mittels LC-ESI-MS.....	102
Abb. 55 Massenspektren zum isolierten AG1856.....	103
Abb. 56 Kalkulation der Ausbeute an AG1856 als Flussdiagramm	105
Abb. 57 ESI-TIC-Chromatogramme zur Stabilität von AG1856 im Vergleich.....	106
Abb. 58 pH-Stabilität von AG1856.....	107
Abb. 59 Temperatur-Stabilität von AG1856.....	107
Abb. 60 DSC-Kurven unterschiedlich prozessierter DPPC-Liposomen.....	108
Abb. 61 Einfluss verschiedener AG1856-Konzentrationen auf DPPC-Liposomen (100 nm)	108
Abb. 62 Strukturformel von Asperosaponin VI.....	110
Abb. 63 Strukturformel von Digitonin.....	110
Abb. 64 Einfluss verschiedener Saponine auf DPPC- und DPPC/Chol-Liposomen (95:5).....	111
Abb. 65 Einfluss verschiedener Saponine auf DPPC- und DPPC/Chol-Liposomen (90:10).....	111
Abb. 66 Einfluss von AG1856 auf DPPC/Chol-Liposomen (90:10)	112
Abb. 67 Liposomen aus den Komponenten SM, POPC und Chol.....	113
Abb. 68 Einfluss von AG1856 auf SOPC/SM-Liposomen.....	114
Abb. 69 DOTAP/DPPC-Liposomen mit AG1856 oder DSKA	114
Abb. 70 Identifizierung von KMUH, DSPE-SH und Konjugat (DSK) im Reaktionsansatz	115
Abb. 71 DC der DSK-Fractionen nach SPE-Fraktionierung	116
Abb. 72 DC der DPSK-Fractionen nach SPE-Fraktionierung	117
Abb. 73 Optimierung des DC-Fließmittels für die Analytik der Saponin-Konjugation	118
Abb. 74 Dünnschichtchromatographische Observation der Synthese von DSKA und DPSKA....	119
Abb. 75 DC der DSKA-Fractionen nach SPE-Fraktionierung	121
Abb. 76 DC der DPSKA-Fractionen nach SPE-Fraktionierung	122
Abb. 77 Erfolgreicher LC-ESI-MS-Nachweis von DSKA (LC-MS-Methode 2, Negativmodus)	124
Abb. 78 Q-TOF-ESI-MS Direktinjektion am Beispiel der Testsubstanz Sildenafil	125
Abb. 79 MALDI-TOF-MS Spektren von AG 1856 auf verschiedenen Matrices (MALDI-MS- Methode 1)	126
Abb. 80 MALDI-TOF-MS Spektren von DPSE-SH auf verschiedenen Matrices (MALDI-MS- Methode 1)	126

Abb. 81 MALDI-TOF-MS Spektren von DPSE-PEG-SH auf verschiedenen Matrices (MALDI-MS-Methode 1)	127
Abb. 82 MALDI-TOF-MS Spektren von DSPE-S-KMUH-AG1856 auf verschiedenen Matrices (MALDI-MS-Methode 1).....	127
Abb. 83 Vergrößerung in das MALDI-TOF-MS-Spektrum von DSKA (MALDI-MS-Methode 1)	128
Abb. 84 Strukturformel des Lipid-Linker-AG1856 Konjugats DSPE-S-KMUH-AG1856 (DSKA)	129
Abb. 85 MALDI-TOF-MS Spektren von DSKA und DPSKA (MALDI-MS-Methode 2).....	130
Abb. 86 Transfektionseffizienz verschiedener Lipoplexe ohne oder mit AG1856 (2 µg/mL) im Vergleich zu K16-Nanoplexen mit AG1856.....	132
Abb. 87 Hydrodynamischer Durchmesser, PDI (rote Punkte) und Zetapotential verschiedener Lipoplexe im Vergleich zu K16-Nanoplexen.....	132
Abb. 88 Einfluss verschiedener AG1856-Konzentrationen auf DOTAP-Lipoplexe und K16-Nanoplexe.....	133
Abb. 89 Stabilisierung der DOTAP-Lipoplexe durch AG1856	134
Abb. 90 Transfektionseffizienz von Lipoplexen verschiedener molarer Verhältnisse von DOTAP/Lipid-AG1856-Konjugat.....	135
Abb. 91 DNA-Komplexierung durch Lipoplexe aus DOTAP/Lipid-AG1856-Konjugaten	135
Abb. 92 Bestimmung von Größe/Größenverteilung und Zetapotential der DOTAP/Konjugat-Lipoplexe.....	136
Abb. 93 Einfluss größerer DSKA-Konzentration sowie weiterer Lipidkomponenten auf die Transfektionseffizienz von DOTAP-DSKA-Lipoplexen	137
Abb. 94 Einfluss weiterer Lipidkomponenten und größerer DSKA-Konzentration auf Partikelgröße und ζ-Potential im Vergleich zu K16-Nanoplexen mit AG1856 oder DSKA.....	138
Abb. 95 Einfluss größerer DSKA-Anteile in Lipoplexen auf die DNA-Komplexierung	138
Abb. 96 Einfluss von AG1856 und Lipid-AG1856-Konjugaten auf die Transfektionseffizienz von LNP	139
Abb. 97 DLS-Messung/Zetapotential von LNP mit AG1856 oder Lipid-AG1856-Konjugat	139
Abb. 98 Hydrolyseversuch mit DSKA in neutralem und saurem Puffer	141
Abb. 99 Hydrolyseversuch mit DSKA in Essigsäure (AA)	142
Abb. 100 DLS-Analyse von DSKA vor DSC- (oben) und nach DSC-Messung (unten)	142

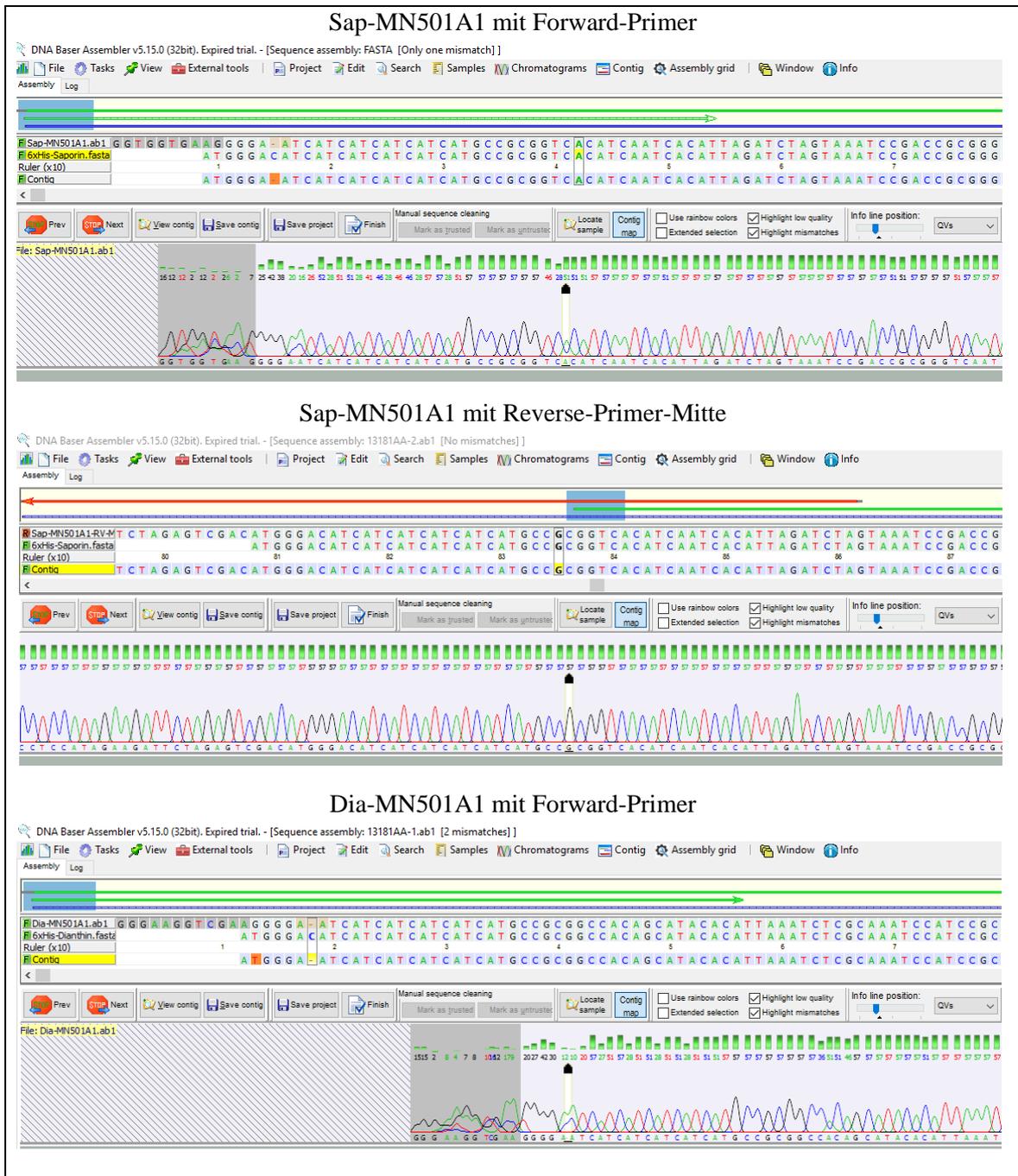
Tabellenverzeichnis

Tab. 1 PCR-Protokoll.....	36
Tab. 2 PCR-Bedingungen	36
Tab. 3 Berechnung der einzusetzenden Insertmassen für die Ligation in pJET1.2/blunt	39
Tab. 4 Protokoll der Ligation in den pJET1.2/blunt-Vektor	39
Tab. 5 Protokoll des Restriktionsverdau von pJET-Plasmiden und Parental-Plasmid-Präkursor ..	42
Tab. 6 Berechnung der einzusetzenden Insertmassen für die Ligation in MN501A1	42
Tab. 7 Protokoll der Ligation in MN501A1	42
Tab. 8 Protokoll zur Herstellung und Isolierung von Minicircle-DNA	44
Tab. 9 Lipid-Bestandteile von Lipid-Nanopartikeln	51
Tab. 10 Übersicht der für Liposomen verwendeten Lipide.....	57
Tab. 11 Gradient LC-Methode 1	66
Tab. 12 Gradient LC-Methode 1a (abweichender Gradient zur Analyse des Rohextrakts).....	66
Tab. 13 Gradient LC-Methode 2 (Semiprep-Methode).....	67
Tab. 14 Gradient LC-MS-Methode 2.....	68
Tab. 15 Konjugationsansatz von DSPE-SH und KMUH-Linker.....	71
Tab. 16 SPE-Fraktionierung des Konjugationsansatzes von DSPE-S-KMUH (DSK)	71
Tab. 17 Konjugationsansatz von DSPE-PEG-SH und KMUH-Linker	72
Tab. 18 SPE-Fraktionierung des Konjugationsansatzes von DSPE-PEG-S-KMUH (DPSK)	72
Tab. 19 SPE-Fraktionierung des Konjugationsansatzes von DSPE-S-KMUH-AG1856 (DSKA) ..	74
Tab. 20 SPE-Fraktionierung des Konjugationsansatzes von DSPE-PEG-S-KMUH-AG1856 (DPSKA)	75
Tab. 21 Spektralphotometrische Analyse der extrahierten PCR-Produkte	76
Tab. 22 Spektralphotometrische Untersuchung der präparierten Plasmide	77
Tab. 23 Spektralphotometrische Untersuchung der/des extrahierten Inserts/Parental-Plasmids	78
Tab. 24 Spektralphotometrische Untersuchung der präparierten Parental-Plasmide	79
Tab. 25 Vergleich verschiedener veröffentlichter SEC-Methoden zur Isolierung von Plasmid-DNA	85
Tab. 26 Spektralphotometrische Untersuchung unterschiedlicher MC-Präparationen	85

Tab. 27 Hydrodynamischer Durchmesser (D_H), Polydispersitätsindex (PDI) und ζ -Potential der Nanoplexe.....	86
Tab. 28 Tumolvolumen (TV) an Tag 4,7 und 11 der Studie zur Wirksamkeit von NP-Sap-Nanoplexen.....	90
Tab. 29 Tumolvolumen [mL] der 3 Gruppen an Tag 11 sowie MW, SD, IQR und z-Werte	91
Tab. 30 p-Werte aus Shapiro-Wilk-Test in R.....	93
Tab. 31 Vergleich der Varianzen	93
Tab. 32 Statistische Werte zur Entwicklung des Tumolvolumens in den 3 Studiengruppen bis Tag 11	95
Tab. 33 Masseverlust der gemahlene Samen durch Entfetten mit Petrolether	104
Tab. 34 Bestimmung der Massen der Sephadex-SEC-Fractionen des Rohextrakts.....	104
Tab. 35 Bestimmung der Masse des mit semipräparativer HPLC isolierten AG1856.....	104
Tab. 36 Bestimmung der Massen der einzelnen DSK-Fractionen	116
Tab. 37 Berechnung der Ausbeute an DSK.....	117
Tab. 38 Bestimmung der Massen der einzelnen DPSK-Fractionen.....	117
Tab. 39 Berechnung der Ausbeute an DPSK	118
Tab. 40 Bestimmung der Massen der einzelnen DSKA-Fractionen	121
Tab. 41 Berechnung der Ausbeute an DSKA.....	122
Tab. 42 Bestimmung der Massen der einzelnen DPSKA-Fractionen.....	123
Tab. 43 Berechnung der Ausbeute an DPSKA	123
Tab. 44 Einfluss von AG1856 auf Nanoplexe und Lipoplexe (Messbereich: 0,4-10000 nm)	133
Tab. 45 Maximal mögliche AG1856-Konz. im Transfektionsversuch (durch theoretische Freisetzung).....	135
Tab. 46 Partikelanalyse von DOTAP/DSKA-Lipoplexen und Komponenten	136
Tab. 47 DLS-Messungen zur Hydrolyse von DSKA	142

Anhang

Abb. A1 Sequenzierungsergebnisse zu konstruierten Parental-Plasmiden



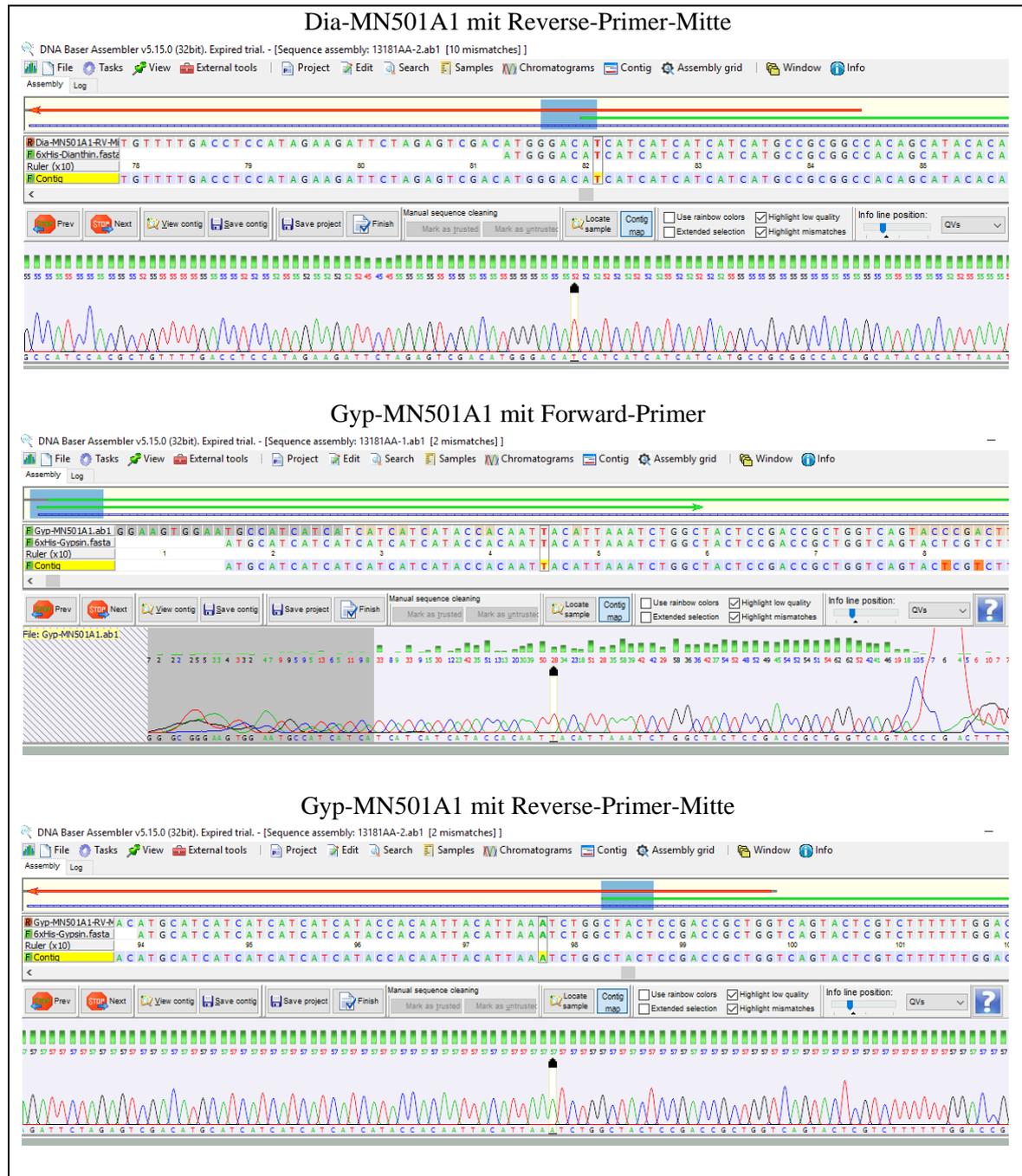
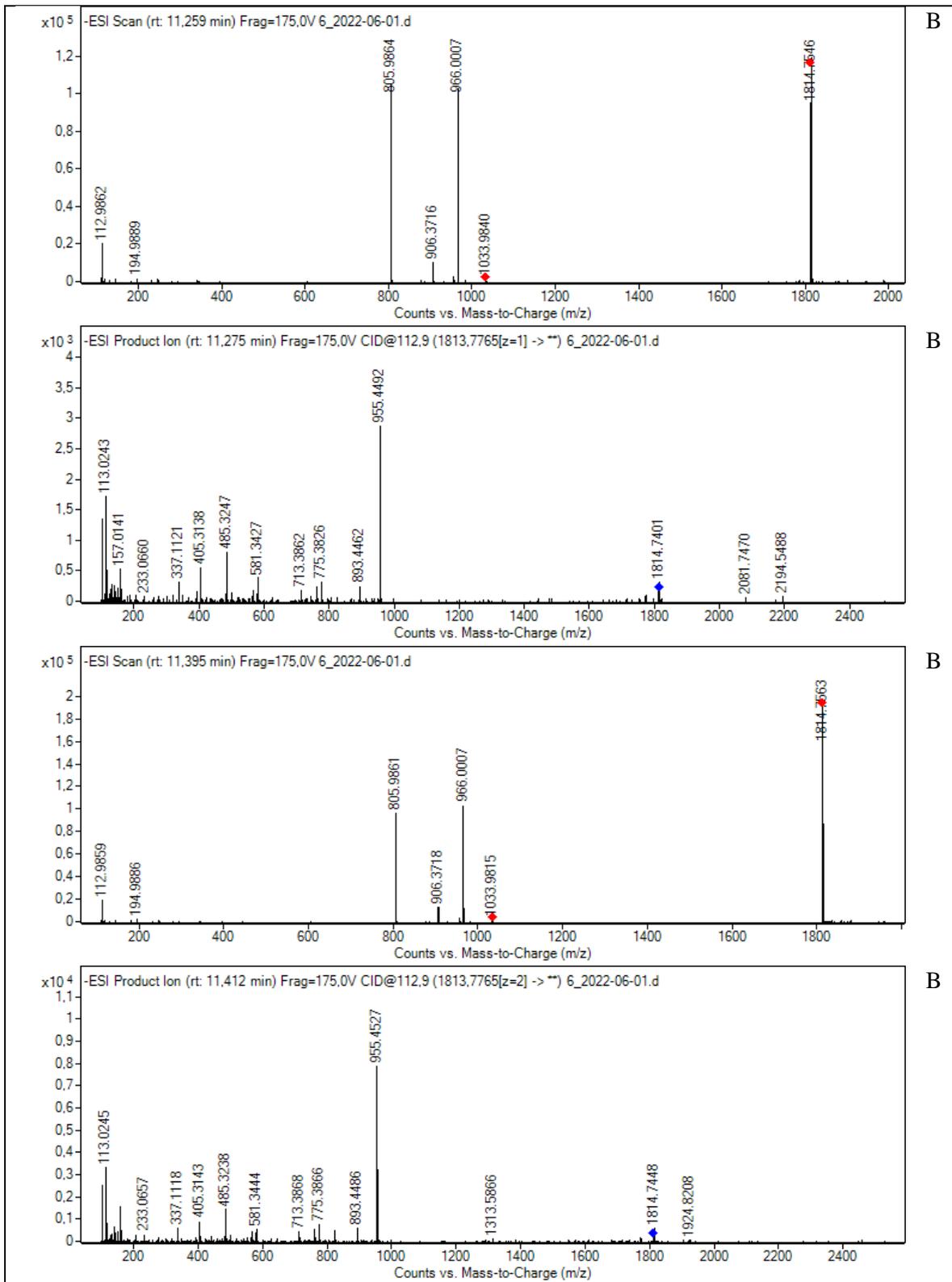
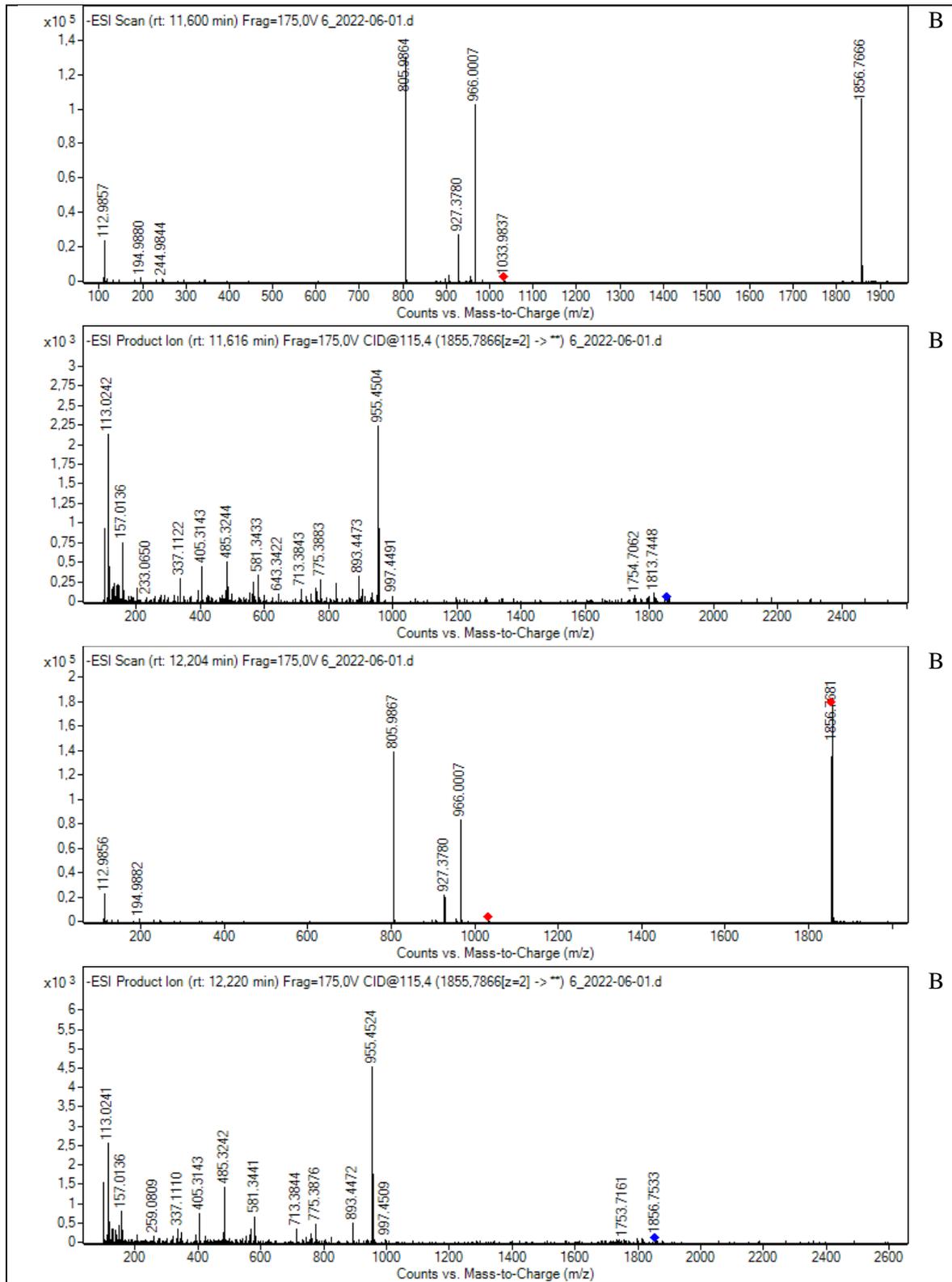


Abb. A2 Massenspektren und Fragment-Ionenspektren zu AG1856 und ähnlichen Saponinen in den SEC-Fraktionen (Abb. 49B) und 50D)





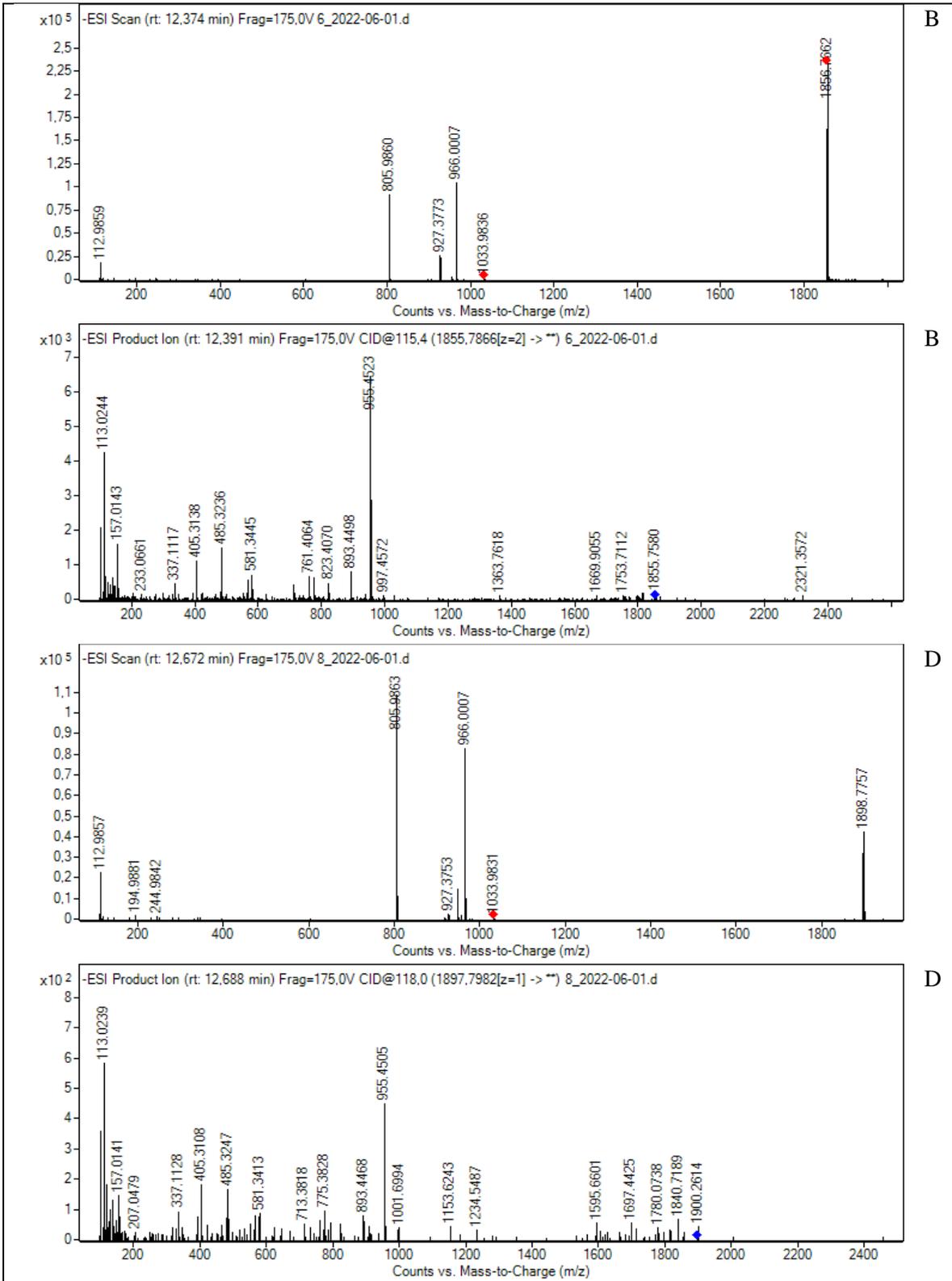
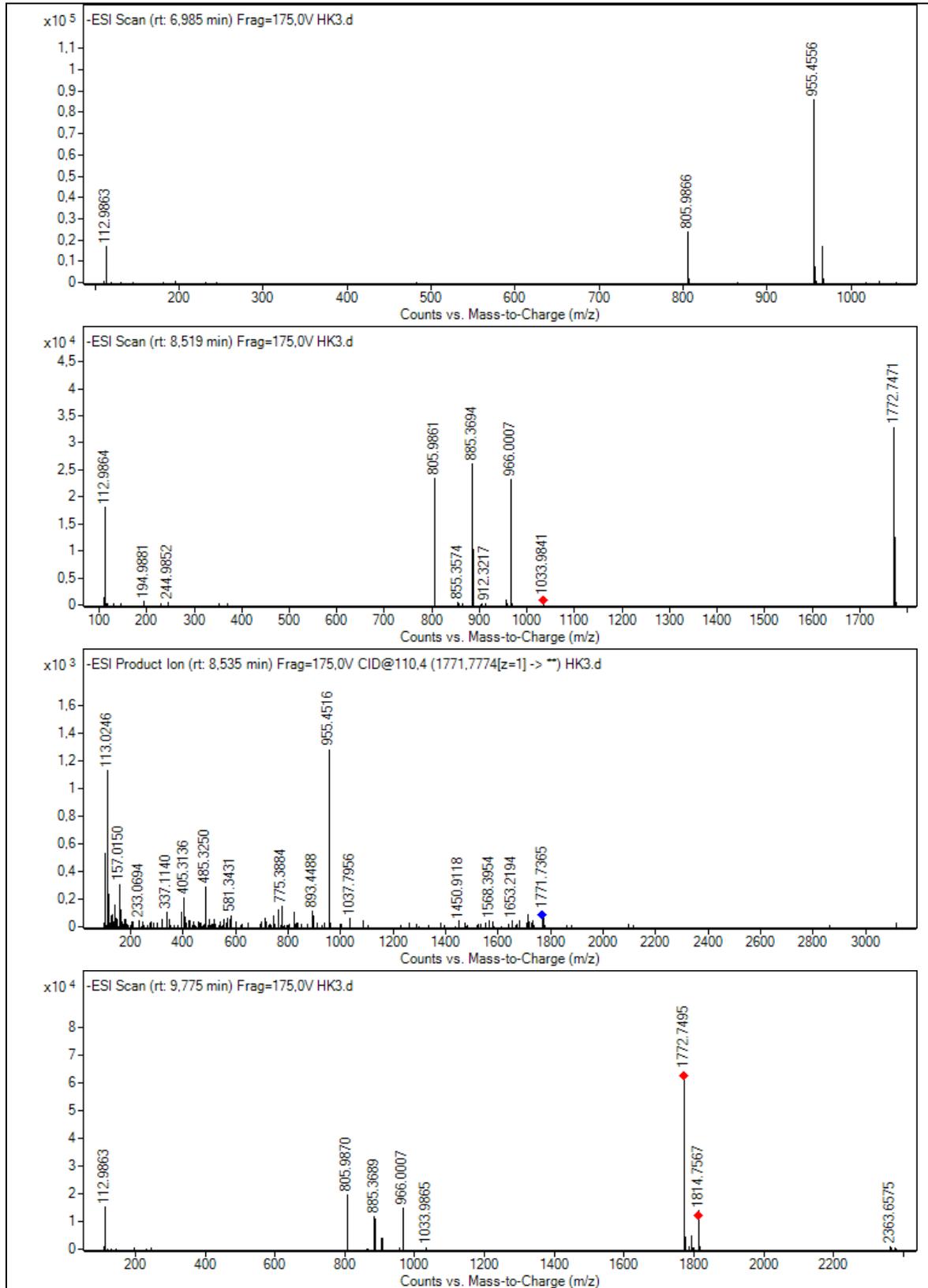
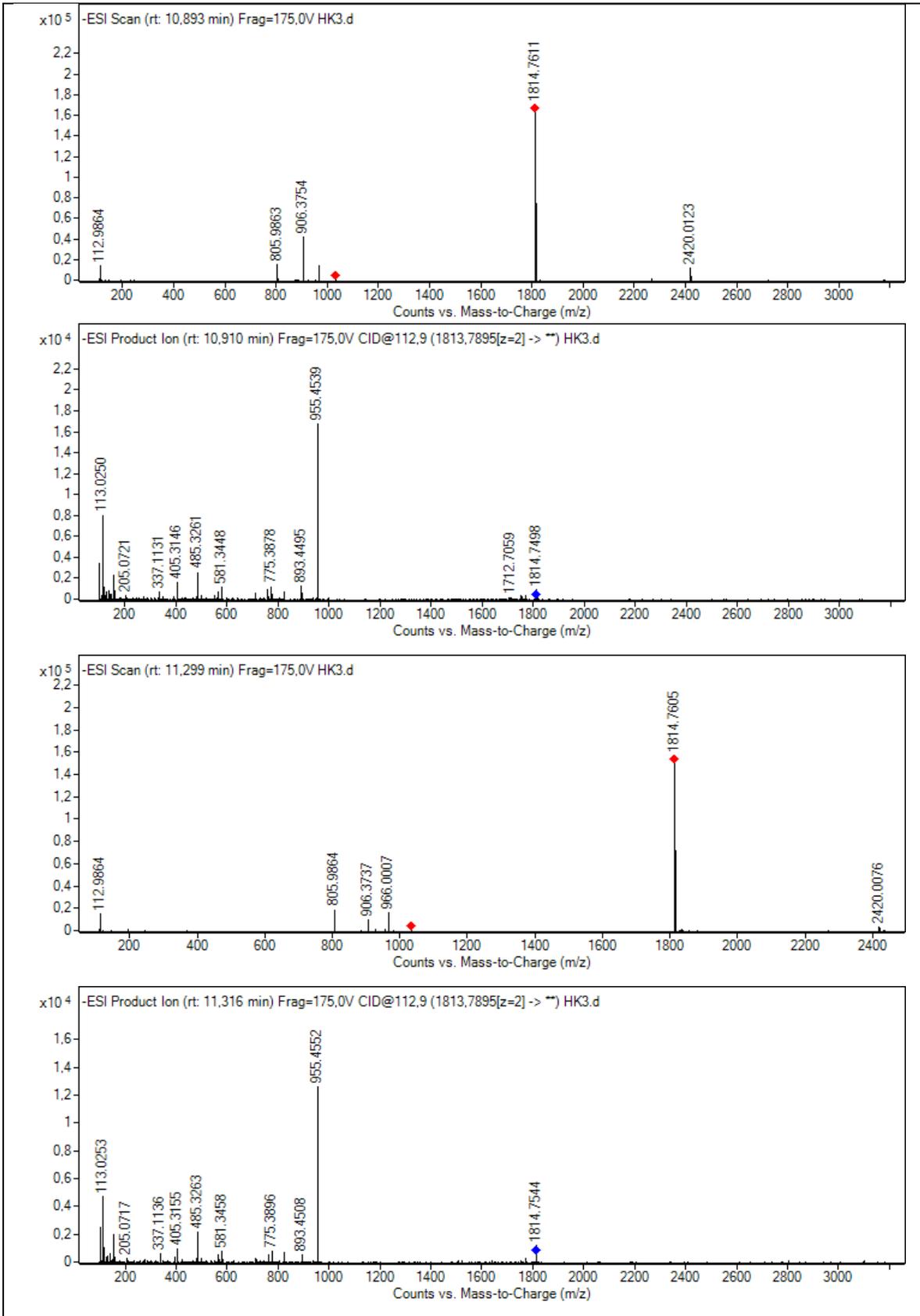


Abb. A3 Massenspektren und Fragment-Ionenspektren zu Abbauprodukten in AG1856 (Abb. 57A)





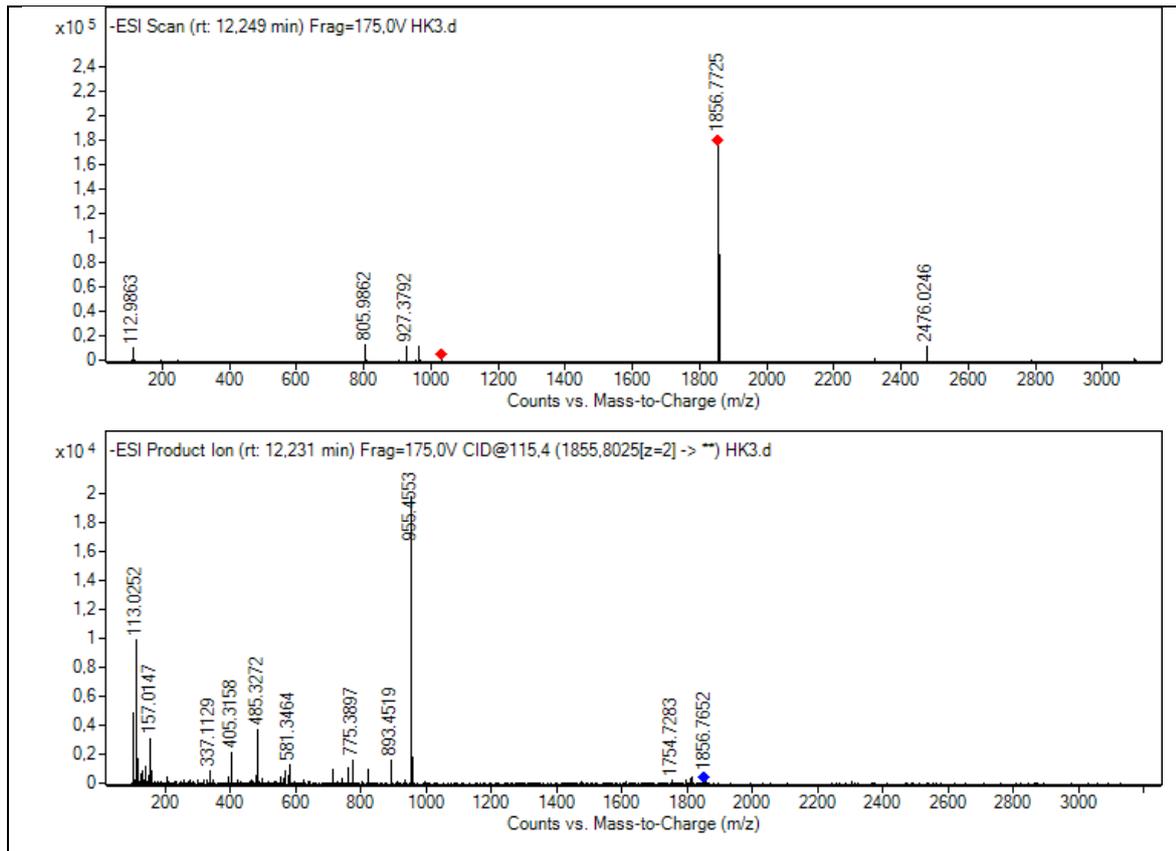


Abb. A4: Q-TOF-MS Direktionjektion der Konjugate

1: Überlagerung der Gesamtionenströme (TIC) von DSKA (obere rote Linie) und DPSKA (untere violette Linie), Konz. jeweils 45 μM ; 2 & 3: Massenspektren zu unterschiedlichen Flugzeiten (DSKA); 4 & 5: Massenspektren zu unterschiedlichen Flugzeiten (DPSKA).

