

Untersuchungen zu bioabbaubaren
Genvektoren und *in situ* gebildeten Filmen als
neue Arzneiformen für die Applikation von
Gentherapeutika

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

im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien
Universität Berlin eingereichte Dissertation

vorgelegt von

Senta Üzgün
aus Filderstadt

August 2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Müller
2. Gutachter: PD Dr. Carsten Rudolph

Disputation am: 03.09.2010

meinem Vater gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Die Gentherapie als Behandlungskonzept	5
1.2	Entwicklung neuer Gentherapeutika	6
1.2.1	Nukleinsäuren als eine neue Generation von Arzneistoffen	7
1.3	Virale und Nicht-virale Gentransfersysteme	12
1.4	Formulierung, Biodistribution und Pharmakokinetik	13
1.4.1	Formulierungsentwicklung von Transportvehikeln für den nicht-viralen Gentransfer	13
1.4.2	Verteilung im Organismus	24
1.4.3	Zellaufnahme und intrazelluläre Prozesse	26
1.4.4	Modifikation von Polyplexen zur Steigerung der Gen- transfereffizienz	30
1.5	Zielsetzung der Arbeit	33
2	Materialien und Methoden	37
2.1	Materialien	37
2.2	Geräte und Verbrauchsmaterial	41
2.3	Lösungen und Puffer	43
2.4	Zellkultur	43
2.4.1	Verwendete Zelllinien	43
2.4.2	Kultivierungsbedingungen	44
2.5	Nukleinsäuren	44
2.5.1	Plasmide	44
2.5.2	siRNA	49
2.5.3	mRNA	49
2.6	Polymersynthese	50
2.6.1	Makromolekulare Strukturen	50
2.6.2	Polyethylenimin	51
2.6.3	Copolymere auf Methacrylat-Basis	52
2.6.4	Statistische Pfropfcopolymere auf Basis von Methacrylat	55

2.7	Peptidsynthese	57
2.7.1	Festphasen-Peptidsynthese	57
2.7.2	Influenza Peptid 7	61
2.7.3	Influenza Peptid 7 modifiziert	62
2.7.4	Dimeres TAT-Peptid	64
2.8	Methoden	65
2.8.1	Herstellung der Gentransferkomplexe	65
2.8.2	Charakterisierung der Gentransferkomplexe	66
2.8.3	<i>In vitro</i> Untersuchungen	70
2.8.4	<i>In vivo</i> Untersuchungen	73
2.8.5	Bestimmung der Filmgüte in Abhängigkeit vom Bio- material und Lösungsmittel	75
2.8.6	Bestimmung der Gewebeerträglichkeit des Lösungs- mittels	76
2.8.7	Viskoelastische Eigenschaften <i>in situ</i> gebildeter Filme .	76
2.8.8	Herstellung und Charakterisierung pulverförmiger Po- lyplexe	77
2.8.9	Versuche zur Bestimmung der Freisetzungskinetik aus <i>in situ</i> gebildeten Filmen	78
2.8.10	Durchführung der <i>in vitro</i> Sprühversuche	78
2.8.11	Bestimmung der Transfektionseffizienz über die Ex- pression der Metridialuziferase	79
2.8.12	Bestimmung der Gesamtgewebeplasminogen Konzentration mittels ELISA	80
2.8.13	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen	80
2.8.14	Kotransfektion von siRNA und Plasmid-DNA und Bestimmung des tPA/PAI-1-Verhältnis mittels Wes- tern Blot	81
2.9	Statistische Auswertung	82
3	Chimärer Polymer-Peptid-Konjugate als Genvektoren	83
3.1	Design und Synthese der P(DMAEMA- <i>co</i> -OEGMA) Copoly- mere	83
3.2	Biophysikalische Eigenschaften	84
3.2.1	Komplexierung von Plasmid-DNA	84
3.2.2	Partikelgröße und Zeta-Potential	87
3.2.3	Kolloidale Stabilität der Polyplexe	88
3.2.4	Morphologie der Polyplexe	88
3.2.5	Untersuchungen zur Zytotoxizität der Polymere	91
3.3	<i>In vitro</i> Transfektionsstudien	93

3.3.1	Transfektionseffizienz in Abhängigkeit vom N/P -Verhältnis und Zelltyp	93
3.3.2	Untersuchungen zur Zellbindung, Internalisierung und intrazellulärer Freisetzung der Polyplexe	95
3.4	Modifikation des Polymerdesign	101
3.4.1	Steigerung der Pufferkapazität der Copolymere	103
3.4.2	Einführung funktioneller Peptide in den Gentransfervektor	103
3.5	Plasmid-DNA und mRNA im Vergleich	109
3.6	<i>In vivo</i> Applikation	117
3.7	Diskussion	117
4	Lokaler Gentransfer mittels <i>in situ</i> gebildeter Filme	127
4.1	Theoretischer Hintergrund und experimenteller Versuchsaufbau	127
4.2	Auswahl geeigneter Lösungsmittel	128
4.2.1	Bestimmung der Filmgüte in Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel	132
4.2.2	Gewebeverträglichkeit der Lösungsmittel	133
4.3	Auswahl geeigneter Biomaterialien	135
4.3.1	Matrixgüte in Abhängigkeit vom ausgewählten Polymer	137
4.3.2	Viskoelastische Eigenschaften <i>in situ</i> gebildeter Filme .	138
4.4	Formulierung <i>in situ</i> gebildeter Filme	140
4.4.1	Herstellung pulverförmiger Polyplexe	142
4.4.2	Bestimmung der Freisetzungskinetik formulierter Plasmid-DNA Polyplexe	145
4.5	Therapeutischer Einsatz <i>in situ</i> geformter PLGA-Filme	148
4.5.1	Verwachsungen des Peritoneums und therapeutische Ansatzpunkte	149
4.5.2	Untersuchung der Transfektionseffizienz <i>in vitro</i>	154
4.5.3	Erhöhung der Gewebeplasminogen-Konzentration durch Koapplikation von siRNA und pDNA	157
4.6	Diskussion	160
5	Zusammenfassung	167
	Abkürzungsverzeichnis	173
	Abbildungsverzeichnis	177
	Tabellenverzeichnis	181
	Summary	209

Publikationen

217

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Die Gentherapie als Behandlungskonzept

Im Jahre 1966 wurde von Lederberg und Tatum der Grundstein für die Entwicklung der Gentherapie gelegt (Tatum, 1966). Erste therapeutische Einsätze erfolgten bereits sieben Jahre später (Friedmann and Roblin, 1972). Die Gentherapie birgt vielversprechendes Potential, da es sich um eine Kausaltherapie handelt. Primär standen monogene Erbkrankheiten im Fokus, die auf den Defekt eines einzigen Gens zurückzuführen sind. Hierzu zählen die Zystische Fibrose (Mukoviszidose) oder schwere Störungen des Immunsystems (SCID, engl. *Severe Combined Immundeficiency*). Mittlerweile werden Nukleinsäuren als neue Arzneistoffe aber auch in der Onkologie, bei der Therapie chronischer Erkrankungen oder als gentherapeutische Impfstoffe erforscht.

Seit der ersten klinischen Studie im Jahre 1989 wurden über 1400 klinische Studien in 28 Ländern durchgeführt (Rosenberg et al., 1990). Der Hauptfokus lag mit 64,6 % auf dem Therapiegebiet der Onkologie. Ferner wurden Studien bei kardiovaskulären Krankheiten, Infektionskrankheiten und monogenetischen Erbkrankheiten durchgeführt. Momentan befinden sich die meisten gentherapeutischen Ansätze noch im Forschungs- und Entwicklungsstadium, so dass sich klinische Studien meist auf Verträglichkeits- und Dosisfindungsstudien, sowie erste Wirksamkeitsstudien an kleinen Probandenzahlen konzentrieren (Phase I/II Studien). Nur 3 % der Therapieansätze sind bereits in der klinischen Phase III, in der für die Zulassung entscheidende Daten zum Wirksamkeitsnachweis ermittelt werden (Edelstein et al., 2007; Gene Therapy Clinical Trials Worldwide, 2009). Bis heute gibt es, abgesehen von China (Gendicine[®], Oncorine[®]), kein zugelassenes gentherapeutisches Arzneimittel. Die Zulassung in China erfolgt im Gegensatz zu Europa oder den USA

aufgrund von Sicherheits- und Wirksamkeitsstudien in Phase I/ II und ist höchst umstritten.

Unter Gentherapie versteht man das Einbringen genetischen Materials in die Zellen eines Individuums mit dem Ziel der Heilung, Linderung oder Prophylaxe von Krankheiten. Darüber hinaus kann der Gentransfer auch für diagnostische Zwecke verwendet werden. Unterschieden wird dabei zwischen gentherapeutischen Eingriffen in Körperzellen (somatische Gentherapie) und Veränderungen in den menschlichen Keimzellen (Keimbahntherapie), die in Deutschland nach dem Embryonenschutzgesetz verboten sind. Die somatische Gentherapie lässt sich weiterhin unterteilen in

- Genkorrektur (Reparatur eines defekten Gens)
- Genaddition (Kompensation defekter Gene durch Einbringen einer intakten Genkopie)
- Inaktivieren pathologisch veränderter Gene (Antisense-Therapie, RNA Interferenz)

Die Applikation des therapeutischen Gens kann dabei außerhalb des Körpers in kultivierten Zellen (*ex vivo*) oder direkt in den Körper (*in vivo*) erfolgen. Bei der *ex vivo* Behandlung werden dem Patienten Zellen entnommen, diese *in vitro* kultiviert, *in vitro* gentherapeutisch behandelt und anschließend wieder in den Körper des Patienten zurückgeführt. Ein klassisches Beispiel für die *ex vivo* Gentherapie ist die Entnahme und gentherapeutische Behandlung von Knochenmarkstammzellen. Als Vorläuferzellen müssen nur sehr wenige Zellen korrigiert werden, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen. Im Gegensatz dazu wird bei der *in vivo* Behandlung das Gen dem Patienten direkt appliziert.

1.2 Entwicklung neuer Gentherapeutika

Obwohl die Behandlung von Krankheiten durch das Einbringen genetischen Materials enormes Potential birgt, hat mit Ausnahme der Antisense-Technologie in über 15 Jahren kein Produkt in Europa und den USA die Zulassung erreicht. Entscheidend für die Entwicklung eines neuen Arzneimittels sind i) Wirksamkeit, ii) Sicherheit und iii) Qualität des Arzneimittels (Nutzen-Risikoabschätzung). Neben der Auswahl geeigneter und potenter Arzneistoffe (Nukleinsäuren) trägt die Formulierungsentwicklung dabei entscheidend zum Erfolg des Gentherapeutikums bei.

Nukleinsäuren sind aufgrund ihrer stark negativen Ladung und der hohen Molekülmasse nicht membrangängig und können daher nur mit Hilfe geeigneter Transfersysteme, sogenannter Gentransfervehikel oder Vektoren, in die Zielzelle gelangen. Neben der Verwendung geeigneter Nukleinsäuren hängt die Effektivität der Behandlung daher im Wesentlichen vom Erfolg des Transfersystems ab, welches eine zufriedenstellende Biodistribution der Nukleinsäure gewährleisten sollte, um pharmakologische und toxikologische Nebenwirkungen zu verhindern.

1.2.1 Nukleinsäuren als eine neue Generation von Arzneistoffen

Das verwendete genetische Material ist sehr vielfältig und unterscheidet sich in Struktur und Zielmolekül. Tabelle 1.1 gibt eine Übersicht über häufig eingesetzte Nukleinsäuren mit deren Vor- und Nachteilen sortiert nach den unterschiedlichen Gentherapieansätzen. Heutzutage findet die Plasmid-DNA (pDNA) am häufigsten Anwendung, da diese einfach und kostengünstig produziert werden kann. Pharmakologisch gesehen ist Plasmid-DNA ein Prodrug. Erst nach erfolgreicher Transkription im Zellkern kann diese durch anschließende Translation in ihre Wirkform, das Protein, umgewandelt werden. Daher kann Plasmid-DNA als eine vielversprechende Alternative zu Proteinen angesehen werden, deren Herstellungskosten, geringe biologische Halbwertszeit und immunologisches Potential die Entwicklung immer noch aufwendig und teuer gestalten. Die Herausforderung bei der Verwendung von pDNA hingegen liegt vor allem in der Notwendigkeit, diese in den Zellkern zu transportieren (Munkonge et al., 2003). Da es sich bei Plasmid-DNA um ein sehr großes Molekül (≈ 100 nm) handelt, ist der Transport schwierig und erfolgt über einen aktiven Transportprozess mit Hilfe sogenannter Kernlokalisationssequenzen. In Säugerzellen konnte bereits nachgewiesen werden, dass weniger als 0,10 % der applizierten Plasmid-DNA tatsächlich im Zellkern ankommt. Ein großer Anteil der pDNA wird bereits im Aktinfilament der Zelle festgehalten und gelangt erst gar nicht in die Nähe des Zellkerns (Dauty and Verkman, 2005; Munkonge et al., 2003). Bei sich teilenden Zellen kann die pDNA hingegen recht einfach während der Mitose in den Zellkern gelangen, wobei es während der Zellteilung gleichzeitig zum Verlust der pDNA einer bereits transfizierten Zelle kommen kann. Dies führt in der Folge häufig zu einer zeitlich limitierten Wirkdauer. Mit Hilfe der Phagen-C31-Integrase (Aneja et al., 2009, 2007; Ehrhardt et al., 2005) oder unter Verwendung von Transposons (Ivics and Izsvák, 2006) ist es allerdings gelungen, nicht-virale Systeme ins Genom zu integrieren und dadurch eine langanhaltende

Bezeichnung	Molekül	Vorteile	Nachteile
<i>Genaddition</i>			
Plasmid-DNA	zirkuläre DNA	Herstellung	nukleo-cytoplasmatischer Transport Reinheit
Minicircle	zirkuläre DNA	Reinheit	Herstellung
Minichromosome	artifizielles Chromosome	vererbbar	Herstellung Transport
<i>Tumorvakzinierung</i>			
mRNA	einzelsträngige RNA Segmente	Effizienz	Herstellung Instabilität
<i>Antisense/Antigen Technologie</i>			
Oligonukleotide	einzelsträngige DNA Segmente	Flexibilität	Instabilität Transport
<i>RNA Interferenz</i>			
siRNA	doppelsträngige RNA Segmente	hohe Effizienz Selektivität	Instabilität Transport

Tabelle 1.1: Verwendete Nukleinsäuren in der Gentherapie

Wirkdauer zu erzielen. Ferner kann es herstellungsbedingt zur Anwesenheit bakterieller DNA-Sequenzen kommen, was eine Aktivierung des Immunsystems bei *in vivo* Applikation zur Folge hat und zum Wirkverlust der pDNA beiträgt.

Eine vielversprechende Alternative stellt die Verwendung von Boten-RNA (mRNA, engl. *Messenger RNA*) dar, die als eine Art Zwischenstufen-Prodrug lediglich in das Zytoplasma gelangen muss, um in seine Wirkform, das Protein, translatiert zu werden. Wesentliche Vorteile der mRNA sind i) eine gesteigerte Effizienz, ii) keine Integrationsgefahr und infolgedessen iii) eine Reduktion von Nebenwirkungen. Nachteile sind neben der aufwendigen Herstellung im Großmaßstab die Instabilität des Arzneistoffes, die allerdings durch Modifikation der Nukleotide verbessert werden kann (Yamamoto et al., 2009).

Ferner können Oligonukleotide und kurzkettige interferierende RNA-Moleküle (engl. *Short Interfering RNA*, siRNA) zur Ausschaltung von Genen genutzt werden. Oligonukleotide wirken dabei sowohl auf Translationsebene (Antisense-Technologie), als auch auf Transkriptionsebene (Antigen-Technologie). Im Gegensatz dazu sind siRNAs lediglich auf Translationsebene durch RNA-Interferenz aktiv. Im Bereich der Antisense-Technologie befinden sich bereits zwei Oligonukleotide der 1. Generation (Phosphorothioate) auf dem Markt. Neben Vitravene[®] (CibaVision, ISIS Pharmaceuticals), das 1998 von der Food and Drug Administration (FDA) und 1999 von der European Medicines Agency (EMA) zur topischen Behandlung von Cytomegalievirus (CMV) bedingter Retinitis bei AIDS Patienten zugelassen wurde, gelangte Genasense[™] (Genta Incorporated) als neues Krebspräparat zur Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem malignem Melanom in Kombination mit Dacarbazin 2007 in den USA auf den Markt. Ein großer Nachteil der 1. und 2. Generation ist neben der akuten Toxizität die geringe Halbwertszeit und Wirkstärke, die im Wesentlichen durch eine geringe Affinität zur mRNA bedingt ist. Die 3. Generation, die einzelsträngige Oligonukleotide (engl. *Lock Nucleic Acids* LNA) und doppelsträngige siRNAs umfasst, weist eine verbesserte Affinität zur mRNA auf und ist daher vielversprechender als die Vorgängergenerationen. Einige Kandidaten befinden sich bereits in klinischen Studien (McCullagh, 2006).

Die RNA-Interferenz (RNAi) Technologie wurde Ende der 80er Jahre erstmals von Craig Mello und Andrew Fire für den Fadenwurm *C. elegans* beschrieben (Fire et al., 1998). Allerdings führte die Applikation langer doppelsträngiger RNA Moleküle in Säugerzellen zunächst zu einer unspezifischen

Interferonantwort. Drei Jahre später konnte gezeigt werden, dass sich kurze (21 Nukleotide), doppelsträngige RNA Moleküle eignen, um in Säugerzellen spezifisch eine Genexpression zu inhibieren ohne dabei eine Immunantwort auszulösen (Elbashir et al., 2001; Tuschl, 2001; Tuschl and Borkhardt, 2002). Der Mechanismus der RNAi ist in Abbildung 1.1 dargestellt. Nur wenige Jahre nach der Entdeckung wurde RNAi als neue therapeutische Strategie zur posttranskriptionellen Unterdrückung von Genen (engl. *Gene Silencing*) in ersten klinischen Studien untersucht und ist zu einem unverzichtbaren Werkzeug in der molekularbiologischen Forschung geworden (Kim and Rossi, 2007). Eine der zentralen Herausforderungen für die Etablierung der RNAi-Technologie ist neben der Instabilität der Moleküle gegenüber abbauenden Enzymen (RNasen) und die dadurch bedingte kurze Halbwertszeit der Transfer in die Zielzelle. Chemische Modifikationen der Nukleotide und die Entwicklung geeigneter Transfersysteme sind mögliche Ansatzpunkte. Alternativ dazu können für einen langanhaltenden Effekt Plasmide verwendet werden, von denen kontinuierlich shRNA (engl. *Short Hairpin RNA*) im Zellkern transkribiert und ins Zytoplasma exportiert werden, um dort zu siRNA prozessiert zu werden. Sollte sich das zentrale Problem des Transfers lösen lassen, so könnte RNAi zu einer neuen Klasse spezifischer Arzneistoffe werden.

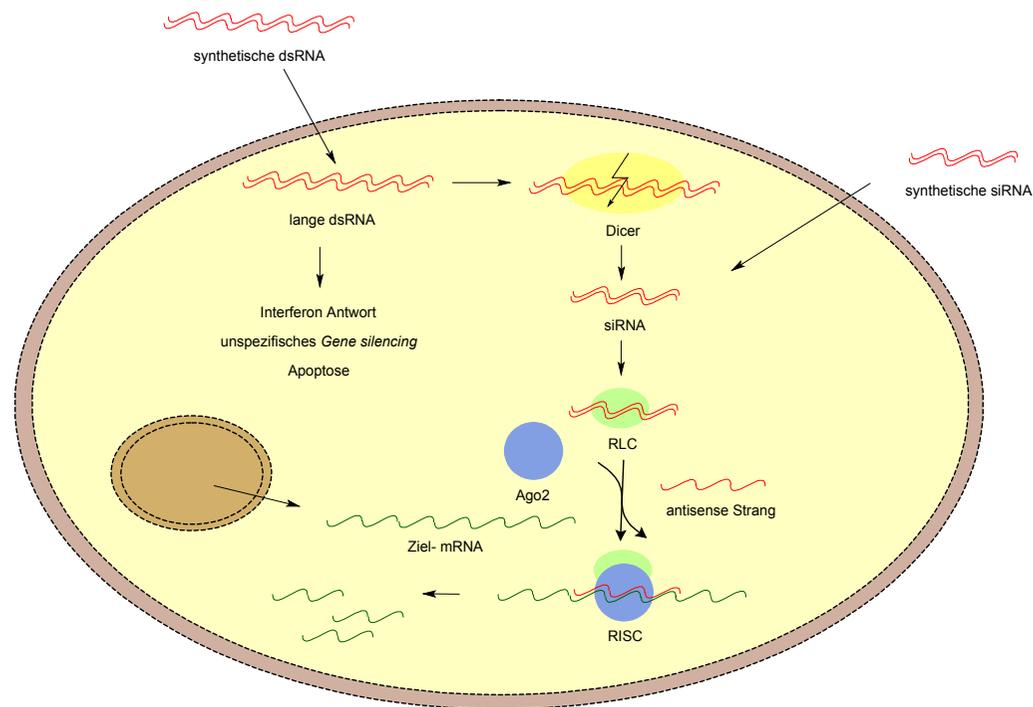


Abbildung 1.1: Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi): Exogen applizierte, lange synthetische doppelsträngige RNA Moleküle (dsRNA) müssen in der Zelle zuerst mit Hilfe von Enzymen (Dicern) in kurze Stücke prozessiert werden. Diese 21-23 Nukleotid langen RNA Moleküle, die als siRNA bezeichnet werden, sind schließlich für Bindung der Ziel-mRNA verantwortlich. Alternativ dazu können synthetische siRNAs direkt appliziert werden. Über eine Zwischenstufe, dem RISC Loading Complex (RLC), wird die siRNA in den RISC (engl. RNA Induced Silencing Complex) eingebaut, dessen zentraler Bestandteil das Argonaut 2-Protein (Ago2) ist. Der sense-Strang wird bei diesem Vorgang verworfen, während der antisense-Strang über den RISC zur Ziel-mRNA transportiert wird und deren Spaltung induziert.

1.3 Transportvehikel: Virale und Nicht-virale Gentransfersysteme im Vergleich

Gentransfervehikel können in Abhängigkeit des verwendeten Vehikels in i) virale und ii) nicht-virale Gentransfersysteme unterteilt werden. Je nach verwendetem System spricht man beim Einbringen des genetischen Materials von Transduktion (viral) oder Transfektion (nicht-viral).

Virale Systeme nutzen die evolutionär erworbene Fähigkeit von Viren aus, ihr Erbgut in Zellen einzuschleusen. Das Transgen wird dabei in replikationsdefiziente Viren verpackt und in die Zelle eingebracht. Ein großer Vorteil ist die Effizienz viraler Systeme. So konnte gezeigt werden, dass bereits die Bindung eines einzigen Viruspartikels ausreichend ist, die Zielzelle zu infizieren (Seisenberger et al., 2001). Daher dominierten virale Systeme lange Zeit in klinischen Studien auf dem Gebiet der Gentherapie, wobei vor allem retrovirale und adenovirale Gentransfersysteme zum Einsatz kamen. Retroviren wurden vorwiegend für den *ex vivo* Gentransfer (Stammzelltherapie) verwendet (Gene Therapy Clinical Trials Worldwide, 2009), wohingegen Adenoviren *in vivo* zum Einsatz kamen. Schwerwiegende Nebenwirkungen in klinischen Studien führten allerdings zu einem leichten Rückgang viraler Systeme von 70,0 % im Jahr 2004 auf 67,5 % im Jahr 2007 zugunsten nicht-viraler Gentransfersysteme, deren Einsatz um 3,2 % auf 26,5 % anstieg. Neben der starken Immunogenität von Adenoviren, die 1999 zum Tod eines Patienten führte (Marshall, 1999), kann die genomische Integration des Transgens bei Retroviren zur Aktivierung von Onkogenen führen (insertionelle Mutagenese). Im Rahmen einer Studie, die in den Jahren 2002 und 2003 an 15 Patienten mit einer schweren Störung des Immunsystems durchgeführt wurde und zur kompletten Heilung der Patienten führte, erkrankten vier Patienten an einer Leukämie-ähnlichen klonalen Lymphozytenproliferation. Drei der vier erkrankten Patienten konnten mit einer Chemotherapie behandelt werden, ein Patient verstarb (Check, 2002). In einer weiteren Studie wurden bei einem Patienten Sequenzen des eingesetzten Virus in dessen Samenflüssigkeit gefunden, der Virus konnte allerdings nicht in den Spermazellen *per se* nachgewiesen werden (Boyce, 2001).

Nicht-virale Systeme zeichnen sich hingegen durch i) eine große Variationsmöglichkeit im Vektordesign, ii) eine geringe Integrationsgefahr ins Genom (die Nukleinsäure verbleibt überwiegend episomal), iii) eine hohe Beladung mit genetischem Material und iv) eine geringe Immunogenität aus, die eine wiederholte Applikation ermöglicht. Durch Elimination bakterieller

CpG-Motive aus der Plasmid DNA konnte die Immunogenität weiter gesenkt und das Sicherheitsprofil verbessert werden. Ein großer Nachteil nicht-viraler Systeme bleibt jedoch die geringe Effizienz (1.000-fach bis 50.000-fach geringer als adenovirale Vektoren) und Spezifität im Vergleich zu viralen Systemen (Diebold et al., 1999). Neueste Bestrebungen verfolgen daher das Ziel, Elemente viraler Systeme zu imitieren, um sie in synthetische, nicht-virale Vektoren zu integrieren und sogenannte künstliche Viren zu erzeugen (Demeneix et al., 2004; Navarro et al., 1998; Wagner, 2004). Dabei wird das Verhältnis zwischen maximaler Effizienz und Spezifität zu minimaler Toxizität für den Erfolg und den Weg in die Klinik entscheidend sein.

1.4 Formulierung, Biodistribution und Pharmakokinetik nicht-viraler Gentransfersysteme

Die Herausforderungen bei der Entwicklung einer erfolgreichen Gentherapie mit nicht-viralen Gentransfersystemen sind auch im Hinblick auf die Formulierung groß. Je nach Applikationsroute und Formulierung müssen zahlreiche extra- und intrazelluläre Barrieren überwunden werden, die am Beispiel einer nanoskaligen Formulierung in Abbildung 1.2 dargestellt sind. Diese lassen sich in i) Formulierungsentwicklung, ii) Verteilung im Organismus und iii) Barrieren auf zelluläre Ebene unterteilen.

1.4.1 Formulierungsentwicklung von Transportvehikeln für den nicht-viralen Gentransfer

Für die nicht-virale Gentherapie werden unter Verwendung synthetischer und natürlicher Polymere neuartige Trägersysteme entwickelt. Je nach Therapiegebiet, Zielgewebe und Applikationsroute kommen unterschiedliche Formulierungen in Betracht, die in Tabelle 1.2 zusammengefasst sind.

Die einfachste Formulierung von Nukleinsäuren ist deren „nackte“ Applikation. So führte die direkte Applikation sogenannter „nackter“ und somit ungeschützter pDNA ins Muskelgewebe zu einer effizienten Genexpression (Wolff et al., 1990). Diese Technologie findet aufgrund Ihrer Einfachheit und Effizienz im Bereich der nicht-viralen Gentransfermethoden am häufigsten Anwendung in klinischen Studien (Edelstein et al., 2007). Auch die intravenöse Applikation großer Volumina „nackter“ pDNA innerhalb kurzer Zeit mit erhöhtem Druck (hydrodynamische Injektion beziehungsweise Hydroporation) führte zu einer erfolgreichen Transfektion von Hepatozyten in Mäusele-

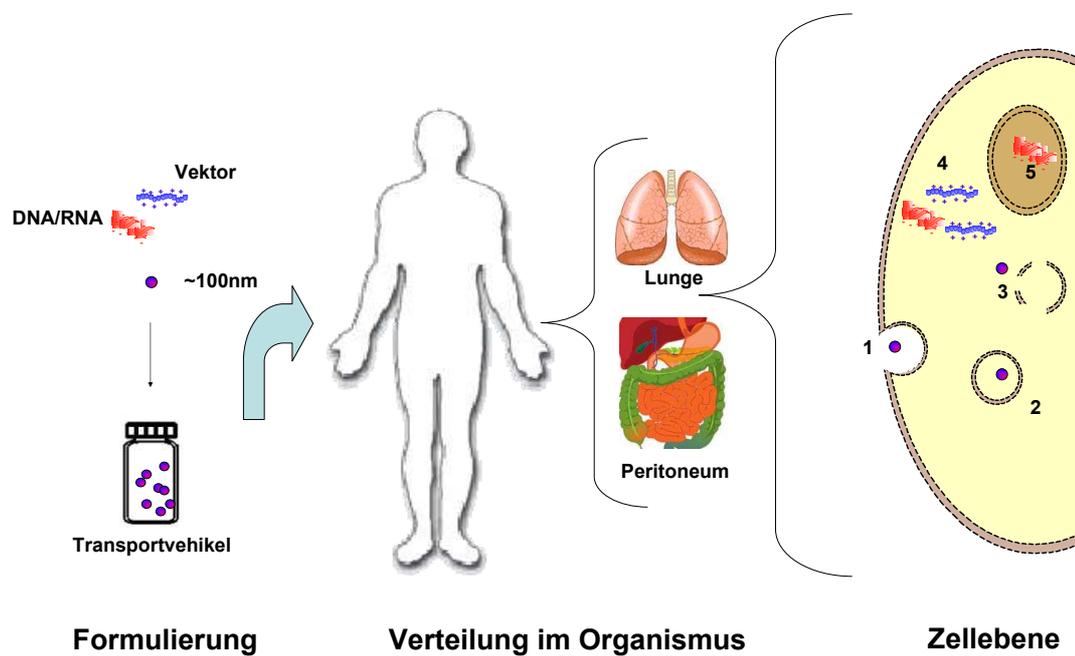


Abbildung 1.2: Herausforderungen einer erfolgreichen nicht-viralen Gentherapie: Formulierungsentwicklung, Verteilung im Organismus und auf zellulärer Ebene. (1) Aufnahme in die Zelle über Endozytose, (2) Bildung von Endosomen/Lysosomen, (3) Freisetzung aus dem Endosom/Lysosom ins Zytoplasma, (4) Dissoziation im Zytoplasma und (5) Transport in den Zellkern (optional), Abbildung modifiziert nach Putnam et al., 2006.

Nicht-virale Gentransfersysteme	
<i>„nackte“ Applikation</i>	<i>Einschlussverbindungen</i>
Mikroinjektion	Microbubbles
Gene Gun	Liposomen
Hydroporation	Nanopartikel
Elektroporation	Mikropartikel
Nukleofektion	
Optoporation	
Sonoporation	
<i>Komplexe</i>	<i>Einbettungen</i>
kationische Polymere	genaktivierte Biomaterialien
kationische Lipide	
Magnetofektion	

Tabelle 1.2: Nicht-virale Gentransfervektoren im Überblick: Die Nukleinsäure kann sowohl „nackt“, in Form von Komplexen oder Einschlussverbindungen als nanoskalige oder mikroskalige Partikel oder eingebettet in eine Matrix appliziert werden. Die Kombination mit physikalischen Methoden wie die Verwendung von elektrischen Feldern (Elektroporation, Nukleofektion), Laserimpulsen (Optoporation), Ultraschall (Sonoporation) oder magnetischen Feldgradienten (Magnetofektion) ermöglichen zusätzliche Effizienzsteigerung. Ferner können Nukleinsäuren in Einschlussverbindungen oder Einbettungen formuliert werden.

bern (Liu et al., 1999) und konnte bereits in der Klinik umgesetzt werden (Habib, 2007).

Die Kombination mit physikalischen Methoden verbesserte den Transport der Nukleinsäure zum Zielort und kann zur Steigerung der Gentransfereffizienz beitragen (Mehier-Humbert and Guy, 2005; Villemejane and Mir, 2009). Anwendung finden elektrische Felder (Elektroporation, Nukleofektion), Laserimpulse (Optoporation) oder Ultraschall (Sonoporation). Daneben können Hautareale durch den Beschuss mit DNA-beladenen Goldpartikeln (*Gene Gun*) behandelt werden. Fraglich bleibt hierbei allerdings die Übertragbarkeit in die Klinik. Mittlerweile werden von einigen Firmen Applikationssysteme für dermale oder intramuskuläre Anwendungen entwickelt, die eine einfache Applikation „nackter“ pDNA kombiniert mit der Elektroporation ermöglichen. Ein weiterer Nachteil der Applikation „nackter“ pDNA alleine oder in Kombination mit physikalischen Methoden ist der geringe Schutz gegenüber abbauenden Enzymen wie DNasen und RNasen, die in physiologischen Medien, der extrazellulären Matrix und im Zytoplasma vorkommen und vor allem nach systemischer Applikation zum rapiden Abbau der Nukleinsäuren führen. So konnte gezeigt werden, dass im Muskelgewebe eine relativ geringe Menge an Nukleasen vorhanden ist und dadurch die gute Wirksamkeit „nackter“ pDNA im Muskelgewebe erklärt werden kann (Barry et al., 1999).

Die Formulierung partikulärer (Komplexe, Einschlussverbindungen) oder 3-dimensionaler (Einbettungen) Trägersysteme bietet im Vergleich zu der Applikation „nackter“ pDNA wirkungsvollen Schutz vor enzymatischem Abbau (Adami et al., 1998; Godbey et al., 2000). Infolgedessen können Pharmakokinetik und Biodistribution der Nukleinsäure verbessert werden. Die meisten bisher beschriebenen nicht-viralen gentherapeutischen Ansätze beruhen auf der Verwendung von nanoskaligen Komplexen mit synthetischen Trägersystemen wie kationischen Polymeren (Polyplexe) (Godbey and Mikos, 2001; Luo and Saltzman, 2000) oder kationischen Liposomen (Lipoplexe) (Lee and Huang, 1997; Simões et al., 2005). Dieser Technologie liegt zu Grunde, dass sich unter physiologischen Bedingungen die positiv geladene Nukleinsäure und das negativ geladene Trägermaterial spontan zu nanoskaligen Partikeln zusammen lagern („self-assembly“). Alternativ dazu können Nukleinsäuren in i) Nanopartikeln, ii) Mikropartikeln oder iii) 3-dimensionalen Gerüststrukturen (genaktivierte Biomaterialien) direkt verkapselt, eingebettet oder auf der Oberfläche absorbiert werden (Elfinger et al., 2008). Nanopartikuläre Systeme sind feste, kolloidale Teilchen mit einem Durchmesser zwischen 10 bis 1000 nm, die als Trägersysteme für Arzneistoffe eingesetzt werden und sich aufgrund Ihrer Größe für den intrazellulären Transport von neuen Arznei-

stoffen wie Nukleinsäuren eignen (Kreuter, 1983a,b, 1994), wohingegen Mikropartikel mit einer Partikelgröße von $1\ \mu\text{m}$ und größer kaum intrazellulär von Zellen aufgenommen und stattdessen vorwiegend von antigenpräsentierenden Zellen phagozytiert werden. Daher werden Mikropartikel besonders im Bereich der Vakzinierung eingesetzt. Genaktivierte Biomaterialien werden als 3-dimensionale Implantate vorwiegend lokal zur Geweberegeneration (engl. *Tissue Engineering*) eingesetzt, wobei die Nukleinsäure in „nackter“ Form oder als Komplex in das Trägersystem eingebettet werden kann.

Trotz der Vielfalt an verschiedenen Systemen in den letzten 15 Jahren konnte bis heute kein Vehikel gefunden werden, das allen Anforderungen entspricht. Bei der Entwicklung neuer Transfervehikel, sogenannter Genvektoren, spielen neben der Formulierbarkeit auch pharmazeutische und wirtschaftliche Aspekte eine wesentliche Rolle für den Erfolg des Gentransfersystems (Elfinger et al., 2008; Gardlík et al., 2005). Ein ideales Trägersystem sollte folgende Parameter erfüllen:

- (1) einfache und kostengünstige Herstellung in GMP- Qualität
- (2) biokompatibel, bioabbaubar und pharmakologisch inert
- (3) ausreichender Schutz der Nukleinsäure gegenüber enzymatischem Abbau
- (4) effizienter Transport des genetischen Materials zum Zielort
- (5) kontrollierte Genexpression am Zielort (Dauer und Ausmaß)
- (6) ausreichende Stabilität des Trägersystems bei Applikation und während der Lagerung

Komplexbildung mit Nukleinsäuren

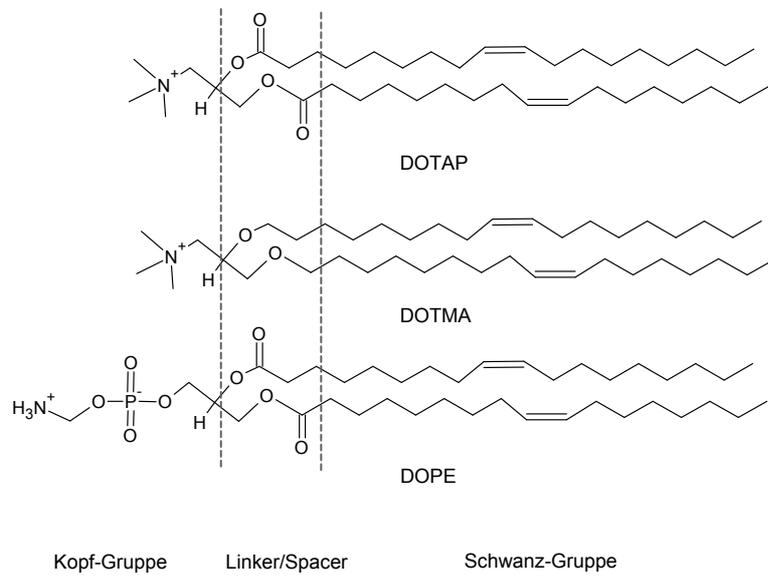
Die Komplexbildung erfolgt durch spontane Aneinanderlagerung der negativ geladenen Nukleinsäure mit positiv geladenen kationischen Lipiden oder Polymeren zu Partikeln im Nanometerbereich („self-assembly“), idealerweise bis zu 200 nm groß. Entscheidend für die Formulierbarkeit von Komplexen, das heißt die Fähigkeit des Trägersystems mit der Nukleinsäure kompakte, globuläre Partikel zu bilden, sind die physikochemischen Eigenschaften des Polykations. Als wichtige Parameter für die Komplexbildung sind die Zusammensetzung, die Wasserlöslichkeit, die Kettenlänge (Molekülmasse, Molekülmassenverteilung) beziehungsweise der Verzweigungsgrad und die kationische Ladungsdichte des Polykations zu nennen. So konnte gezeigt werden,

dass niedermolekulare (2 kDa) Polymere nicht in der Lage sind, pDNA zu Nanopartikeln zu kompaktieren und infolgedessen eine wesentlich geringere Transfektionseffizienz gegenüber höhermolekularen Polymeren (25 kDa) aufweisen (Petersen et al., 2002b; Thomas and Klibanov, 2002, 2003). Ferner sind eine möglichst enge Molekülmassenverteilung und hydrophobe Anteile im Polymer für einen effizienten Gentransfer vorteilhaft (Putnam, 2006). Durch Variation des molaren Verhältnisses zwischen den positiv geladenen Aminogruppen im Trägersystem (N) und den negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäure (P), kurz N/P -Verhältnis, können darüber hinaus Bindungsstärke, Nettoladung und Größe der Komplexe beeinflusst werden.

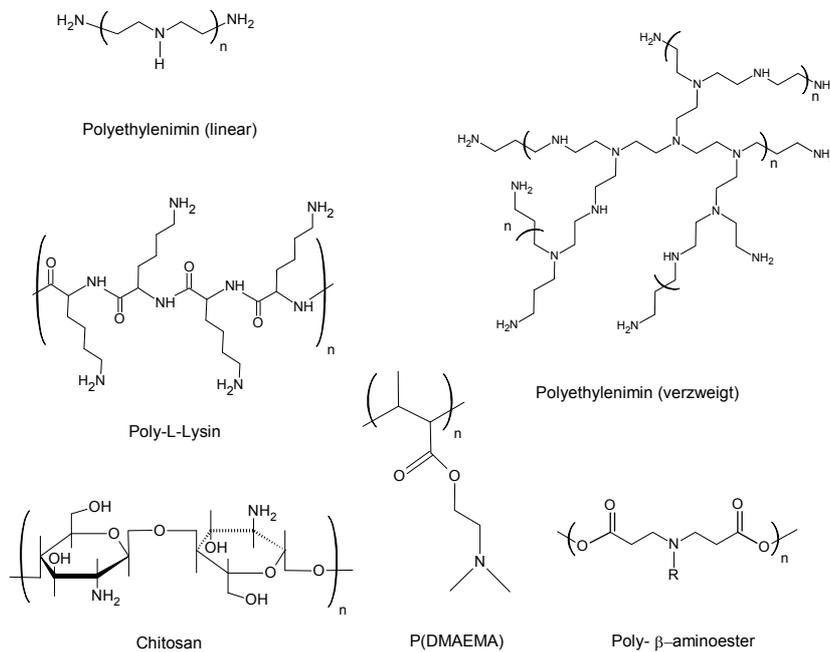
Für die Stabilität monodisperser nanoskaliger Trägersysteme spielen Formulierungsparameter wie der pH-Wert und die Salzkonzentration der Lösung eine wesentliche Rolle (Godbey et al., 1999a; Ogris et al., 1998; Wightman et al., 2001). Besonders für *in vivo* Anwendungen werden hohe Nukleinsäurekonzentrationen in physiologisch akzeptablen Medien notwendig. Gleichzeitig steigt die Menge an notwendigem Trägermaterial. Um den Organismus nicht unnötig zu belasten, sollten bioabbaubare Materialien mit einem guten Sicherheitsprofil verwendet und eine Akkumulation des Trägersystems im Zielgewebe verhindert werden. Größtes Problem der effizientesten Trägermaterialien ist die hohe akute Toxizität, die in Zusammenhang mit der kationischen Ladungsdichte und dem Grad der Verzweigung des Moleküls steht (Zhang et al., 2004). Während eine hohe positive Ladungsdichte eine gute Komplexierung der Nukleinsäure und eine gute Aufnahme in die Zelle gewährleistet (siehe Kapitel 1.4.3), korreliert diese andererseits mit der Toxizität des Trägersystems (Verbaan et al., 2005).

Während die Herstellung viraler Systeme recht aufwendig ist, können synthetische Trägersysteme preiswert in großem Maßstab und hoher Qualität reproduzierbar hergestellt werden, um den GMP-Anforderungen zu genügen. Darüber hinaus lassen sich derartige Trägersysteme steril herstellen. In Abbildung 1.3 sind die derzeit wichtigsten Vertreter auf (a) Lipid- und (b) Polymer-Basis dargestellt.

Lipide, die zur Herstellung kationischer Liposomen (Lipoplexe) verwendet werden, weisen eine gemeinsame amphiphile Grundstruktur bestehend aus einer hydrophilen Kopf-Gruppe (Monokation, Polykation), einem Linker und einer lipophilen Schwanz-Gruppe auf. Die kationische Kopf-Gruppe interagiert mit der Zellmembran und ist für die Komplexierung der Nukleinsäure verantwortlich, wohingegen der hydrophobe Rest die Ausbildung einer vesikelähnlichen Struktur im wässrigen System garantiert. Über die



(a) kationische Lipide



(b) kationische Polymere

Abbildung 1.3: Hilfsstoffe für die Herstellung von Komplexen mit Nukleinsäuren. Allen gemein ist die Anwesenheit protonierbarer kationischer Strukturen, vorwiegend sekundäre oder tertiäre Polyamine.

Linkerfunktion lässt sich ferner die Bioabbaubarkeit steuern. Bekannteste Vertreter dieser Klasse sind DOTMA (N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid) (Felgner et al., 1987) und DOTAP (1,2-Diacyl-3-trimethylammoniumpropan) (Liu et al., 2003a; Montier et al., 2008).

Zur Steigerung der Gentransfereffizienz werden neutrale Lipide wie beispielsweise Cholesterol oder DOPE (Dioleylphosphatidylethanolamin) zuge-mischt, die die zelluläre Aufnahme der Lipoplexe verbessern sollen. Eine 1:2 Mischung aus DOTMA und DOPE ist unter dem Namen Lipofectin[®] kom-merziell erhältlich. Kationische Lipide konnten bereits erfolgreich in die Kli-nik transferiert werden (Laitinen et al., 2000). Ein großer Nachteil dieser Systeme ist die aufwendige und komplexe Herstellung der Lipoplexe, wobei sich Größe, Form und Stabilität der wässrigen Dispersion, sowie die Inter-aktionen mit der Nukleinsäure und der Zellmembran schwer steuern lassen (Simberg et al., 2001). Ferner spielt deren Zytotoxizität für die *in vivo* An-wendung eine wesentliche Rolle (Aberle et al., 1998; Dokka et al., 2000), so dass *in vivo* geringere Transfektionseffizienzen als in *in vitro* beobachtet wur-den.

Nanoskalige Trägersysteme auf Polymer-Basis (Polyplexe) hingegen zei-gen im Vergleich zu Lipoplexen eine höhere Effektivität *in vivo* bei geringerer Interaktion mit Serumbestandteilen (Adami et al., 1998; Gebhart and Kaban-ov, 2001). Darüber hinaus lassen sich Polyplexe in ihren physikochemischen Eigenschaften gut steuern und leicht chemisch modifizieren (siehe 1.4.4). Als kationische Polymere finden neben natürlichen Verbindungen wie Proteinen (Histone, Protamin) oder Aminopolysacchariden (Chitosane) auch synthetische Peptide (Poly-L-lysin, Poly-L-arginin) und Polyamine (Polyethyleni-min, Poly(beta-amino ester) und Poly(dimethyl-aminoethylmethacrylate)) Verwendung (De Smedt et al., 2000; Park et al., 2006). Bekanntester Vertrep-ter der Polyamine und derzeit effizientestes Trägermaterial des nicht-viralen Gentransfers ist Polyethylenimin (PEI) (Demeneix and Behr, 2005).

PEI wurde 1995 erstmals *in vitro* und *in vivo* verwendet (Boussif et al., 1995). Es handelt sich um ein organisches Makromolekül, das sich durch eine hohe Dichte protonierbarer Aminogruppen auszeichnet. Es wird als Gen-transfervehikel sowohl in der linearen (engl. *Linear Polyethylenimine*, l-PEI), als auch in der verzweigten (engl. *Branched Polyethylenimine*, br-PEI) Form verwendet, wobei sich beide hinsichtlich Effizienz und Toxizität unterschei-den. Während br-PEI in der lokalen Applikation via Aerosol gute Ergebnisse liefert (Dames et al., 2007), ist die lineare Form besser für die systemische Applikation geeignet (Li et al., 2000). Auch das Toxizitätsprofil der Polymere

nach systemischer Applikation spricht für die lineare Form. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass lineares PEI als Gentransfervehikel weniger abhängig vom Zellzyklus ist als br-PEI (Brunner et al., 2002). Erste klinische Erfolge für die Anwendung von l-PEI gab es für die lokale Applikation bei Patienten mit Blasen Tumoren (Sidi et al., 2008). Großer Nachteil der auf PEI basierenden Transfersysteme ist die Toxizität des Trägersystems und die fehlende Bioabbaubarkeit (Chollet et al., 2002; Hunter, 2006). Bis heute ist es nicht gelungen, die Biodistribution des Trägersystems nach *in vivo* Applikation komplett aufzudecken. Der Verbleib im Organismus bleibt weiterhin unklar.

Vorteile bezüglich der Toxizität bieten bioabbaubare Trägermaterialien. Bekanntester Vertreter ist das Poly-L-lysin (PLL). PLL ist durch seine Bioabbaubarkeit gut für die *in vivo* Anwendung geeignet, weist allerdings eine im Vergleich zu PEI erheblich niedrigere Genexpression auf. Ein Grund hierfür ist die gegenüber PEI geringere Pufferkapazität des Polymers, die zu einer reduzierten Freisetzung aus dem Endosom und einer Zerstörung der Nukleinsäure bereits im Endosom/Lysosom führt (siehe 1.4.3). Trotz vielfältiger Modifikationen bleibt der Einsatz von PLL in klinischen Studien daher derzeit eher fraglich (Midoux and Monsigny, 1999).

Vielversprechender ist ein weiteres bioabbaubares Molekül auf Polyacrylat-Basis. Poly(2-N-(dimethylaminoethyl)methacrylat P(DMAEMA) ist der bekannteste Vertreter dieser Strukturklasse und weist eine ähnliche Gentransferrate wie PEI bei geringerer Toxizität auf. Das Molekül wurde 1996 erstmals von Cherng und Kollegen beschrieben (Cherng et al., 1996), wobei seither zahlreiche Modifikationen untersucht wurden (Dubruel and Schacht, 2006). Der große Spielraum an Modifikationen und die bereits langjährige Anwendung in der pharmazeutischen Industrie in Form von Überzugsmaterialien (Eudragite[®], Evonic Deutschland) für perorale Arzneiformen machen Polyacrylate zu beliebten Gentransfervehikeln. Ferner werden Implantate auf Methacrylat-Basis in der Kranioplastik, der Rekonstruktion ausgedehnter Schädeldefekte, eingesetzt und sind für diese Anwendung von der FDA zugelassen.

Genaktivierte Biomaterialien (*Gene Activated Matrices* GAM)

Nicht-virale Genvektoren sowie nanoskalige Trägersysteme können in natürliche oder synthetische Biomaterialien eingebettet werden und lokal als Depotarzneiform appliziert werden. Depotarzneiformen sind Arzneiformen, die

durch eine retardierte Freisetzung des Wirkstoffes charakterisiert sind und vorwiegend subkutan oder intramuskulär angewendet werden. Man unterscheidet je nach verwendetem Material zwischen bioabbaubaren und nicht bioabbaubaren Depotarzneiformen, wobei bei letzteren der Depotkörper am Ende der Therapie wieder entfernt werden muss. Der klinische Erfolg nicht-viraler Gentransfersysteme ist bis heute durch die geringe Effizienz der nicht-viralen Systeme ausgeblieben. Dies spiegelt sich sowohl in einer geringeren Genexpressionsrate, als auch einer geringen Dauer der Genexpression wieder (Nishikawa et al., 2005; Pack et al., 2005). Immer mehr Erkrankungen erfordern allerdings eine transiente und kontrollierte Expression des applizierten Gens, um klinisch relevante Wirkspiegel zu erzielen.

Neben einer wiederholten Applikation von Polyplexen und den damit verbundenen Risiken wie unphysiologischen Proteinspiegeln und die Belastung des Patienten mit Nukleinsäure und Trägermaterial gibt es unterschiedliche Forschungsansätze, eine langanhaltende Genexpression zu erzielen. Eine Möglichkeit besteht in der Entwicklung integrierbarer Vektoren, wobei die große Herausforderung darin besteht, eine insertionelle Mutagenese, wie es für virale Systeme beschrieben wurde (siehe Kapitel 1.2.1), zu verhindern. Alternativ dazu ist die Entwicklung genaktivierter Depotssysteme vielversprechend, deren lokale Applikation zu einem konstanten Nukleinsäurespiegel über einen definierten Zeitraum im Applikationsgebiet führt. Dosierhäufigkeit und Dosismenge könnten dadurch verringert, unerwünschte Nebenwirkungen wie die Transfektion anderer Gewebe, sogenannte „Off-Target-Effekte“, verhindert und die Patientenakzeptanz verbessert werden (Pannier and Shea, 2004).

Injizierbare *in situ* geformte Implantate stellen eine Spezialform der Depotarzneiformen dar. Im Gegensatz zu den konventionellen Implantaten handelt es sich um flüssige injizierbare Formulierungen, die durch Verfestigung des polymeren Trägersystems im Körper ein halbfestes bis festes Depot bilden und den Arzneistoff mit einer definierten Kinetik freisetzen (Hatefi and Amsden, 2002; Packhaeuser et al., 2004). Je nach Trägermaterial und Größe der eingebetteten Komponente erfolgt die Freisetzung aus der Depotarzneiform durch Diffusion der Komponente aus der gebildeten Matrix, durch Erosion der Polymermatrix oder durch Kombination beider. Die Bildung des Implantats *in situ* kann dabei mittels Temperaturänderung (thermoplastische Pasten oder thermogelierende Systeme), durch pH-Verschiebung (pH-induzierte *in situ* Implantate), mittels Polymerisation (radikalisch- oder ionogen-induzierte *in situ* Implantate) oder in Abhängigkeit vom Lösungsmittel (*in situ* Präzipitate) erfolgen. Allen gemein ist, dass es während der Im-

plantatbildung zur Einbettung des Wirkstoffes in die Polymermatrix kommt. Größtes Problem stellt dabei eine unerwünschte, rasche Wirkstofffreigabe bis zur Verfestigung der Matrix dar. Ferner ist eine Kontrolle der Morphologie des Implantats nach erfolgter Injektion nicht möglich, was die Reproduzierbarkeit des Systems erschwert und großen Einfluss auf die Freisetzungskinetik haben kann. Der größte Vorteil der *in situ* Systeme liegt in der Tatsache, dass es sich um eine nicht-invasive Technologie handelt. Im Gegensatz zu herkömmlichen Implantaten erfolgt die Applikation über eine einfache lokale Injektion am Wirkort ohne operative Eingriffe.

Die lösungsmittelabhängige *in situ* Implantatbildung ist die wohl erfolgreichste Strategie, da hohe Temperaturen, reaktive Bestandteile oder extreme pH-Werte vermieden werden können (Keck and Müller, 2009). Die Verfestigung des Implantats erfolgt bei dieser Technologie durch Kontakt eines wasserunlöslichen Polymers gelöst in einer organischen Lösung mit der Gewebeflüssigkeit. Je nach Trägersystem und verwendetem organischem Lösungsmittel kommt es lediglich zu einer Viskositätserhöhung (SABER[®]-Technologie, engl. *Saccharose-acetate-iso-butyrate Extended Release*) oder zur Präzipitation des Trägersystems (Atrigel[®]-bzw. Alzamer[®]-Technologie). Letztere setzen Milchsäure (Poly-l-lactat, PLA) oder ein Copolymer aus Milch- und Glykolsäure (Poly-l-lactat-co-glykolid, PLGA) als Matrixbildner ein, deren Präzipitation sich über die Wahl des Lösungsmittels (Wassermischbarkeit) und des Polymers (Molekülmasse, Zusammensetzung, Konzentration) steuern lässt. Infolgedessen kann die Morphologie der gebildeten Matrix und die Freisetzungskinetik der eingebetteten Komponenten nach Bedarf angepasst werden.

Während die Atrigel[®]-Technologie mit N-methyl-2-pyrrolidon (NMP) ein biokompatibles, gut wassermischbares Lösungsmittel verwendet (Rathbone et al., 2003a), ist die Alzamer[®] Technologie auf schlecht wassermischbare Lösungsmittel fokussiert (Rathbone et al., 2003b). Dabei zeigt sich bei besserer Wassermischbarkeit des organischen Lösungsmittels eine schnellere Implantatbildung und eine gesteigerte Porosität der Matrix, die zu einer beschleunigten Freisetzung der eingebetteten Komponenten führt, jedoch eine erhöhte initiale Freisetzung des Wirkstoffes während der Implantatbildung bewirken kann. Im Gegensatz dazu wird mit dem Einsatz schlecht wassermischbarer Lösungsmittel sowie konzentrierter hochmolekularer Polymerlösungen eine langanhaltende Freisetzung von Makromolekülen ohne initiale Freisetzung erzielt (Brodbeck et al., 1999; Graham et al., 1999; Lambert and Peck, 1995).

Eligard[®], das auf der Atrigel[®] Technologie beruht, ist das momentan einzige Marktprodukt der *in situ* geformten Implantatsysteme. Es handelt sich

dabei um ein subkutan applizierbares Hormonpräparat zur Behandlung von fortgeschrittenem, hormonabhängigem Prostatakrebs. Erste Anwendungen dieser Technologie im Bereich der genaktivierten Biomaterialien gibt es bereits (Elfinger et al., 2008). Interessantester Ansatz ist die Einbettung nanoskaliger Polyplexe in eine *in situ* geformte Matrix auf PLGA-Basis zur lokalen Therapie von soliden Tumoren (Fried et al., 2005). Eine der größten Herausforderung dieser Technologie bleibt allerdings das Auffinden geeigneter Lösungsmittel, um ein verträgliches, *in situ* geformtes Implantat mit reproduzierbarer Freisetzungskinetik zu erzielen.

1.4.2 Verteilung im Organismus

Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Therapie ist der effektive und zielgerichtete Transport des Gentherapeutikums zu den entsprechenden Zielzellen. Ein ideales Trägersystem sollte im Zielgewebe akkumulieren, um die zelluläre Aufnahme der Nukleinsäure zu ermöglichen. Dabei spielen Pharmakokinetik und Biodistribution des Trägersystems eine entscheidende Rolle. Komplexe wie Poly- und Lipoplexe sind nach peroraler Gabe praktisch nicht bioverfügbar, da die elektrostatisch gebundene Nukleinsäure während der Magen-Darmpassage aus dem Vehikel abgetrennt und enzymatisch gespalten wird. Daher müssen diese Trägersysteme

- (1) lokal (intratumoral, subkutan, topisch) oder
- (2) systemisch (intravenös, intraperitoneal)

appliziert werden. Durch die direkte Applikation in das Zielgewebe können störende extrazelluläre Barrieren größtenteils umgangen und die Gefahr systemischer Nebenwirkungen („Off-Target-Effekte“) reduziert werden. Das Trägersystem ist dann direkt im Zielgewebe verfügbar.

Die systemische Applikation ist bis heute eine der größten Herausforderungen für den nicht-viralen Gentransfer. Die Transportvehikel müssen zusätzlich zu den Hürden, die diese bei der lokalen Applikation zu überwinden haben, Kapillarwände passieren, um aus der Blutbahn ins Zielgewebe zu gelangen. Die Anreicherung im Zielgewebe kann dabei durch passives Targeting über eine erhöhte Permeabilität im Zielgewebe (Maeda et al., 2000), wie es beispielsweise für Tumore beschrieben ist, oder durch spezifische Ligand-Rezeptor-Interaktionen (Elfinger et al., 2008) ermöglicht werden (siehe 1.4.4).

Darüber hinaus kann es zu Wechselwirkungen mit den Bestandteilen der Körperflüssigkeiten und der extrazellulären Matrix sowie zu unspezifischen

Interaktionen mit Nicht-Zielzellen kommen (Koshkina et al., 2003). So werden positiv geladene Komplexe nach systemischer Gabe schnell durch unspezifische Absorption negativ geladener Plasmaproteine neutralisiert. Infolgedessen kommt es zur Aggregatbildung mit Akkumulation in First-Pass-Organen wie der Lunge, der Leber oder der Milz (Kircheis et al., 2001) und zu einer schnellen Elimination aus dem Plasma durch phagozytierende Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES). Zum größten Teil geschieht dies durch in der Milz lokalisierten Makrophagen und Makrophagen der Leber, die sogenannten Kupfferschen Zellen. So wurde beobachtet, dass positiv geladene Partikel innerhalb weniger Minuten aus der Blutbahn verschwinden und in den Kupfferschen Zellen der Leber wiedergefunden werden (de Wolf et al., 2005; Lungwitz et al., 2005). Neben der Nettoladung der Komplexe spielt dabei deren Größe und Beschaffenheit eine wichtige Rolle. Mikroskalige Partikel werden im Gegensatz zu nanoskaligen direkt vom RES phagozytiert. Partikel mit einer hydrophoben Oberfläche werden ebenfalls schneller als Fremdkörper erkannt, vom Komplementsystem opsonisiert und über die Zellen des RES eliminiert (MacRitchie, 1972; Stolnik et al., 1995). Um eine ausreichende Plasmahalbwertszeit zu garantieren sollten Poly- und Lipoplexe daher möglichst für diese Zellen unsichtbar erscheinen. Dies kann zum Beispiel durch die Einführung einer „Tarnkappe“ aus Polyethylenglykol (PEG) erfolgen (siehe 1.4.4).

Die Lunge stellt ein interessantes und zugleich wichtiges Zielorgan für die Gentherapie dar. Durch einen erfolgreichen Gentransfer zur Lunge kann die Behandlung vieler akuter oder chronischer Erkrankungen mit genetischer Ursache ermöglicht werden, wobei es sich um eine nicht-invasive schonende Alternative zur systemischen Applikation handelt. Hierfür stehen bereits gut entwickelte Methoden zur Verfügung wie beispielsweise die Applikation als Aerosol (Rudolph et al., 2005) oder die lokale Applikation mittels MicroSpray[®] Aerosolizer (Bivas-Benita et al., 2005). In beiden Fällen werden die Gentransferkomplexe mittels Druck beziehungsweise Ultraschall zu kleinen Aerosoltröpfchen mit einem Durchmesser von circa 0,5-8,0 μm vernebelt oder versprüht. Die Vernebelung von PEI/pDNA Polyplexen führte *in vivo* bereits zur erfolgreichen Transfektion von Atemwegsepithelzellen. Die Effizienz des Gentransfers ist jedoch durch die Anwesenheit von Makrophagen, die eine schnelle alveolaren Elimination der Partikel bewirken, limitiert (Dames et al., 2007; Lombry et al., 2004). Nach intravenöser Gabe von Polyplexen konnte hingegen gezeigt werden, dass die Interaktion mit Blutbestandteilen zur Deposition der Partikel in den Lungenkapillaren und damit zu einer physikalisch bedingten Anreicherung im Lungengewebe führte, dem sogenannten „physical trapping“ (Dash et al., 1999; Ogris et al., 1999; Ver-

baan et al., 2003). Obwohl ein effizienter Gentransfer zur Lunge bereits mit PEI/pDNA-Polyplexen gezeigt werden konnte (Dames et al., 2007; Zou et al., 2000), bleibt es fraglich, wie viele der Partikel letztendlich von der Zelle aufgenommen werden.

1.4.3 Zellaufnahme und intrazelluläre Prozesse

Das Einbringen genetischen Materials in die Zelle mittels nicht-viraler Methoden wird als „Transfektion“ bezeichnet. Gelangt das Trägersystem zur Zielzelle, müssen weitere Barrieren überwunden werden, die eine vitale Zelle besitzt, um sich und das Genom vor Fremdpartikeln zu schützen und eine erfolgreiche Transfektion mit nicht-viralen Genvektoren zu verhindern. Der auf zellulärer Ebene ablaufende Transfektionsprozess kann in folgende Schritte unterteilt werden (Abbildung 1.3) (Medina-Kauwe et al., 2005; Thomas and Klivanov, 2003):

- (1) Zellbindung
- (2) Aufnahme in die Zelle (Internalisierung)
- (3) Freisetzung aus dem endosomalen/ lysosomalen Kompartimenten
- (4) zytosolischer Transport
- (5) Transport in den Zellkern (optional)

Der Aufnahmemechanismus in die Zelle und die intrazelluläre Prozessierung eines nanoskaligen Trägersystems sind bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Ein besseres Verständnis der ablaufenden Prozesse wird langfristig zum Erfolg dieser Technologie beitragen. Die Bindung des Komplexes an die Zelloberfläche kann unspezifisch oder spezifisch über Ligand-Rezeptor-Bindung vermittelt werden. Während die Einführung eines Liganden in das Trägersystem die Effektivität und Spezifität der Aufnahme erhöht (Elfinger et al., 2008), findet die unspezifische Bindung auf Basis elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen Partikeln und Zelloberfläche statt. Partikel mit einer positiven Nettoladung interagieren dabei mit negativ geladenen Glykoproteinen der Zellmembran, die aus einem Kernprotein mit einer oder mehreren kovalent gebundenen Glykosaminoglykan-Seitenketten aufgebaut sind (Proteoglykane, Syndekane) und deren Vorkommen und Dichte vom Zelltyp abhängig ist (Erbacher et al., 1999; Kopatz et al., 2004; Mislick and Balde-schwiler, 1996).

Die Aufnahme der Komplexe erfolgt nach zellulärer Bindung über das Abschnüren kleiner Vesikel von der Zellmembran, die sogenannte Endozytose. In Abhängigkeit der Zielzelle, der Art der Bindung an die Zelloberfläche und der Größenordnung des Trägersystems werden unterschiedliche Aufnahmemechanismen angenommen (Mellman, 1996; Mislick and Baldeschwieler, 1996; Nichols and Lippincott-Schwartz, 2001):

- (1) Phagozytose (mikroskalige Trägersysteme, Antigen-repräsentierende Zellen)
- (2) Makropinozytose („nackte“ pDNA, mikroskalige Trägersysteme)
- (3) Clathrin-abhängige Endozytose (Rezeptor-vermittelte Aufnahme nanoskaliger Trägersysteme)
- (4) Caveolae-abhängige Endozytose (nanoskalige Trägersysteme über unspezifische Zellbindung)

Diese Mechanismen unterscheiden sich dabei hinsichtlich der Aufnahme in die Zelle und der anschließenden intrazellulären Prozessierung. Es ist allerdings davon auszugehen, dass bestimmte Partikel über verschiedene Wege internalisiert werden können. So wird die Clathrin-vermittelte Endozytose vor allem für die rezeptorvermittelte Aufnahme nanoskaliger Trägersysteme beschrieben, kann aber auch für unspezifische Zellbindungen relevant sein wie beispielsweise die Aufnahme von Lipoplexen (Rejman et al., 2005). Ausgelöst durch die Rezeptorbindung kommt es zu einer lokalen Ansammlung von Clathrinstrukturen auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran, die zum Einschluss des Trägersystems in Clathrin-bedeckte Vesikel und einer intrazellulären Prozessierung über Endosomen und Lysosomen führt (Bennett et al., 2001; Mellman, 1996).

Die Caveolae-abhängige Endozytose wird hingegen vor allem für den somatischen Gentransfer und im Falle von einzelsträngigen Oligonukleotiden diskutiert (Gumbleton et al., 2000). Bei den Caveolae handelt es sich um omega-förmige, cholesterol- und sphingolipidreiche Einstülpungen der Zellmembran, die mit dem Membranprotein Caveolin markiert sind (Rothberg et al., 1992) und über einen Cholesterol-abhängigen Weg internalisiert werden. Dieser Endozytoseweg könnte anderen Mechanismen überlegen sein, weil hier die Umgehung des lysosomalen Abbaus möglich ist. Für nanoskalige Polyplexe werden sowohl die Caveolae-abhängige als auch die Clathrin-vermittelte Endozytose beschrieben (Rejman et al., 2005). Mikroskalige Trägersysteme und „nackte“ pDNA hingegen werden vorwiegend durch Makropinozytose internalisiert. Hierbei werden die Partikel an der Zelloberfläche in

inhomogen geformten Makropinosomen eingelagert, die sich aus einer Aktin-gesteuerten Einschnürung der Plasmamembran bilden und ins Zytoplasma ablösen. Makropinosomen können innerhalb der Zelle angesäuert werden, vereinigen sich aber nicht mit Lysosomen.

Innerhalb des endozytotischen Pfades sind die Gentransfersysteme nach der Aufnahme in intrazellulären Vesikeln, sogenannten Endosomen, wiederzufinden. Je nach Aufnahmemechanismus kommt es zu einer anschließenden Prozessierung über späte Endosome bis hin zu Lysosomen. Im späten Endosom sinkt der pH-Wert des vesikulären Lumens vermittelt durch eine ATP-abhängige Protonenpumpe auf Werte unter pH 6. Anschließend verschmilzt das Endosom mit dem Lysosom, dessen pH-Wert noch stärker Richtung pH 5 verschoben ist, dem Wirkoptimum der im Lysosom enthaltenen Enzyme (Luzio et al., 2001). Hauptaufgabe des Lysosoms ist der enzymatische Abbau seines Inhaltes, so dass Gentransfervehikel daher frühzeitig aus dem endosomal-malen Kompartiment ins Zytoplasma freigesetzt werden sollten, um einen lysosomalen Abbau der Nukleinsäure zu vermeiden.

Obwohl Polyplexe aus kationischen Polymeren der ersten Generation (PLL-basierte Polyplexe) ähnlich effizient wie diejenigen der zweiten Generation (PEI-basierte Polyplexe) in die Zelle aufgenommen werden, zeigen sie eine erheblich niedrigere Genexpression (Sonawane et al., 2003; Tiera et al., 2006). Die hohe Gentransferrate von PEI ist im Wesentlichen auf eine gute Pufferkapazität des Polymers über einen weiten pH-Bereich zurückzuführen, wobei die hohe Dichte an protonierbaren Amin-Funktionen (pKa-Werten: 5-7) als eine Art Protonenschwamm fungiert (Boussif et al., 1995). So verfügt das verzweigte PEI über primäre, sekundäre und tertiäre Amine in einem Verhältnis von 1:2:1, wohingegen lineares PEI zum größten Teil aus sekundären Aminen besteht. Von den Atomen des Grundgerüsts stellt somit jedes dritte einen protonierbaren Stickstoff dar, von denen unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) lediglich jedes fünfte oder sechste protoniert vorliegt (Kircheis et al., 2001). Die daraus resultierende gute Pufferkapazität verhindert das Absinken des pH-Wertes innerhalb später Endosomen/Lysosomen und reduziert somit die Effektivität der dort vorhandenen Nukleasen. Die Zelle versucht der Abpufferung durch Steigerung des Protonentransports aus dem Zytoplasma ins Lumen des Endosoms entgegenzuwirken, wobei passiv zusätzlich Chlorid-Ionen zum Ladungsausgleich ins Lumen gelangen und den osmotischen Druck im Endosom/Lysosom derartig erhöhen, dass vermehrt Wasser ins Endosom nach strömt. Dies führt in der Folge zum Platzen des Endosoms/Lysosoms und zur Freisetzung des Vesikelinhalts ins Zytoplasma (Merdan et al., 2002b; Thomas and Klibanov, 2002). Strittig bleibt in die-

sem Zusammenhang allerdings, ob die vorzeitige Freisetzung der Polyplexe aus dem Endosom eine Bildung von späteren Lysomen verhindert oder ob ein Abbau der Polyplexe im Lysosom durch die Pufferkapazität des Polymers verhindert wird.

Nach erfolgreicher Freisetzung ins Zytoplasma muss die Nukleinsäure aus dem Polyplex freigesetzt und zu ihrem Wirkort, im Falle der Plasmid-DNA in den Zellkern, transportiert werden. Über den Transport und die Dissoziation der Nukleinsäure aus dem Komplex ist bis heute wenig bekannt. Kontrovers diskutiert wird, ob die Plasmid-DNA im Zytoplasma vor der Aufnahme aus dem Komplex freigesetzt wird oder ob die Partikel als intakte Polyplexe in den Zellkern gelangen und dort dissoziieren. Für Letzteres spricht die Tatsache, dass bereits intakte PEI/pDNA Polyplexe im Zellkern detektiert werden konnten (Bieber et al., 2002; Godbey et al., 2000, 1999c) und die Plasmid-DNA dadurch effektiv im Zytoplasma vor Nukleasen geschützt bleibt. Im Normalfall würde freie Plasmid-DNA mit einer Halbwertszeit von 90 min im Zytoplasma abgebaut werden (Lechardeur et al., 1999). Allerdings wurde ein Großteil der Polyplexe im perinuklearen granulären Bereich beobachtet (Bieber et al., 2002). Durch direkte Injektion von Polyplexen in den Zellkern konnte ferner bestätigt werden, dass eine Dissoziation im Zellkern möglich und mit hoher Wahrscheinlichkeit während der Transkription durch die DNA-Polymerase vermittelt wird (Pollard et al., 1998). Alternativ wurde beobachtet, dass Nukleinsäure durch intrazelluläre Polyanionen wie beispielsweise mRNA oder lösliche Proteine aus dem Komplex verdrängt und so bereits im Zytoplasma aus dem Komplex freigesetzt werden kann (Bertschinger et al., 2006; Huth et al., 2006; Okuda et al., 2004). In Fällen, in denen das Target im Zytoplasma liegt, wie beispielsweise bei der Verwendung von mRNA oder siRNA, ist die Freisetzung aus dem Komplex im Zytoplasma hingegen eine Voraussetzung für die Wirksamkeit.

In Kapitel 1.2.1 wurde bereits darauf hingewiesen, dass Plasmide aufgrund ihrer Größe nur durch aktiven Transport in den Zellkern gelangen können, da eine passive Diffusion durch den Zellkernporenkomplex lediglich bis zu einer Größenordnung von circa 10 nm möglich ist (Liu et al., 2003b). Unkomplexierte sowie komplexierte Plasmid-DNA ist ungefähr 5 bis 10-fach größer. Ferner ist der Zellkern während der Mitose beziehungsweise in Phasen, die der Zellteilung vorausgehen und in denen die Kernmembran noch nicht vollständig ausgebildet ist (S- oder G₂-Phase), für die Plasmid-DNA frei zugänglich. Findet die Transfektion daher während der Zellteilung statt, so kommt es zu einer 500-fach höheren Genexpression verglichen mit einer Transfektion während Phasen ohne Zellteilung (Brunner et al., 2000).

1.4.4 Modifikation von Polyplexen zur Steigerung der Gentransfereffizienz

Es gibt vielfältige Bestrebungen, den nicht-viralen Gentransfer mit Hilfe von Modifikationen des Trägersystems oder der Nukleinsäure selbst effizienter zu gestalten. In diesem Kapitel soll lediglich auf die pharmazeutisch-technologischen Herausforderungen zur Verbesserung des Trägersystems eingegangen werden, während die Wahl der geeigneten Nukleinsäure und deren Modifikation bereits in Kapitel 1.2.1 betrachtet wurden.

Im Bereich der nicht-viralen Trägersysteme verläuft die Entwicklung hin zu neuartigen biokompatiblen Materialien mit dem Anspruch, diese vor allem effizienter als die derzeit verwendeten Trägersysteme zu gestalten und sogenannte künstliche Viren zu modellieren. Bereits durch die Kopplung funktioneller Peptide an kationische Trägersysteme (Polymer-Polypeptid-Konjugate) gelang es, die Effizienz der Trägersysteme zu steigern (Martin and Rice, 2007). Eine Vielzahl an unterschiedlichen Einflussmöglichkeiten sind in diesem Zusammenhang denkbar, wovon einige Beispiele in Tabelle 1.3 zusammengestellt sind und im Folgenden näher erläutert werden.

Zellpenetrierende Peptide (engl. *Cell Penetrating Peptide*, CPP) werden eingesetzt, um die Aufnahme von Makromolekülen in die Zelle unter Umgehung des endosomolytischen Aufnahmemechanismus zu ermöglichen. Darüber hinaus kann die Aufnahme in den Zellkern über Kernlokalisierungssequenzen (engl. *Nuclear Localization Signal*, NLS) gesteigert werden (Cartier and Reszka, 2002; Chan and Jans, 2002). Verwendet werden in diesem Zusammenhang häufig virale Proteintransduktionsdomänen. Bekanntester Vertreter ist das TAT-Peptid aus dem HI-Virus, das CPP und NLS in einem Peptid vereint und bereits für den intrazellulären Transport von Nukleinsäuren in unterschiedlichen Vehikeln wie in Nanopartikeln (Rudolph et al., 2004), Lipoplexen (Hyndman et al., 2004) und Polyplexen (Kleemann et al., 2005; Rudolph et al., 2003; Soundara Manickam et al., 2005; Suk et al., 2006) *in vitro* und *in vivo* erfolgreich eingesetzt wurde. Untersuchungen zum Aufnahmemechanismus zellpenetrierender Peptide wie dem TAT-Peptid wurden zahlreich durchgeführt und deren Ergebnisse kontrovers diskutiert. Früher ging man davon aus, dass diese Peptide über spezielle Translokationseigenschaften verfügen und dank starker Wechselwirkungen mit der Zelloberfläche die Membran direkt passieren können. Heutzutage glaubt man allerdings an eine Überlagerung unterschiedlicher endozytotischer Prozesse, die in Abhängigkeit der eingesetzten Formulierung variieren. Während die Aufnahme liposomaler TAT-Formulierungen (Fretz et al., 2004) und kationischer Polymer-TAT Konjugate

(Hashida et al., 2004) über klassische Chloroquin-beeinflussbare endozytische Prozesse erfolgt, werden für das reine TAT-Peptid zusätzliche Aufnahmemechanismen diskutiert (Kaplan et al., 2005; Richard et al., 2005). Ferner kann durch Kopplung zellspezifischer Polypeptide die zelluläre Aufnahme auf natürlichem Weg erzwungen (Rezeptor-Liganden-Interaktionen) und der Gentransfer dadurch spezifischer und gleichzeitig effizienter gestaltet werden.

Erfolgt die Aufnahme der Polyplexe über Endozytose, so kann die Freisetzung aus dem Endosom über unterschiedliche Ansatzpunkte vermittelt werden. Zum einen besteht die Möglichkeit, die Freisetzung aus dem Endosom durch Erhöhung der Pufferkapazität des Polymers zu steigern (Bello Roufaï and Midoux, 2001; Midoux et al., 2002). Auf der anderen Seite können Peptide eingesetzt werden, die mit der Endosomenmembran fusionieren und zur Porenbildung in der Membran führen. Die Komplexe können anschließend durch die löchrige Membran ins Zytoplasma diffundieren. Es handelt sich dabei meist um integrale Membranproteine wie das Hämagglutinin des Influenzavirus, auch als Influenzapeptid (INF-Peptid) bezeichnet. In Tabelle 1.3 angegeben ist die Sequenz des INF7-Peptids, einer abgespeckten Variante des Influenzapeptids. Darüber hinaus werden aber auch rein synthetische Peptide wie das KALA-Peptid eingesetzt. Allen gemein ist eine Konformationsänderung bei absinkendem pH-Wert, die zu einer α -helikalen Struktur mit amphiphilem Charakter führt und eine Interaktion mit der Endosomenmembran ermöglicht (Deshayes et al., 2005; Mahat et al., 1999).

Eine zusätzliche Herausforderung der nicht-viralen Gentherapie liegt darin, die Stabilität der Formulierungen zu verbessern und die Halbwertszeit nach intravenöser Gabe zu verlängern. Eine Möglichkeit hierfür ist die Konjugation mit inertem, biokompatiblen Polyethylenglykol (PEG), kurz PEGylierung. Bereits in den 70er Jahren wurde diese Methode für Proteine beschrieben (Davis et al., 1978) und gehört heute zum Standard für eine Vielzahl biopharmazeutischer Wirkstoffe (Delgado et al., 1992). PEG ist ein lineares, ungeladenes, hydrophiles Polymer mit einer variablen Molekülmasse im Bereich von wenigen 300 Dalton bis hin zu 10.000 kDa, das aus sich wiederholenden Einheiten von Ethylenglykol (EG) besteht. Ab einer Molekülmasse von über 20 kDa wird PEG auch als Polyethylenoxid (PEO) bezeichnet. Durch seine vielseitige Anwendbarkeit kombiniert mit äußerst geringer Toxizität und Immunogenität ist PEG in der Lebensmittel-, Kosmetik- und pharmazeutischen Industrie sehr beliebt und ist in der pharmazeutischen Industrie als Hilfsstoff für Parenteralia von der FDA zugelassen.

Die Einführung von EG-Einheiten in das Trägersystem kann über i) die

Bezeichnung	Sequenz	Referenz
<i>Zellpenetrierend</i>		
HIV 1 TAT	YGRKKRRQRRR	(Snyder and Dowdy, 2004)
ANTP	RQIKIWFQNRRMKWKK	(Snyder and Dowdy, 2004)
R7W	RRRRRRRW	(Thorén et al., 2004)
<i>Fusogen</i>		
INF 7	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGGGC	(Plank et al., 1994)
Mellitin		Ogris et al., 2001a3
TAT(48-60)	GRKKRRQRRRPPQ	(Rudolph et al., 2003) (Brooks et al., 2005)
GALA	WEAALAEALAEALAEH	(Plank et al., 1994)
	LAEALAEALEALAA	(Haensler and Szoka, 1993)
KALA	WEAKLAKALAKALA	(Merdan et al., 2002b)
	KHLAKALAKALKACEA	
<i>Endosomolytisch</i>		
Histidin-reiche Sequenz	H5WYG	(Midoux et al., 2002)
<i>Kernlokalisierungssequenz</i>		
SV40	PKKKRKV	(Merdan et al., 2002b)
Nukleoplasmin	KRPAATKKAGQAKKKK	(Merdan et al., 2002b)
<i>Zellspezifisch</i>		
RGD-4C	CDCRGDDCFC	(Brown, 2000)
EGF	NSDSECLPLSHDGYCLHDGVCMYIEALD- KYACNCVVGYGIGERCQYRDLKWWELR	(Merdan et al., 2002b)
Integrine	PLAEIDGIELTY	(Schneider et al., 1998)

Tabelle 1.3: Verwendete Peptidsequenzen für den nicht-viralen Gentransfer

Herstellung von Copolymeren (Prä-PEGylierung), ii) durch physikalische Adsorption (elektrostatische Anziehung oder Van-der-Waals Kräfte) oder durch iii) kovalente Kopplung mit funktionellen Gruppen an der Partikeloberfläche (Post-PEGylierung) erfolgen. Die Prä-PEGylierung hat dabei den Vorteil, dass der PEG-Anteil im Polymer gut steuerbar ist und gleichzeitig die Stabilität und die Wasserlöslichkeit des Polymers verbessert werden kann (Katayose and Kataoka, 1997; Ogris et al., 2003). Allerdings können durch Einführung der EG-Einheiten die Komplexierungseigenschaften des Polymers verändert werden. Im Gegensatz dazu ist eine PEGylierung der bereits geformten Komplexe zeitaufwendig und die Menge an gebundenem PEG schlecht kontrollierbar. Allen gemein ist die Abschirmung der Partikeloberfläche durch eine inerte PEG-Schicht, der sogenannten Tarnkappe („Stealth“-Effekt), mit folgenden Auswirkungen:

- (1) Reduktion der Interaktionen mit Blutbestandteilen (Ogris et al., 1999; Stolnik et al., 1995)
- (2) Reduktion der Immunogenität (verhindert die Aktivierung des Komplementsystems (Katayose and Kataoka, 1998))
- (3) Reduktion der Toxizität (Katayose and Kataoka, 1998; Sieverling, 2005)
- (4) Erhöhung der kolloidalen Stabilität der Komplexe (Kichler et al., 2002)
- (5) verbesserter Schutz der Nukleinsäure vor enzymatischem Abbau (Katayose and Kataoka, 1998)

Die sterische Stabilisierung der Komplexe durch eine schützende PEG-Hülle führte nach systemischer Gabe zu einer signifikanten Erhöhung der Plasmahalbwertszeit und in Kombination mit der Einführung eines Liganden zu einer Verbesserung der Gentransfereffizienz gegenüber nicht pegylierten Komplexen (Kichler et al., 2002; Ogris et al., 1999; Walker et al., 2005). Lange Plasmahalbwertszeiten sind ferner Voraussetzung für passives Targeting in Tumore (siehe 1.4.2).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Nicht-virale Gentransfersysteme stellen bezüglich Immunogenität und Integrationsgefahr ins Genom eine sichere Alternative zu den viralen Genvektoren dar. Ein limitierender Faktor für den Erfolg des nicht-viralen Gentransfers ist das Fehlen geeigneter Transfersysteme mit ausreichender Effizienz. Innerhalb der Gruppe der kationischen Polymere ist das Verhältnis zwischen Effizienz

und Toxizität bis heute noch nicht zufriedenstellend gelöst.

Gegenstand des ersten Teils dieser Arbeit war daher die Entwicklung maßgeschneiderter bioabbaubarer Polymer-Polypeptid Konjugate als neue Gentransfervektoren für den nicht-viralen Gentransfer. Diese Polymere basierten auf einem Methacrylat-Rückgrat und waren aus i) einem kationischen Anteil, ii) einem Oligoethylenglykol (OEG-Anteil) und iii) einem Polypeptid zusammengesetzt. Die Polymere sollten als Genvektoren für den Transfer von unterschiedlichen Nukleinsäuren getestet werden, wobei der Fokus auf dem Transfer von Plasmid-DNA lag. Eine schematische Zusammensetzung der chimären Makromoleküle ist in Abbildung 1.4 dargestellt. Im ersten Schritt wurde der Einfluss des PEGylierungsgrades (Block A, B) auf die Komplexierungseigenschaften und Toxizität der Polymere, die Stabilität der Komplexe und deren Gentransfereffizienz untersucht. Copolymere mit optimalem PEGylierungsgrad konnten anschließend *in vivo* getestet und durch Veränderung des Polymerdesigns (Block A, B, C) in Ihrer Effizienz optimiert werden.

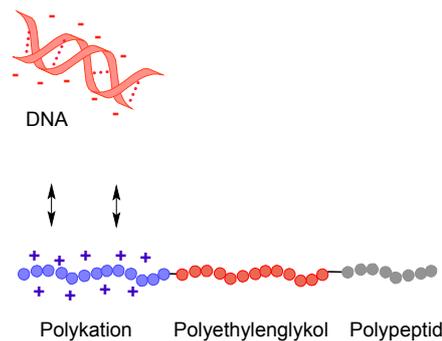


Abbildung 1.4: Design chimärer Polymer-Peptid-Konjugate

Für den Erfolg der Gentherapie ist eine zeitlich kontrollierte Expression beziehungsweise Ausschaltung des Gens in entsprechender Höhe erforderlich. Der zweite Teil dieser Arbeit fokussierte sich daher auf die Entwicklung eines Depotsystems zur kontrollierten Freisetzung von Gentherapeutika mit folgenden Anforderungen:

- (1) zeitlich kontrollierte Genexpression oder Inhibierung der Genexpression durch kontrollierte Freisetzung der Nukleinsäure aus der Arzneiform
- (2) Verwendung biokompatibler und bioabbaubarer Komponenten
- (3) eine *in situ* Bildung der Arzneiform sollte eine flexible Anwendung ermöglichen

(4) die Arzneiform muss sterilisierbar sein

Im Detail sollte ein genaktivierter *in situ* gebildeter Film entwickelt werden, der später durch einfaches Aufsprühen lokal angewendet und unter anderem für die Therapie peritonealer Verwachsungen (siehe 4.5.1) eingesetzt werden kann.

Kapitel 2

Materialien und Methoden

2.1 Materialien

In diesem Abschnitt sind alle für diese Arbeit verwendeten Materialien aufgeführt. Eine Übersicht geordnet nach Reagenzien und Chemikalien, Kits, Oligonukleotiden, Enzymen, Antikörpern und Arzneistoffen geben Tabelle 2.1 bis 2.6. Die Synthese der verwendeten Oligonukleotide erfolgte von der Firma Metabion. Die im Folgenden genannten Chemikalien wurden von der Firma Sigma-Aldrich, Deutschland bezogen und sind nicht in Tabelle 2.1 aufgeführt: Alsevier´s Solution, Bafilomycin A1, Brillantblau G, Bromphenolblau, Chloroquin-diphosphat, Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Heparansulfat, 4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure (HEPES), Magermilchpulver, Mannose, $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}_2 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, (MgSO_4) , NaCl, Poly(2-ethyl-2-oxazoline), Polyethylenimin (verzweigt, 25 kDa), Saccharose, Tricin, Triton-X 100, Trypanblau, Tween 20, Xylencyanol FF.

Arzneistoff	Hersteller
Atipamezol 5 mg/ml	Orion Pharma, Finnland
Dexamethason 4 mg/ml	Ratiopharm, Deutschland
Fentanyl 0,1 mg/ml	Janssen Cilag, Deutschland
Flumazenil 0,1 mg/ml	Deltaselect, Deutschland
Isofluran	Abbott, Deutschland
Medetomidin 1 mg/ml	Orion Pharma, Finnland
Midazolam 15 mg/3 ml	Ratiopharm, Deutschland
Naloxon 0,4 mg/ml	Hameln Pharma plus, Deutschland

Tabelle 2.1: Verwendete Arzneistoffe

Antikörper	Hersteller
Maus-Anti-alpha-Aktin	Chemicon, Deutschland
Maus-anti-huPAI-1 monoklonal (3785)	American Diagnostics, Deutschland
Maus-anti-hutPA monoklonal	Calbiochem, Deutschland
Ziege-anti-Maus HRP-konjugiert	Bio-Rad Laboratories, Deutschland

Tabelle 2.2: Antikörper für den Western Blot

Bezeichnung	Hersteller
ATPlite Luminescence Detection Assay	Pekin Elmer, USA
ECL [™] Chemiluminescence	Amershan Bioscience, USA
Human tPA Total Antigen Assay	Dunn Labortechnik, Deutschland
Mini Nucleospin [™] Plasmid	MACHEREY-NAGEL, Deutschland
NucleoBond PC 2000 EF	MACHEREY-NAGEL, Deutschland
NucleoSpin-Extract [™] II	MACHEREY-NAGEL, Deutschland
NucleoSpin Plasmid [™]	MACHEREY-NAGEL, Deutschland
Ready-To-Glow [™] Reporter Assay	Clontech, USA/Kanada
Topo [®] - XL PCR Cloning	Invitrogen, Großbritannien

Tabelle 2.3: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
Kontrolle pCMV-tPA	
BamHI	New England Biolabs Inc., USA
XbaI	Fermentas, Deutschland
XhoI	Fermentas, Deutschland
Klonierung pCMV-tPA-IRES-Luc	
MluI	New England Biolabs Inc., USA
FseI	New England Biolabs Inc., USA
T4 DNA Ligase	Fermentas, Deutschland
AccuPrime [™] Taq DNA Polymerase High Fidelity	Invitrogen, Großbritannien
Polymerase T4	Fermentas, Deutschland

Tabelle 2.4: Verwendete Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Biozym Diagnostik, Deutschland
Adenosintriphosphat (ATP)	PJK, Deutschland
Coenzym A	PJK, Deutschland
Complete [®] Protease Inhibitor	Roche Diagnostics, Deutschland
D-Luziferin	Synchem OHG, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (D-PBS)	Invitrogen, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	GE Healthcare, Deutschland
Ellmans Reagenz	Pierce, USA
Ethanol 96 % p.a.	Merck, Deutschland
Ethidiumbromid	Bio-Rad Laboratories, Deutschland
Gelelektrophorese DNA Ladder 1kbp	PlasmidFactory, Deutschland
Glycin PUFFERAN [®] 99 %, p.a.	Roth Laborbedarf, Deutschland
HCL	Merck, Deutschland
Kanamycin-SO4	Gibco-BRL, Großbritannien
Lipofectamin [™] 2000	Invitrogen, Deutschland
Methanol	Merck, Deutschland
Nonidet P-40	Roche Diagnostics, Deutschland
Precision Plus Protein [™] Standards	Bio-Rad Laboratories, Deutschland
Propidiumiodid	Molecular Probes, Niederlande
QuantiLum [®]	Roche Diagnostics, Deutschland
Rhesomer [®] RG	Boehringer-Ingelheim, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Deutschland
Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer 50x	Gibco-BRL, Großbritannien
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	VWR International, Österreich
TOTO-1 iodid	Molecular Probes, Niederlande
Wasser für Injektionszwecke (WfI)	Baxter, Deutschland

Tabelle 2.5: Reagenzien und Chemikalien

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Anwendung
tPA for-35	gaa gga gca agc cgt gaa ttt aag gg	Sequenzierung
tPA for-711	aca gtg act gct act ttg gga atg	Sequenzierung
tPA for-1052	atc ttt gcc aag cac agg agg tc	Sequenzierung
tPA for-1448	ttc tat tcg gag cgg ctg aag gag	Sequenzierung
tPA for-1991	cat gaa tgc aca cta gcc tct c	Sequenzierung
tPA rev-159	ttc tga atc ggg cat gga ttt c	Sequenzierung
CMV-tPA for-855	gtg tac ggt ggg agg tct ata taa gc	Sequenzierung
MluI-tPA for1	cga acg cgt cga taa gct ggc cca ttg c	PCR Klonierung
MluI-tPA for2	cga acg cgt cga taa gct tgg	PCR Klonierung
FseI-tPA rev1	ggc cgg cct cta gag tca get tgg	PCR Klonierung
FseI-tPA rev2	ggc cgg cct cta gag tca gct tg	PCR Klonierung

Tabelle 2.6: Verwendete Oligonukleotide

2.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

Alle für diese Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und Geräte sind in Tabelle 2.7 und 2.8 aufgelistet.

Name	Hersteller
6-/24- Well Platten (steril, durchsichtig)	TPP, Schweiz
24- Well Platten (schwarz, durchsichtiger Boden)	Genetix, Deutschland
96- Well Platten (weiß)	TPP, Schweiz
96- Well PCR Platten	TPP, Schweiz
Amersham Hyperfilm ECL (Western Blot)	GE Healthcare, Deutschland
Duploject Spray Set	Baxter AG, Deutschland
FACS Rörchen (12/75 PS rund)	Josef Peske, Deutschland
Halb-Mikro/Makro Küvette	Greiner Bio-One, Deutschland
Insulinspritzen 1ml (29G)	BD Biosciences, Deutschland
Millicell Hanging Cell Culture Inserts 1 μ m	Millipore, USA
PVDF Membran	Millipore, USA
Ready Gels 7,5 % Tris-HCl	Bio-Rad, Deutschland
SafeSeal-Tipps Professional	Biozym Scientific
Tubes 1,5/2 ml	Greiner Bio-One, Deutschland
Tubes 10/50 ml	BD Falcon, USA
Zellkulturflaschen 25/75 cm ²	BD Falcon, USA
ZelluTrans T2 MWCO 8-10 kDa	Carl Roth, Deutschland

Tabelle 2.7: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Axiovert 135 Epifluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss, Deutschland
BioRad GenPulser II Gerät	Bio-Rad Laboratories, Deutschland
Bio-Photometer	Eppendorf, Deutschland
90 Plus Partikelgrößenmessgerät	Brookhaven Instruments, Österreich
ZetaPALS Analyzer	Brookhaven Instruments, Österreich
Brutschrank	Heraeus Instruments, Deutschland
Elektronenmikroskop CM200 FEG	Philips/FEI, Niederlande
Elektrophorese Analyse Sys Kodak EDAS 290	Kodak, Deutschland
Elektrophoresekammer WB	Bio-Rad Laboratories, Deutschland
FACScan	Becton Dickinson, Deutschland
Gefriertrocknungsanlage Lyovac GT 2	LH Leybold, Deutschland
Gelelektrophorese-Kammer Horizon	Gibco-BRL, Grossbritannien
Heizblock Thermomixer compact	Eppendorf AG, Deutschland
Glashomogenisator (zylindrisch mit Pistille)	Schütt Labortechnik, Deutschland
iCycler iQ	Eppendorf AG, Deutschland
Inkubator-Shaker Excella E24	New Brunswick Scientific Inc., USA
IVIS 100 <i>in vivo</i> imaging system	Xenogen Inc., USA
Luminometer Lumat LB9507	EG& C Berthold, Deutschland
Lichmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Deutschland
MasterCycler	Eppendorf, Deutschland
Microspray [®] Aerosolizer FMJ-250	PennCentury-Inc., USA
NanoDrop-1000	PEQLAB Biotech, Deutschland
pH-Meter pH 330i	WTW, Deutschland
Polymax Schüttler 1040	Heidorf, Deutschland
Spannungsquelle WB	Bio-Rad, Deutschland
Speed-Vac Vakuumanlage	Dieter Piatkowski, Deutschland
Sterilbank	Heraeus Instruments, Deutschland
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Deutschland
Präzisionswaage	Ohaus, Deutschland
Tissomat	Baxter, Deutschland
Ultra-Turrax [®]	Ika Labortechnik, Deutschland
Ultrospec 3100 Pro Spektralphotometer	Amersham Biotech, Deutschland
Vortexer MS2 Minishaker	Ika, Deutschland
Wallac Victor ² 1420 Multilabel Counter	PerkinElmer Inc., USA
Wasserbad	GFL, Deutschland
Zetasizer Nano	Malven Instruments, Deutschland

Tabelle 2.8: Verwendete Geräte

2.3 Lösungen und Puffer

Für die Arbeit wurden Puffer und Lösungen mit folgender Zusammensetzungen verwendet. Alle Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt.

<u>Hepes gepufferte Lösung (HBS)</u>		<u>Waschpuffer (Western Blot)</u>	
NaCl	150 mM	Tris/HCl pH 7.4	20 mM
Hepes/HCL pH 7,4	10 mM	NaCl	137 mM
		Tween20	0,1 %
<u>10x Zellysepuffer (Luziferase Assay)</u>		<u>Absättigungspuffer (Western Blot)</u>	
Tris/HCl pH 7.8	250 mM	Milchpulver	5 %
Triton-X 100	0,1 %	in Waschpuffer für Western Blot	
<u>Zellysepuffer (Western Blot)</u>		<u>6x DNA-Ladepuffer (Agarosegele)</u>	
Tris/HCl pH 7.4	50 mM	Bromphenolblau	0,25 %
EDTA	5 mM	Glycerol	30 %
NaCl	150 mM	Xylencyanol FF	0,25 %
Triton-X 100	1 %		
Protease Inh. Complete®	1x		
DTT	1 mM		
<u>Auftragspuffer 4x (Western Blot)</u>		<u>Luziferin-Substrat</u>	
Tris/HCl pH 7.4	130 mM	D-Luciferin	470 μ M
Glycin	20 %	Coenzym A	270 μ M
SDS	10 %	DTT	33,3 mM
Bromphenolblau	0,06 %	ATP	530 μ M
DTT	4,0 %	(MgCO ₃) ₄ Mg ₂ x5 H ₂ O	1,07 mM
		MgSO ₄	2,67 mM
<u>Laufpuffer (Western Blot)</u>		EDTA	0,1 mM
Tris	25 mM	Tricin	20 mM
Glycin	192 mM		
SDS	0,1 %		

2.4 Zellkultur

2.4.1 Verwendete Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden in dieser Arbeit verwendet (Tabelle 2.9).

Zelllinie	Zelltyp	Bezugsquelle
A549	Alveolar-ähnliche Epitelzellen Typ 2 (human)	DSMZ, Deutschland (ACC 107)
BEAS-2B	Bronchialepitelzellen (human)	ATCC, Deutschland (CRL-9609)
MLE-12	Alveolar-ähnliche Epitelzellen Typ 2 (murin)	ATCC, Deutschland (CRL-2110)
Met5A	pleurale Mesothelialzellen (human)	ATCC, Deutschland (CRL-9444)

Tabelle 2.9: Verwendete Zelllinien

2.4.2 Kultivierungsbedingungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie sind adhärent und wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zelllinien A549, BEAS-2B und MLE-12 wurden in MEM kultiviert, wohingegen für die Kultivierung der Met5A Zelllinie in einer 1:2 Mischung aus M199 und MCDB 105 Medium erfolgte, dem zusätzlich epidermaler Wachstumsfaktor (5 ng/ml) und Hydrocortison (400 ng/ml) zugesetzt wurden (Arbeiter et al., 2001). Alle Medien wurden mit jeweils 10 % fötalem Kälberserum (engl. *Fetal Calf Serum*, FCS) versetzt, um den Zellen die nötigen Wachstumsfaktoren zuzuführen.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen zuerst in einer 25 cm²-Zellkulturflasche kultiviert und dann in eine größere 75 cm²-Zellkulturflasche umgesetzt. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Bei einer Konfluenz von circa 80 % wurden die Zellen wie folgt passagiert. Das alte Medium wurde verworfen, die Zellen mit PBS frei von Calcium- und Magnesiumionen gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA bei 37°C vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Ein Teil der gelösten Zellen wurde entnommen und frisches Medium zugefügt. Das im Medium enthaltene Serum führt dabei zur Inaktivierung des Trypsins. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bis zu einer Passage von 20, um die Transfizierbarkeit der Zellen zu erhalten und Mutationen zu verhindern. Danach wurden die Zellen vernichtet. Alle für die Zellkultur verwendeten Kulturmedien und Medienzusätze sind in Tabelle 2.10 aufgeführt.

2.5 Nukleinsäuren

2.5.1 Plasmide

Ein Plasmid besteht im Allgemeinen aus folgenden Funktionselementen: Promotor (Transgenregulation), Transgen, Intron (Erhöhung der Expressionsra-

Name	Hersteller
FCS	PPA Laboratories, Österreich
Gentamycin	Gibco-BRL, Grossbritannien
Humaner epidermaler Wachstumsfaktor (hEGF)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, Deutschland
M199	Gibco-BRL, Grossbritannien
MCDB	Sigma-Aldrich, Deutschland
Minimal Essential Medium (MEM)	Gibco-BRL, Grossbritannien
Pencillin - Streptomycin	Gibco-BRL, Grossbritannien
Trypsin-EDTA	Gibco-BRL, Grossbritannien

Tabelle 2.10: Kulturmedien und Zusätze

te), PolyA-Signal (Stabilisierung der transkribierten mRNA), Replikationsursprung und Selektionsgen (Amplifikation in Bakterien). Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide mit den jeweiligen Funktionselementen sind in Abbildung 2.1 dargestellt.

Das Plasmid pCMVLuc (Abb. 2.1(a)) wurde freundlicherweise von Prof. Ernst Wagner (Pharmazeutische Biologie, Department für Pharmazie, LMU) zur Verfügung gestellt (Plank et al., 1992). Es enthält das Luziferase-Gen (Luc) der Feuerfliege (*Photinus pyralis*) unter der Kontrolle des CMV-Promotors und wurde für alle *in vitro* Versuche zur Charakterisierung chimärer Polymer-Polypeptide Konjugate verwendet. Die *in vivo* Versuche wurden mit dem Plasmid pCpGLuc (Abb. 2.1(c)) durchgeführt. Bei diesem Plasmid wurde ein Luziferase-Gen durch PlasmidFactory GmbH in einen CpG-freien Vektor kloniert, wobei ein Fusionsgen aus Luziferase und Zeocin entstand (Luc-Sh). Die Abwesenheit von CpG-Motiven wurde im Tierversuch als weniger immunogen beschrieben (Krieg, 1999; Yew et al., 2000).

Das Konstrukt pMetLuc (Abb. 2.1(b)) wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. C. Plank (Experimentelle Onkologie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München) zur Verfügung gestellt. Es enthält das Luziferase-Gen des Ruderflussskreb *Metridia longa* (Markova et al., 2004), ein sezerniertes Luziferase-Enzym. Das Plasmid wurde zusammen mit dem selbst klonierten Plasmid pCMV-tPA-IRES-Luc (Abb. 2.1(d)) als Kontrollplasmid für die Freisetzungsstudien im zweiten Teil der Arbeit verwendet. Letzteres kodiert unter der Kontrolle des CMV-Promotors für den gewebespezifischer Plasminogenaktivator (engl. *Tissue Plasminogen Activator*, tPA) und das Luziferase Enzym der Feuerfliege. Die im Plasmid eingefügte interne ribosomale

Eintrittsstelle (engl. *Internal Ribosomal Entry Site*, IRES) vermittelt ohne weitere sogenannte Initiationsfaktoren die Bindung des Luziferasetranskripts (Luziferase mRNA) an die Ribosomen. Dadurch kann die Synthese unmittelbar gestartet werden und beide Proteine unabhängig voneinander als funktionelles Protein translatiert werden.

Kontrollvektoren wie das pUC21 Plasmid enthalten keine Expressionskassette und bestehen nur aus dem bakteriellen Rückgrat. Daher wurde auf die Darstellung verzichtet.

Klonierung von pCMV-tPA-IRES-Luc

Zur Klonierung des Plasmids pCMV-tPA-IRES-Luc (Abb. 2.1(d)) wurde der pIRES-Luc Vektor (Abb. 2.1(f)) verwendet, der freundlicherweise von Herrn Dr. Ohsako (Medical Faculty, University of Tokio, Japan) zur Verfügung gestellt wurde (Sakata et al., 2007). In diesen Vektor wurde die für tPA-kodierende Sequenz unter der Kontrolle des CMV-Promotors mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen MluI und FseI hinein kloniert. Hierzu wurde die Sequenz (Insert) aus dem Expressionsvektor pCMV-tPA (Sakamoto et al., 1999), der freundlicherweise von Herrn Dr. Nakagawa (Department of Pathology, Kysuhu University, Japan) zur Verfügung gestellt wurde, mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) amplifiziert. Der Reaktionsansatz enthielt die DNA-Matrize pCMV-tPA, spezifische Vorwärts- und Rückwärtsprimer (siehe 2.3), AccuPrime™ *Taq* DNA-Polymerase High Fidelity und Reaktionspuffer mit Desoxyribonukleosid-Triphosphaten (dNTPs, AccuPrime™ PCR Buffer 1 und 2). Letztere waren zusammen mit der *Taq* DNA Polymerase im AccuPrime™ *Taq* DNA-Polymerase High Fidelity Kit enthalten. Die PCR-Reaktionen wurden mit einer initialen Denaturierung der DNA-Matrize bei 94°C für 2 min in einem MasterCycler (Eppendorf AG, Deutschland) gestartet. Daraufhin folgten 30 Zyklen aus Denaturierung, Annealing und Elongation. Die zyklische Denaturierung wurde ebenfalls bei 94°C für 1 Minute durchgeführt. Das Annealing der Primer verlief bei 60,5°C (Primerpaar 2) beziehungsweise 65°C (Primerpaar 1) für 1,5 min. Der Elongationsschritt erfolgte anschließend bei 68°C für 3 Minuten. Die Zeit der Elongation richtet sich nach der Synthesegeschwindigkeit der Polymerase und der Länge des PCR Produkts und wurde jeweils mit einer Minute pro 1 kbp berechnet. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese (0,8 %iges Agarosegel mit 1 % Ethidiumbromid, 125 V, 1,5 h) aufgetrennt und unter Verwendung des NucleoSpin-Extract II Kit aus dem Gel isoliert.

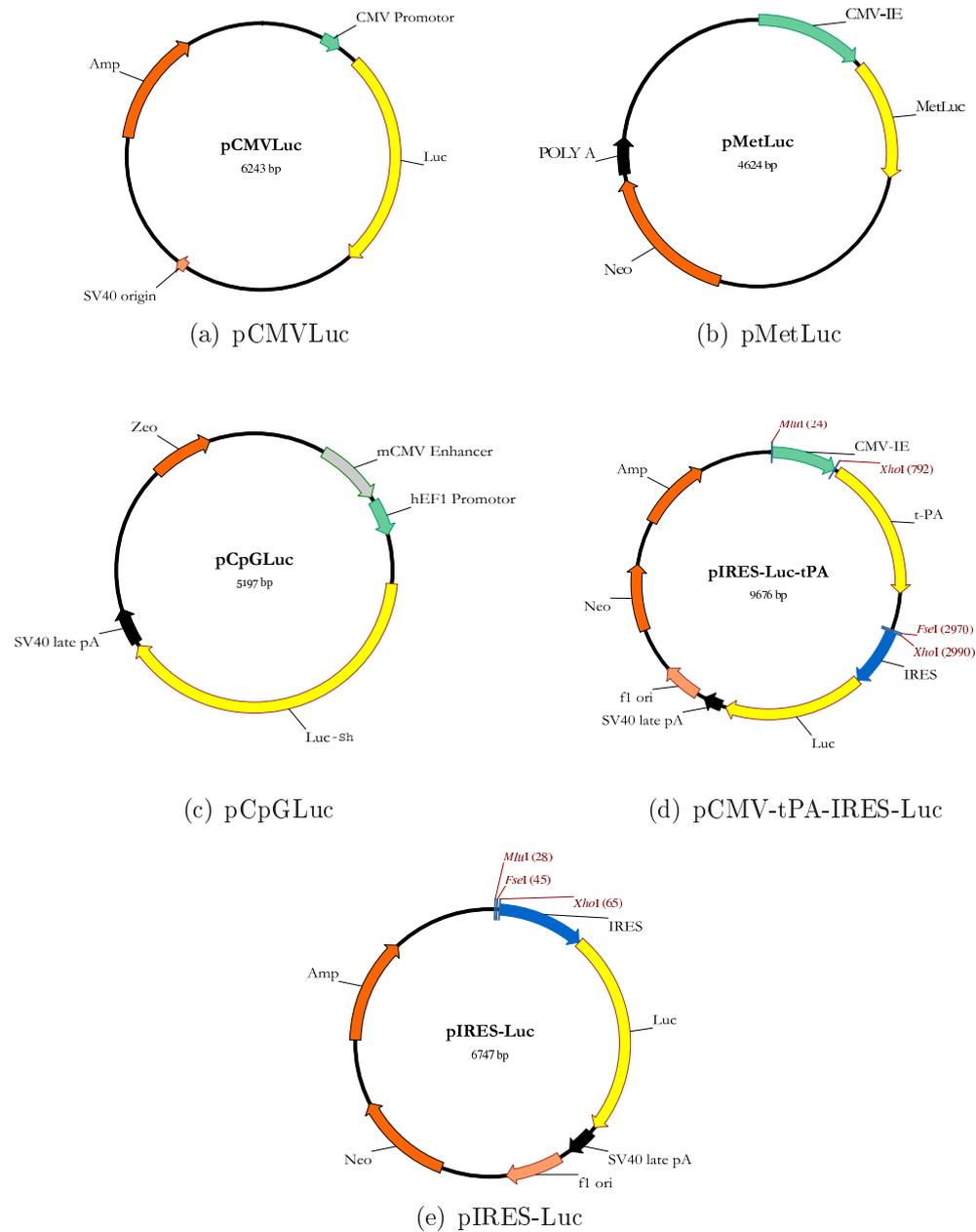


Abbildung 2.1: Verwendete Plasmide

Um die Klonierung des gewünschten DNA-Fragments effizienter zu gestalten, wurden die isolierten Fragmente zuerst in einen Hilfsvektor pCR[®]-XL-TOPO[®] (Topo[®]-XL PCR Cloning Kit) nach Angaben des Herstellers kloniert, um anschließend unter Verwendung chemisch kompetenter Zellen (XL10-Gold[®], Stratagene, Niederlande) durch Hitzeschock bei 42°C für 90 sec transformiert zu werden. Die transformierten Zellen wurden bis zur Ausbildung der entsprechenden Antibiotika (AB)-Resistenz für eine Stunde in AB-freiem LB-Medium (engl. *Lysogeny Broth*) bei 37°C inkubiert und anschließend auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausgestrichen. Nach Inkubation der Platten für 12 Stunden bei 37°C wurden einzelne Klone amplifiziert und die Plasmid-DNA unter Verwendung des Mini NucleoSpin[®] Plasmid Kits aufgereinigt. Durch enzymatischen Verdau des pCR[®]-XL-TOPO[®] Vektors mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen MluI und FseI konnten schließlich die ehemaligen PCR Fragmente (Insert) erneut wie oben beschrieben mittels Gelelektrophorese und NucleoSpin-Extract II Kit isoliert und aufgereinigt werden.

Ein spezielles Design der zur Amplifizierung verwendeten Primer (siehe Tab. 2.3) mit Schnittstellen für MluI und FseI ermöglichte eine kohäsive (sticky) 5'-Enden Ligation mit dem pIRES-Luc Vektor (Rückgrat). Insert (Primerpaar 1) und Rückgrat wurden in einem molaren Verhältnis von 3:1 mittels T4-Ligase miteinander verknüpft. Die Transformation erfolgte ebenfalls analog zum pCR[®]-XL-TOPO[®] Hilfsvektor. Die erfolgreiche Klonierung wurde durch entsprechenden Restriktionsverdau (XhoI, MluI, FseI) und Sequenzierung bestätigt. Die Sequenzierung wurde unter Verwendung der in Tabelle 2.3 angegebenen Primer von der Firma Agowa in Berlin durchgeführt. Kontrolltransfektionen zeigten darüber hinaus die Funktionalität der Plasmide *in vitro*.

Amplifizierung und Aufreinigung von Plasmiden

Die jeweiligen Plasmide wurden mittels Elektroporation (1800 V, 25 μ F, 100 Ohm) in *E. coli* Bakterien DH10B amplifiziert. Im Anschluss wurden die jeweiligen Plasmid-DNA tragenden *E. coli*-Klone gepickt und in 5 ml (Mini-Präp) beziehungsweise in 300 ml LB-Medium (Maxi-Präp) mit dem jeweiligen Antibiotikum bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte aus den resultierenden *E. coli*-Kulturen unter Verwendung der NucleoSpin[™] Plasmid beziehungsweise NucleoBond[™] PC 2000 EF Kits. Nach erfolgreicher Amplifizierung wurden die aufgereinigte Plasmid-DNA in pyrogenfreiem Wasser gelöst, die Konzentration und Reinheit mittels NanoDrop-1000 bestimmt und das Plasmid mittels geeigneter Restriktionsendonuklea-

sen überprüft. Für die Plasmide pCMVLuc und pCpGLuc wurden die in *E. coli* amplifizierte und aufgereinigte Plasmid-DNA von PlasmidFactory (PlasmidFactory GmbH, Deutschland) in hochreiner Form (LPS-Gehalt 0,1 E.U.) bezogen.

2.5.2 siRNA

Folgende siRNAs wurden in dieser Arbeit verwendet 2.11.

Bezeichnung	sense-Sequenz (5' - 3')
EGFP	GCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU[dT][dT]
PAI-1 A	GGAAACAAGGAUGAGAUCAG[dT][dT]
PAI-1 B	CCAGAUUCAUCAUCAUGA[dT][dT]
PAI-1 C	ACCAACAAGUUCAACUUA[dT][dT]
PAI-1 D	CGACAUGUUCAGACAGUUU[dT][dT]

Tabelle 2.11: Verwendete siRNAs

Alle siRNAs wurden von Sigma-Aldrich, Frankreich bezogen. Die lyophilisierten Proben wurden in Resuspensionspuffer (Quiagen) zu 20 μM beziehungsweise für die Freisetzungsstudien zu 100 μM Stocklösungen gelöst, 1,5 min bei 90°C inkubiert, um Aggregate und höhere Ordnungsgrade zu zerstören, und anschließend bei 37°C 1 h leicht geschüttelt. Dadurch sollte ein vollständiges Anlagern der Sense- und Antisense-Stränge garantieren werden, bevor die Proben schließlich aliquotiert und bei - 20°C gelagert wurden.

2.5.3 mRNA

Die in dieser Arbeit verwendete mRNA, kodierend für *EGFP_{Luc}*, wurde mittels *in vitro* Transkription unter Verwendung eines T7 ARCA cap Kits (Ambion, England) von Frau Dr. Gabriela Nica (AG Molekulare Pneumologie und Experimentelle Therapieforchung, LMU München) synthetisiert. Die Sequenz ist in Abbildung 2.2 schematisch dargestellt.

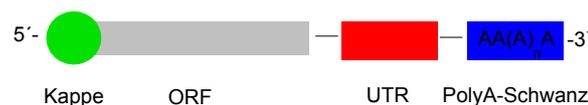


Abbildung 2.2: Verwendete mRNA

2.6 Polymersynthese

2.6.1 Makromolekulare Strukturen

Polymere lassen sich aufgrund Ihrer Struktur klassifizieren. Nach Ihrer Topologie können Polymere in (a) linear, (b) verzweigt oder (c) vernetzt eingeteilt werden (Abb. 2.3).

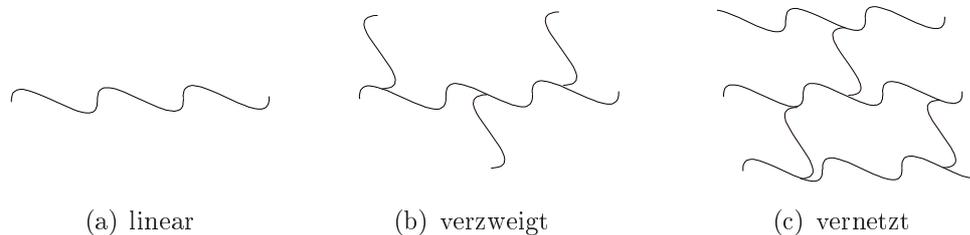


Abbildung 2.3: Topologie von Polymerstrukturen

Bei Polymeren, die nur aus einer Monomerart bestehen, spricht man von Homopolymeren. Copolymere sind dagegen dadurch charakterisiert, dass eine sequentielle Verknüpfung von mindestens zwei verschiedenen Monomerbausteinen vorliegt. Dabei hat die Abfolge der verschiedenen Monomerbausteine in der Kette (Sequenz) einen entscheidenden Einfluss auf die physikochemischen Eigenschaften der Polymere. Im einfachsten Fall, in dem das Copolymer aus zwei unterschiedlichen Monomerbausteinen A, B zusammengesetzt ist, sind vier Strukturtypen möglich (Abb. 2.4). In Blockcopolymeren (a) ist der A-Block kovalent mit dem Kettenende des B-Blockes verbunden und kann beliebig durch die Anbindung weiterer Blöcke verlängert werden (Multiblockcopolymer). Alternativ dazu können die Monomerbausteine in der Polymerkette (b) alternierend oder (c) statistisch verteilt, das heißt zufällig, angeordnet sein. Gradientencopolymere stellen einen Sonderfall der statistisch verteilten Copolymere dar. Diese unterscheiden sich von den klassischen statistischen Copolymeren durch ein gehäuftes Auftreten eines Monomers zu Beginn der Polymerkette. Dagegen entstehen Pfropfcopolymere (d) (engl. *Grafted Copolymers*), wenn an einer Hauptkette (Rückgrat), die aus Monomerbaustein A aufgebaut ist, Seitenketten bestehend aus einem anderen Monomertyp B aufgepfropft sind.

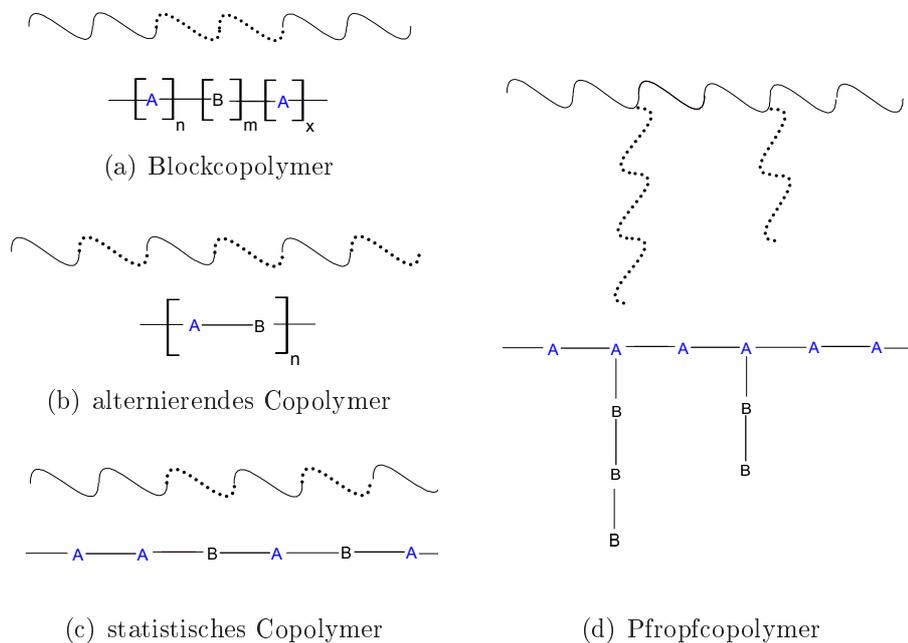


Abbildung 2.4: Strukturtypen von Copolymeren

2.6.2 Polyethylenimin

Lineares Polyethylenimin

Das lineare Polyethylenimin mit einer Molekülmasse von 22 kDa wurde nach einer Vorschrift von Plank und Kollegen (Ogris and Wagner, 2007) im Labor von Herrn PD Dr. B. Luy an der TUM synthetisiert. Lineares PEI wurde durch saure Hydrolyse des Propionsäureamids Poly(2-ethyl-2-oxazolin) 50 kDa gewonnen (Abb. 2.5 (a)), wobei die freigesetzte Propionsäure als azeotropes Gemisch dem Syntheseansatz entzogen wurde, so dass die Reaktion nahezu vollständig ablaufen konnte. Die freie Base wurde anschließend mittels Natronlauge bei pH 12 ausgefällt, gewaschen und lyophilisiert. Das lyophilisierte l-PEI wurde bei 4°C gelagert und nach Bedarf in destilliertem Wasser gelöst, auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, dialysiert (ZelluTrans Dialysiermembranen T2 MWCO 8-10 kDa) und steril filtriert.

Die Quantifizierung der l-PEI Lösung erfolgte photometrisch mittels Kupfersulfat-Methode (Ungaro et al., 2003). Hierzu wurde mit einem Vergleichsstandard (alte l-PEI Charge mit bekannter Konzentration) eine Verdünnungsreihe durch serielles Verdünnen in einer Kupfersulfat-Lösung (0,145 mg/ml CuSO₄ in 0,1M Natriumacetat pH 5,2) hergestellt, diese 5 min

bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und bei 285 nm an einem Spektralphotometer (Ultrospec 3100 Pro) vermessen. Die neue l-PEI Lösung wurde ebenfalls in drei Verdünnungen ($n=2$) bei 285 nm vermessen, aus den berechneten Konzentrationen der Mittelwert bestimmt und die Konzentration der Lösung eingestellt. Die Reinheit des Syntheseprodukts wurde mittels ^1H -NMR-Spektroskopie (Bruker 250 MHz, Karlsruhe) von Frau Grit Kummerlöwe am Lehrstuhl für Kernresonanzspektroskopie von Biomolekülen an der TUM überprüft (Abb. 2.5 (b)). Das Spektrum zeigte neben dem Wasserpeak bei 4,8 ppm einen Peak bei 3,1 ppm, der den Wasserstoffatomen der Methylgruppe entspricht. Die Messung der Molekülmasse mittels Gel-Permeations-Chromatographie mit einem Mehrwinkellaser-Streungsdetektor (GPC-MALLS) durch Herrn Özgür Akdemir, Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung in Golm ergab eine Molekülmasse von 20-22 kDa.

Verzweigtes Polyethylenimin

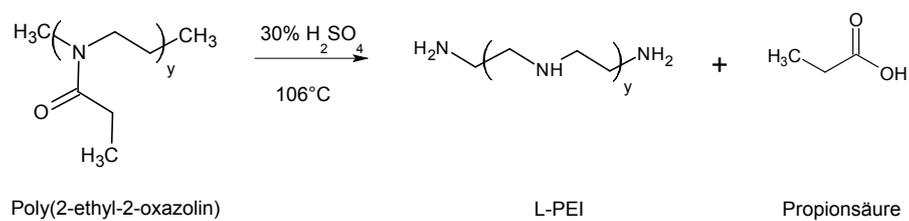
Das verzweigte Polyethylenimin mit einer Molekülmasse von 25 kDa wurde von Sigma-Aldrich, Deutschland bezogen, in destilliertem Wasser gelöst und mit Salzsäure auf pH 7,4 eingestellt.

2.6.3 Copolymere auf Methacrylat-Basis

Die Synthese und Charakterisierung der Molekülmasse und der Zusammensetzung der Copolymere aller auf einem Methacrylat- Rückgrat basierenden Polymere wurden von Herrn Özgür Akdemir am Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung in Golm durchgeführt.

Kontrollierte radikalische Polymerisation

Zur Polymerisation von (Meth)acrylaten eignete sich eine besondere Form der kontrollierten radikalischen Polymerisation, die ATRP (engl. *Atom Transfer Radical Polymerization*). Die kontrolliert radikalische Polymerisation ist aufgrund ihrer Eignung für eine Vielzahl von Monomeren und der Unempfindlichkeit gegenüber den Reaktionsbedingungen das technisch bedeutendste Verfahren zur Darstellung synthetischer Polymere. Allerdings kommt es bei der klassischen Methode immer wieder zu irreversiblen Abbruchsreaktionen der Kette, die zu Polymeren mit einer relativ breiten Molekülmassenverteilung führen. Im Gegensatz dazu ermöglicht die ATRP durch strikte Kontrolle der Molekülmasse eine engere Verteilung der molaren Masse (Polydispersität). Mit dieser Methode lassen sich sowohl statistische Copolymere,



(a) Übersicht Syntheseablauf

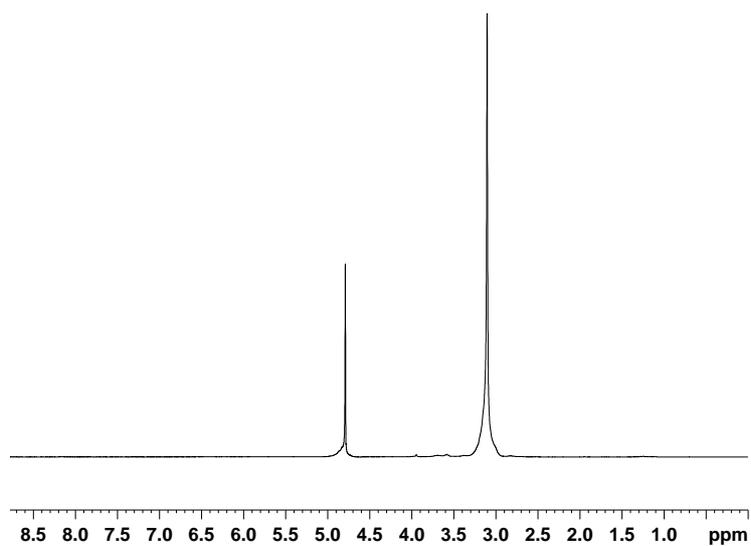
(b) $^1\text{H-NMR}$ Spektrum l-PEI (Bruker 250 MHz)

Abbildung 2.5: L-PEI Synthese

Gradientencopolymere als auch Blockcopolymer synthetisieren, die sich später durch Kopplung mit funktionellen Gruppen leicht modifizieren lassen.

Die ATRP kann in drei Schritte eingeteilt werden (Abb. 2.6): Initiierung (1), Kettenwachstum (2) und Kettenabbruch (3).

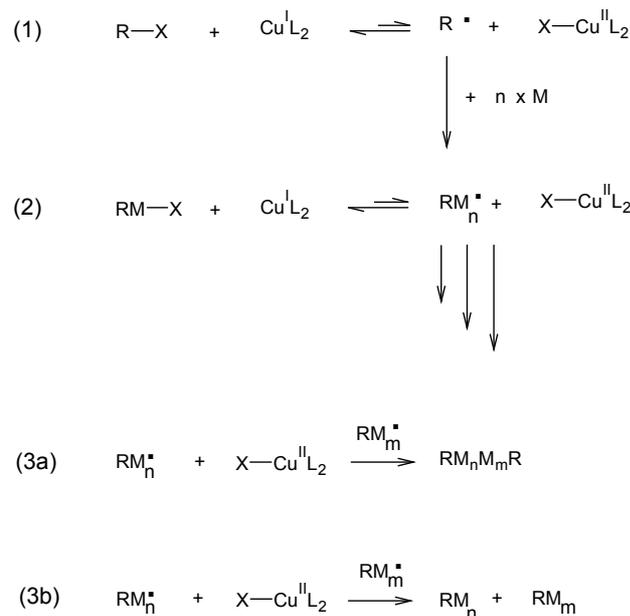


Abbildung 2.6: Allgemeiner Mechanismus der kontrollierten radikalischen Polymerisation

Die Reaktion wird mit dem Zerfall des Initiators (Katalysator) eingeleitet, indem ein Halogenatom des Initiators RX auf einen Übergangsmetallkomplex $\text{Cu}^{\text{I}}\text{L}_2$ übertragen wird. Aus dem Initiatorkomplex entsteht dadurch ein transientes Radikal R^\bullet , wobei der Übergangsmetallkomplex durch die Aufnahme des Halogenatoms oxidiert wird. Im Anschluss wird die radikalische Polymerisation durch Reaktion des transienten Radikals mit einem Monomerbaustein M initiiert (1). Die wachsenden Polymerketten RM^\bullet stehen dabei in einem Redoxgleichgewicht mit dem oxidierten Übergangsmetallkomplex. Das Gleichgewicht liegt auf Seiten der inaktiven („schlafende“) Polymerkette RM-X und hält dadurch die Konzentration freier Radikale während der Polymerisation niedrig. Dadurch können unerwünschte, irreversible Abbruchsreaktionen verhindert werden (2). Erst wenn die Konzentration an Monomerbausteinen sehr niedrig ist, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass zwei wachsende Polymerketten (RM_n , RM_m) aufeinander treffen und durch

Rekombination (3a) oder Disproportionierung (3b) irreversibel terminieren.

2.6.4 Statistische Pfcopopolymere auf Basis von Methacrylat

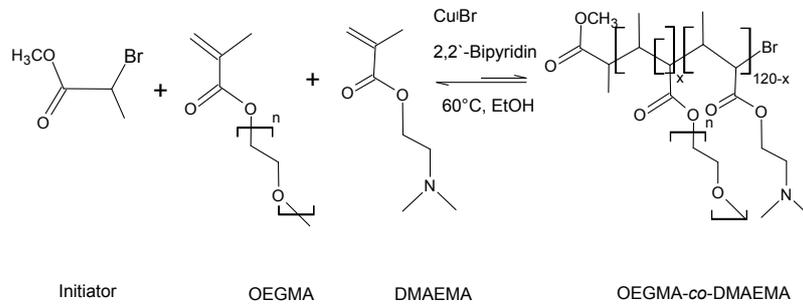
Die Copolymere wurden mittels ATRP von Herrn Özgür Akdemir am Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung in Golm synthetisiert (Abb.2.7 (a)) (Lutz et al., 2007; Lutz and Hoth, 2006). Als Initiator wurde das Alkylhalogenid Methyl-2-bromo-propionat verwendet. Der Übergangsmetallkomplex bestand aus einem Kupferkomplex Cu(I)Br mit einem mehrzähligen Stickstoffliganden 2,2'-Bipyridylliganden (BIPY), die im Verhältnis 1:2 verwendet wurden. Die Monomere Dimethylaminoethylmethacrylat (DMAEMA) und Oligoethylenglycolmethacrylate (OEGMA) wurden in unterschiedlichen Verhältnissen (Äquivalenten von x und $120-x$) eingesetzt, um eine Reihe von Polymeren mit steigendem EG-Gehalt zu generieren. Die Synthese lieferte bei hoher Ausbeute eine Reihe an Copolymeren, die sich durch eine definierte Zusammensetzung mit bekannter Molekülmasse und enger Molekülmassenverteilung auszeichneten. Sowohl die Zusammensetzung als auch die experimentell ermittelte Molekülmasse unterschieden sich dabei kaum von den berechneten Werten. Eine detaillierte Übersicht über die Zusammensetzung liefert Abbildung 2.7 (b). Aus der Tabelle geht hervor, dass 3 unterschiedliche Serien synthetisiert wurden, die sich i) in der Kettenlänge der EG-Seitenkette (9, 23, 45 EG-Einheiten) und ii) in der Zusammensetzung der Copolymere (Gesamtkettenlänge von 120 Einheiten mit variablem OEGMA/DMAEMA-Verhältnis) unterschieden. Die Molekülmasse, die mittels Größenausschluss-Chromatographie bestimmt wurde, schwankte hingegen zwischen 23 und 54 kDa in einem relativ engen Bereich. Folgende Nomenklatur wurde für die Bezeichnung der Copolymere verwendet:

$$P(DMAEMA_x - co - OEGMA(n)_{120-x})$$

mit $n = \text{EG-Einheiten}$, $F_{DMAEMA} = x$, $F_{OEGMA} = 120 - x$

Influenza-Peptid-7-gekoppelte Copolymere

Nach der Synthese wurden Copolymere optional durch Kopplung mit dem Influenza Peptid 7 modifiziert. Dazu wurden im ersten Schritt die mit einem Bromid funktionalisierten Kettenenden mittels nukleophiler Substitution in eine Azidfunktion umgewandelt (Abb.2.8 (a)). Diese konnten anschließend in einer durch Cu(I)-katalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition mit niedermolekularen terminalen Alkinen gekoppelt werden (Abb.2.8 (b)). Im Gegensatz



(a) Syntheseablauf Diblockcopolymerer

OEGMA (# EG units)	OEGMA/DMAEMA/MBP	F_{OEGMA} (%)	F_{OEGMA}^a (%)	conv. ^b (%)	M_n^c (g.mol ⁻¹)	$M_n^{\text{th}d}$ (g.mol ⁻¹)	M_w/M_n^c
9	10/110/1	8	9	92	22.700	22.000	1,33
	20/100/1	16	18	91	29.700	25.200	1,34
	30/90/1	25	28	92	25.500	28.400	1,51
	40/80/1	33	30	93	29.500	31.500	1,49
	50/70/1	41	42	92	35.200	34.700	1,54
	60/60/1	50	47	86	29.300	37.900	1,63
	80/40/1	66	60	96	34.800	44.200	1,71
23	90/30/1	75	77	91	40.000	47.500	1,96
	10/110/1	8	11	82	30.100	28.300	1,44
	20/100/1	16	17	94	35.600	37.700	1,54
	30/90/1	25	23	92	29.400	47.100	1,97
	40/80/1	33	27	95	47.800	56.500	1,69
	50/70/1	41	40	94	27.800	66.000	1,68
45	70/50/1	58	61	90	45.500	84.800	2,04
	80/40/1	66	80	76	30.700	94.300	2,80
	10/110/1	8	-	-	23.500	38.100	1,68
	20/100/1	16	-	-	47.500	57.300	1,25
	30/90/1	25	-	-	54.500	76.500	1,35
	40/80/1	33	-	-	54.600	95.700	1,12

^a Berechnet aus dem ¹H NMR Spektrum der aufgereinigten Kopolymere; ^b Gesamtumsatz der eingesetzten Monomere ermittelt aus den ¹H NMR Spektren der Polymerisationsansätze vor der Aufreinigung; ^c Molekulargewicht bestimmt mit Hilfe der SEC; ^d Theoretisches Molekulargewicht berechnet aus dem Monomerverbrauch.

(b) Übersicht der Copolymerer

Abbildung 2.7: Statistische Pfropfcopolymerer auf Methacrylat-Basis

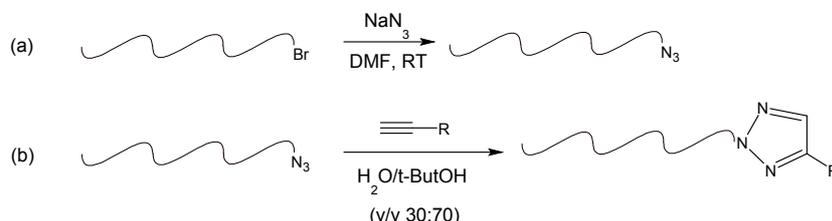


Abbildung 2.8: Modifikation von Copolymeren mittels Cu(I)-katalysierter 1,3-Cycloaddition

zur klassischen Huisgen-Cycloaddition (unkatalysiert) ermöglichte die Cu(I)-katalysierte Click-Chemie-Variante nach Sharpless eine einfache, effiziente und hochselektive Synthese des Produkts zum 1,4-Regioisomer. Darüber hinaus eignet sich diese Methode aufgrund von milden Reaktionsbedingungen (RT, Wasser als Lösungsmittel) und der Toleranz gegenüber funktionellen Gruppen insbesondere für komplexe Polymerstrukturen.

2.7 Peptidsynthese

2.7.1 Festphasen-Peptidsynthese

Die Synthese der Peptide INF 7 und TAT-Dimer erfolgte nach der von Bruce Merrifield 1963 entwickelten Festphasenpeptidsynthese (engl. *Solid Phase Peptide Synthesis* SPPS) (Merrifield, 1963). Die SPPS-Methode ermöglicht die kovalente Bindung der wachsenden Aminosäurekette an einen unlöslichen polymeren Träger (meist ein Polystyrol-Harz), so dass das Peptid ausgehend von der am Harz befindlichen ersten Aminosäure durch alternierende Serien von Aminosäurekopplungen verlängert werden kann. Überschüssige Reagenzien lassen sich dabei leicht durch Waschen des Harzes vom kovalent gebundenem und somit unlöslichem Peptid abtrennen. Die Synthese erfolgte vom C- zum N-Terminus mit Hilfe eines automatisierten Peptidsynthesizers (Applied Biosystems 431A) im Labor von Herrn PD Dr. C. Plank (Experimentelle Onkologie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München). Es wurde ein auf der *Fmoc/tBu-Chemie* basierendes Standardprotokoll FmocFastTM verwendet. Die detaillierten Schritte sind in Tabelle 2.12 aufgeführt. Nach erfolgreichem Aufbau der Aminosäurekette (Schritt 1, 2) erfolgte die Spaltung des Peptids vom Harz mit anschließender Abspaltung der permanenten Schutzgruppen (Schritt 3). Im letzten Schritt (Schritt 4) wurde das Peptid aufgereinigt und charakterisiert. Die einzelnen Schritten sind in Abbildung

Reaktionsschritt	Operation	Reagenzien	Zeit [min]
0	Waschen, Quellen des Harzes	NMP	6
1a	Fmoc-Entschützung	20 % Piperidin in NMP	6
1b	Waschen des Harzes	NMP, DMF	6
2a	Lösen, Aktivieren der N-Fmoc-Aminosäure	DMF, HBTU/HOBt	7
2b	Aktivieren der N-Fmoc-Aminosäure	DIPEA	5
2c	Kopplung		25
3	Waschen	DCM	7

Tabelle 2.12: Übersicht FmocFast™ Protokoll: Waschen und Quellen des Harzes (0) wurde zu Beginn der Synthese einmal durchgeführt. Der Waschschrift (3) mit DCM erfolgte einmalig nach erfolgreicher Synthese. Ein Kopplungszyklus dauerte 49 min.

2.9 dargestellt und im Folgenden näher erläutert.

(1) **Fmoc-Entschützung**

Das Harz wurde vor der Kopplung mit N-Methylpyrrolidon (NMP) gewaschen und durch Quellzeit in NMP auf die Kopplung vorbereitet. Im Anschluss wurde die α -Aminogruppe (9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Schutzgruppe) der am Harz befindliche Aminosäure durch Zugabe von Piperidin (20 % Piperidin in NMP) entschützt und gründlich zuerst mit Dimethylformamid (DMF), dann mit NMP gewaschen, um überschüssiges Piperidin, das die anschließende Kopplung stören könnte, zu entfernen.

(2) **Kopplung**

Die Kopplung der N-Fmoc-geschützten Aminosäure erfolgte nach der HBTU (2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborat)/ HOBt (Hydroxybenzotriazol) Methode in NMP. Im Vorfeld der Reaktion wurden 1 mmol der zu koppelnden Aminosäure in ein Reaktionsvessel eingewogen. Nach Entschützung der am Harz befindlichen Aminosäure wurden die im Vessel befindliche Aminosäure in 2 ml DMF gelöst, mit 2 ml einer 0,45 M HBTU/HOBt Lösung in DMF versetzt und nach einer Inkubationszeit von 7 min in das Reaktionsgefäß injiziert. Durch Zugabe von 1,7 Äquivalenten DIPEA (Diisopropylethylamin) wurde die Aktivierung gestartet, indem die Aminosäure und das HOBt neutralisiert beziehungsweise deren Nucleophilie erhöht wurde. Die N-Fmoc-Aminosäure reagierte in diesem Schritt mit der Carbonsäuregruppe der am Harz befindlichen Aminosäure zu einer Amidbindung. Nach erfolgreicher Kopplung wurde das Harz mit DCM (Di-

chlormethan) gewaschen und der Zyklus startete erneut mit der Fmoc-Entschützung (1) bis die Peptidsequenz vollständig aufgebaut war. Eine „In-Line“-Kontrolle der Synthese war über die Fmoc-Abgangsgruppe möglich, die über einen UV-Vis Detektor quantifiziert werden konnte. Die Höhe der Absorption war dabei proportional zur Anzahl der abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen und lies eine Aussage über die Qualität der Kopplung zu.

(3) **Abspaltung vom Harz und der Seitengruppen-Schutzgruppen**

Sobald die Peptidsequenz aufgebaut war, konnte das Roh-Peptid vom Harz getrennt werden, indem der Trityl-Linker mit einer schwachen Säure (Essigsäure) hydrolysiert wurde. Die ebenfalls säurelabilen, permanenten Seitenketten-Schutzgruppen im Peptid wurden dadurch nicht beeinflusst, deren Abspaltung erfolgt erst mit der Zugabe einer stärkeren Säure, der Trifluoressigsäure (TFA). Als permanente Seitenketten-Schutzgruppen eignen sich vor allem Schutzgruppen vom *tert*-Butyltyp (*t*Bu) für Säuren und Alkohole, vom *tert*-Butyloxycarbonyltyp (Boc) für Amingruppen oder vom Trityl-Typ (Trt) für Alkohole. Bei beiden Peptidsynthesen war es allerdings möglich, die Abspaltung vom Harz und die der Seitenketten-Schutzgruppen in einem Schritt durchzuführen. Hierzu wurde das lyophilisierte Peptid in Lösung (5 ml TFA 99 %, 375 mg Phenol, 250 μ l Thioanisol, 250 μ l bidestilliertes Wasser und 125 μ l Ethandithiol) gebracht und 2 h leicht geschüttelt. Thioanisol und Ethandithiol wurden als Radikalfänger zugesetzt, um eine Alkylierung aktivierter aromatischer Aminosäuren (vor allem Tryptophan) durch intermediär entstehende Kationen zu verhindern. Im Anschluss wurde die gelbliche Lösung über eine Fritte vom Harz (weißer Niederschlag) getrennt, mit kaltem Diethylether (-20°) gefällt, gewaschen und in *tert*-Butanol erneut lyophilisiert.

(4) **Aufreinigung und Analyse**

Im letzten Schritt erfolgten die Aufreinigung des Roh-Peptids und die Analyse per HPLC. Auf diesen Teil der Synthese wird speziell in Kapitel 2.7.2 bis 2.7.4 für die jeweiligen Peptide separat eingegangen.

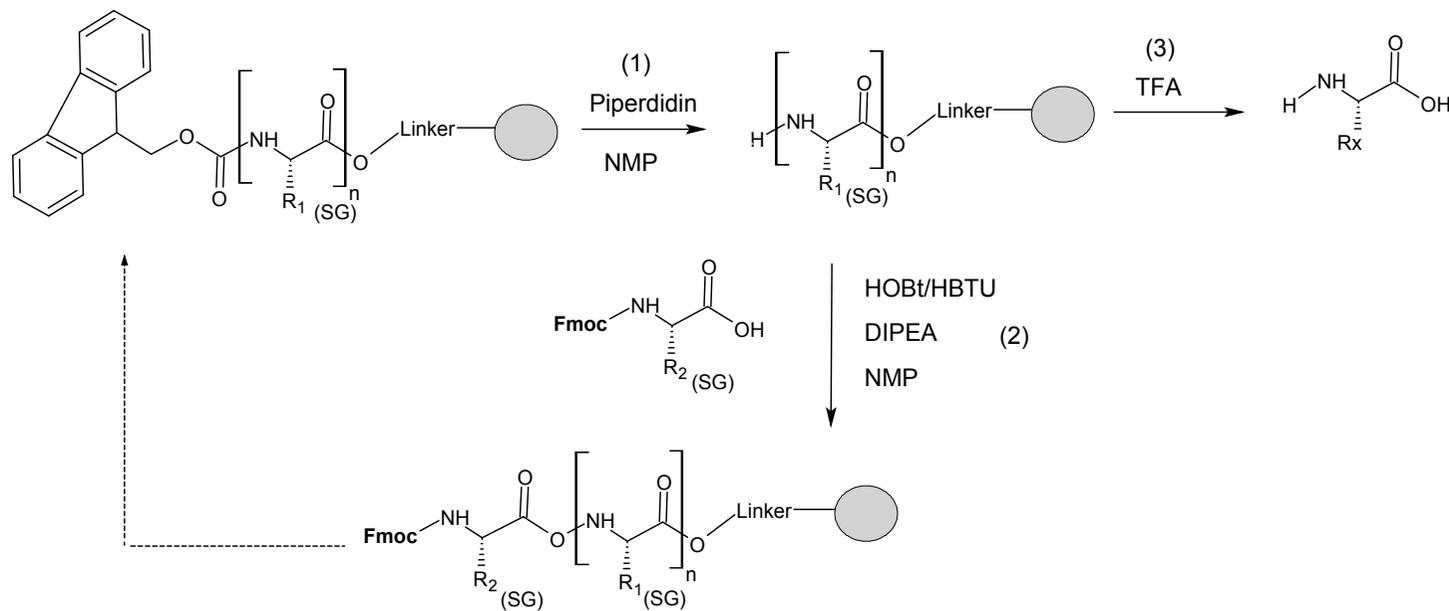


Abbildung 2.9: Schematischer Ablauf der Peptid-Festphasensynthese: Fmoc-Entschützung (1), Kopplung (2), Abspaltung vom Harz inklusive Abspaltung permanenter Schutzgruppen (3).

2.7.2 Influenza Peptid 7

Synthese

Das Influenza Peptid 7 (INF 7), bestehend aus der Sequenz GLFEAIEG-FIENGWEGMIDGWYGC (Plank et al., 1994), wurde analog Kapitel 2.7.1 synthetisiert. Als polymerer Träger wurden 0,25 mmol eines Fmoc-Cys(Trt)[®]-Harzes (200-400 mesh, 0,45-0,7 mmol/g Beladung, Bachem) eingesetzt. Neben den N-Fmoc geschützten Aminosäuren wurden zusätzlich folgende Seitenketten geschützte Aminosäuren verwendet: Fmoc-Glu(t-Bu), Fmoc-Asp(t-Bu), Fmoc-Asn(Trt), Fmoc-Tyr(t-Bu). Tryptophan wurde ungeschützt eingesetzt.

Aufreinigung und Identitätsbestimmung

Das lyophilisierte Peptid wurde in 1 M TEAB-Puffer pH 10 gelöst (10 mg in 200 μ l), mit bidestilliertem Wasser ad 1 ml aufgefüllt und Schwebstoffe durch Zentrifugation abgetrennt (14.000 rpm, 5 min). Mögliche Dimere, die durch Ausbildung von Disulfidbrücken entstanden sein konnten, wurden mittels DTT reduziert und das Peptid über Größenausschluss-Chromatographie (engl. *Size Exclusion Chromatography*, SEC) aufgereinigt. Folgende Parameter wurden verwendet: Superdex 30 prep. grade (Pharmacia HighLoad XK 26/60 column), Fließmittel: 0,1 M TEAB pH 8, Flussrate: 4,4 ml·min⁻¹, Dauer 120 min. Die Fraktionen des Hauptpeaks (Retentionszeit 42,2 min) wurden gesammelt, vereinigt und lyophilisiert. Die Identität des Peptids wurde am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie an der LMU in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. E. Wagner mittels Massenspektrometrie (ESI-MS) bestimmt. Das Massenspektrum zeigte einen deutlichen Produktpeak, wies allerdings noch große Verunreinigungen auf. Daher wurde die lyophilisierte Probe in 20 mM wässrigem Ammoniumbicarbonatpuffer gelöst (10 mg/ml), mit DTT versetzt und erneut mittels eines präparativen RP-HPLC-Laufs aufgereinigt. Folgende Parameter wurden verwendet: Vydac C18 Säule 2,5 cm x 25 cm, Fließmittelgradient: A=20 mM Ammoniumbicarbonatpuffer (wässrig), B=20 mM Ammoniumbicarbonatpuffer (Ethanol 96 % p.a.), Start: 50 % A und 50 % B bis 100 % B in 20 min, Flussrate: 3 ml·min⁻¹. Die Fraktionen um den Hauptpeak (Retentionszeit 12 min) zeigten im Massenspektrum die gewünschte Masse von 2.694 Da.

Konzentrationsbestimmung

Aufgrund der Oxidationsempfindlichkeit der Cystein-Gruppen wurde das lyophilisierte Peptid nach Bedarf mit Stickstoff gesättigtem PBS gelöst, die

Konzentration am Spektrometer (NanoDrop-1000) bei 280 nm bestimmt (EXPASY Protparam: $\varepsilon = 12.490M^{-1} \cdot cm^{-1}$) und bei $-20^{\circ}C$ für weitere Versuche gelagert.

Erythrozyten Lyseassay

Um die Funktionalität des INF 7-Peptids zu testen, wurde ein Erythrozyten-Lyseassay durchgeführt (Plank et al., 1994). Dieser basiert auf der Tatsache, dass das endosomolytische Peptid in der Lage ist, die Membran von Erythrozyten zu zerstören. Die Hämolyseaktivität kann schließlich über das frei zugängliche Hämoglobin bei 410 nm bestimmt werden und ist ein Maß für die Funktionalität des Peptids. Hierzu wurden humane Erythrozyten aus mit Citrat behandeltem Blut (Alsevier's Lösung) isoliert, mit HBS gewaschen (2500 g, 5 min) und in einer Konzentration von $3 \cdot 10^7$ Zellen/ml in HBS resuspendiert ($\varepsilon = 2,394 \cdot 10^{-8} ml / Zellen$ bei 541 nm und Zusatz von $1 \mu l$ 1%iger Triton-X 100 Lösung). Das zu testende Peptid wurde in einer 96-Well-Platte (V-Boden) in $75 \mu l$ Puffer (20 mM HEPES/ 150 mM NaCl pH 7,4 oder 10 mM Nacitrat/ 150 mM NaCl pH 5) seriell 1:2 verdünnt (Startkonzentration 3 mM). Anschließend wurden pro Well $100 \mu l$ Zellsuspension (entsprechend $3 \cdot 10^6$ Zellen) zupipettiert und für 1 h bei $37^{\circ}C$ unter Schütteln (50 rpm) inkubiert. Als Negativkontrolle diente der entsprechende Puffer, als Positivkontrolle (100 % Wert) wurden $1 \mu l$ einer 1%igen Triton-X 100 Lösung nach der Inkubationszeit zugegeben. Die Platte wurde anschließend zentrifugiert (2500 g, 5 min) und der Überstand bei 410 nm in einem Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter vermessen. Das Ergebnis der Funktionalitätsprüfung ist in Abbildung 2.10 dargestellt. Das Peptid zeigte 100 % Hämolyseaktivität ab einer Konzentration von $30 \mu M$.

2.7.3 Influenza Peptid 7 modifiziert

Synthese

Für eine kovalente Kopplung des INF7-Peptids an die Methacrylat-basierten Diblockcopolymere mittels Click-Chemie (Kolb et al., 2001) wurde eine INF7-Sequenz mit modifiziertem C-Terminus von unseren Kooperationspartner am Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung in Golm synthetisiert. Dieses bestand im Detail aus folgender Sequenz GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYG-azido-Phe-OH. Die Kopplung mit dem Polymer erfolgte am C-Terminus (freies Carboxylende), da der N-Terminus (freies Aminende) entscheidend für die endosomolytische Funktion des Peptids ist (Plank et al., 1994). Für die Synthese wurde ein 2-Chlorotriethylchlorid

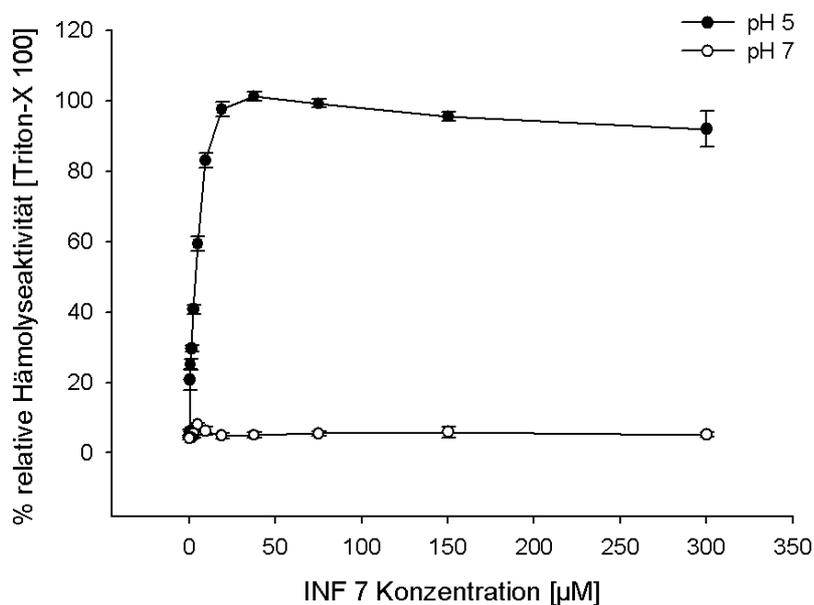


Abbildung 2.10: Erythrozyten-Lyseassay INF 7

Harz (200-400 mesh, Bachem) mit einer Fmoc-azido-Phe-OH Aminosäure (Bachem) beladen (0,27 mmol/g Beladung). Neben den N-Fmoc geschützten Aminosäuren wurden zusätzlich folgende geschützte Aminosäuren verwendet: Fmoc-Glu(t-Bu), Fmoc-Asp(t-Bu), Fmoc-Asn(Trt), Fmoc-Tyr(t-Bu) und Fmoc-Trp(Boc).

Das lyophilisierte Peptid wurde im Anschluss an die Synthese im Labor von PD Dr. C. Plank (Experimentelle Onkologie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München) weiter verarbeitet. Die Abspaltung vom Harz erfolgte ungeschützt in 94 % TFA, 2 % Triethylsilan und 4 % bidestilliertem Wasser (100 mg in 5 ml Abspaltungsmix) unter leichtem Vortexen für 2 h. Im Anschluss wurde die sich gebildete gelbliche Lösung über eine Fritte vom Harz (weißer Niederschlag) getrennt und mit kaltem Diethylether (-20°C) gefällt, gewaschen und in *tert*-Butanol lyophilisiert. Das Peptid wurde analog dem unmodifizierten INF 7 aufgereinigt, indem dieses nach der Lyophilisation in 1 M TEAB-Puffer pH 10 gelöst (≈ 100 mg in $800\ \mu\text{l}$) und mit bidestilliertem Wasser auf 1,5 ml aufgefüllt wurde. Die Fraktionen des Hauptpeaks (Retentionszeit 33- 40 min, Maximum 36 min) wurden gesammelt, vereinigt und wiederum lyophilisiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte ebenfalls analog dem unmodifizierten Peptid (ExPASy Protparam: $\epsilon = 12.490\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $M_w = 2.779$ Da). Das modifizierte Influenza Peptid

zeigte eine 100 % Hämolyseaktivität ab einer Konzentration von circa $30 \mu\text{M}$ und wies somit kein Aktivitätsverlust gegenüber dem unmodifizierten Peptid auf. Die anschließende Kopplung an das Diblockcopolymer wurde von Herrn Özgür Akdemir am Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung in Golm durchgeführt.

2.7.4 Dimeres TAT-Peptid

Synthese

Das TAT-Dimer (TAT_2), bestehend aus der Sequenz $\text{C}(\text{YGRKKRRQRRRG})_2$ (Rudolph et al., 2003), wurde analog Kapitel 2.7.1 synthetisiert. Für die Synthese wurden $0,25 \text{ mmol}$ eines Carbonsäureamid-Harzes (TP Harz) eingesetzt.

Aufreinigung und Identitätsbestimmung

Das lyophilisierte Peptid wurde in mit Helium begastem bidestilliertem Wasser gelöst (20 mg in $300 \mu\text{l}$), Schwebstoffe durch Zentrifugation abgetrennt (14.000 rpm , 5 min) und freien Thiolgruppen der Cystein-Seitengruppen im Peptid vor der Aufreinigung mit $300 \mu\text{l}$ ethanolischen DTDP-Lösung (2,2'-Dithiodipyridin) zu einem Disulfid umgesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 30 min waren die Thiolgruppen vor Oxidation geschützt und für spätere Modifikation zugänglich gemacht. Es wurden anschließend 1 ml bidestilliertes Wasser zugegeben, unlösliche Bestandteile (ausgefallenes überschüssiges DTDP, wasserunlösliches Nebenprodukt wie das Pyridine-2-thion) erneut durch Zentrifugation abgetrennt (14.000 rpm , 5 min) und der Überstand (Konzentration 20 mg/ml) mittels präparative RP-HPLC aufgereinigt. Folgende Parameter wurden verwendet: Vydac C18 Säule $2,5 \text{ cm} \times 25 \text{ cm}$, Fließmittelgradient: A = $0,1 \%$ TFA, B = 90% Acetonitril/ $0,1 \%$ TFA, Start: 100% A und 0% B bis 60% A und 40% B in 24 min , Flussrate: $25 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Die Fraktionen des Hauptpeaks (Retentionszeit $5,9 \text{ min}$ bei Fließmittelgradient 28% B) wurden gesammelt, vereinigt und lyophilisiert. Die Identität des Peptids wurde von Frau Grit Kummerlöwe am Lehrstuhl für Kernresonanzspektroskopie von Biomolekülen an der TUM mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF) bestimmt und ist im Abb. 2.11 dargestellt.

Konzentrationsbestimmung

Das lyophilisierte Peptid wurde in PBS gelöst, die Konzentration am Spektrometer (NanoDrop-1000) bei 280 nm bestimmt (ExPASY Protparam: $\varepsilon = 2.980 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $M_w = 3.319 \text{ Da}$) und bei -20°C für weitere Versuche gelagert.

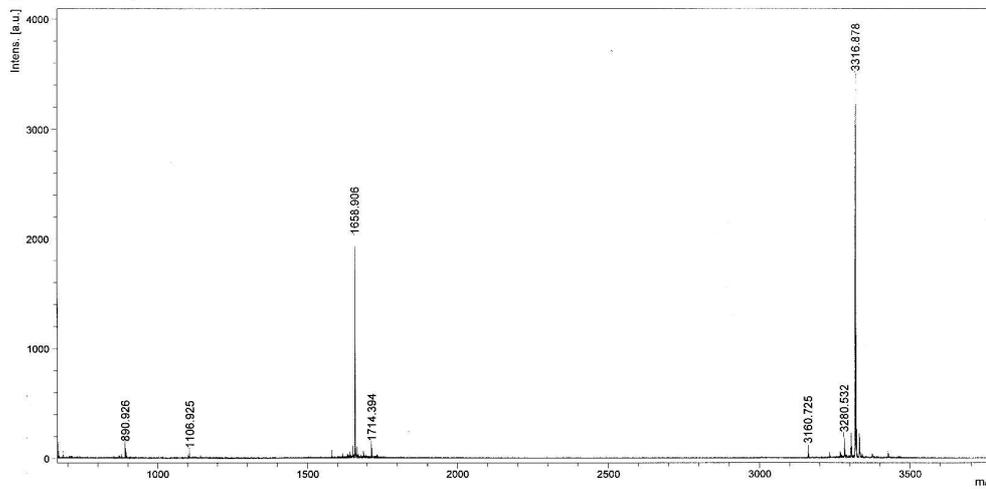


Abbildung 2.11: Massenspektrometrum TAT-Dimer

2.8 Methoden

2.8.1 Herstellung der Gentransferkomplexe

Die Herstellung der Komplexe erfolgte spontan durch elektrostatische Bindungskräfte, wobei die Eigenschaften der gebildeten Polyplexe dabei im Wesentlichen von der Ionenstärke des Mediums, der verwendeten Polymere und dem N/P -Verhältnis abhing. Um kleine monodisperse Partikel zu erhalten, wurden gleiche Volumina der Lösung mit der geringeren Ladungsdichte, der Nukleinsäure-Lösung, zur Lösung mit höherer Ladungsdichte, der Polymer-Lösung, pipettiert und durch Auf- und Abpipettieren (5-8 mal) gemischt. Die Lösung wurde anschließend bei RT für 20 min inkubiert bevor weitere Versuche durchgeführt werden konnten. Als Medium wurde Wasser für Injektionszwecke (siRNA Versuche, Lyophilisate) und HBS pH 7,4 (mRNA, Plasmid-DNA Versuche) eingesetzt. Komplexen mit nicht kovalent gekoppeltem INF7-Peptid wurde wie folgt hergestellt. Vor der Komplexierung mit kationischen Polymeren wurde eine Mischung aus Plasmid-DNA und INF7-Peptid unter Einsatz gleicher Stoffmengen an negativer Ladung im Plasmid und Peptid hergestellt (gleiche Volumina). Der Anteil an Peptid wurde aufgrund der geringen Menge allerdings nicht in der Berechnung des N/P -Verhältnisses berücksichtigt. Ternäre Komplexe wurden durch Vorkomplexierung der Plasmid-DNA oder Plasmid-DNA/INF7-Peptid Gemische mit dem TAT₂ Peptid hergestellt (gleiche Volumina). Nach einer Inkubationszeit von 10 min erfolgte eine weitere Komplexierung mit dem kationischen Polymer analog der oben beschriebenen Methode. Die Komplexe wurden für weitere

10 min inkubiert.

Das N/P -Verhältnis gibt den molaren Stoffmengenquotienten aus protoniertem Stickstoffatom (N) der Polymerstruktur zum negativ geladenen Phosphatatom (P) in der Nukleinsäure an. Mit Hilfe des N/P -Verhältnisses können biophysikalische Eigenschaften wie beispielsweise die Oberflächenladung, die kolloidale Stabilität und infolgedessen die Transfektionsrate beeinflusst werden. Je höher das N/P -Verhältnis, desto größer ist die Menge an kationischem Polymer, das für die Komplexierung der Nukleinsäure eingesetzt wurde. Das N/P -Verhältnis berechnet sich wie folgt:

$$\frac{N}{P} = \frac{m(\text{Polymer})}{M(\text{Monomer}_{\text{Polymer}})} \times \frac{M(\text{Monomer}_{\text{Nukleinsure}})}{m(\text{Nukleinsure})}$$

Die Monomereinheit der Nukleinsäuren wird durch ein Nukleotid beschrieben, welches im Falle der Plasmid-DNA eine molare Masse von 330 g/mol und im Falle der mRNA von 340 g/mol besitzt.

Für die Berechnung des N/P -Verhältnisses von PEI/Plasmid-DNA Polyplexe ergibt sich somit folgende Formel:

$$\frac{N}{P} = \frac{m(\text{PEI})}{43,069 \text{ g mol}^{-1}} \times \frac{330 \text{ g mol}^{-1}}{m(\text{DNA})}$$

Für die Berechnung des N/P -Verhältnisses von P(DMAEMA-*co*-OEGMA)/Plasmid-DNA Polyplexe ergibt sich somit folgende Formel:

$$\frac{N}{P} = \frac{m(\text{Polymer})}{M(\text{Monomer}_{\text{kationisch}})} \times \frac{330 \text{ g mol}^{-1}}{m(\text{DNA})}$$

2.8.2 Charakterisierung der Gentransferkomplexe

Bestimmung der Partikelgröße und des Zeta-Potentials

Die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers der Polyplexe erfolgte mittels Photonenkorrelationsspektroskopie in einer Halbmikro-Küvette mit 600 μl Polyplex-Lösung in bidestilliertem Wasser (0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pDNA), die des Zeta-Potentials mittels elektrophoretischer Lichtstreuung in einer Makro-Küvette mit 1,6 ml Polyplex-Lösung (0,02 beziehungsweise 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pDNA). Folgende Einstellungen wurden verwendet: 5 Messungen (Größenmessung), 5 Läufe à 10 Zyklen pro Probe (Zeta-Potential); Viskosität von Wasser

(0,89 cP) beziehungsweise HBS (1,14 cP); Ref-Index 1,33; Dielektrizitätskonstante 78,5; Temperatur 25°C. Die Berechnung des Zeta-Potentials erfolgte nach Smoluchowski. Die Auswertung der Größe erfolgte auf Basis der Das Gerät wurde mittels Polystyren-Latex-Partikeln mit einer Größe von 92 nm (Duke Scientific Cooperation, CA, USA) und der Zeta-Potentialreferenz BL-LC-ZRZ mit einer Ladung von +50 mV (Laborchemie, Wien, Österreich) in regelmäßigen Abständen überprüft.

Der Einfluss erhöhter Salzkonzentration auf die Partikelstabilität, auch als kolloidale Stabilität bezeichnet, wurde untersucht, indem Polyplexe in bidestilliertem Wasser generiert (siehe 2.8.1) und die Salzkonzentration vor der Messung mit einer 10-fach konzentrierten HBS-Lösung (10x) eingestellt wurde (finale Konzentration 1x). Die Partikelgröße wurde anschließend mittels PCS über einen Zeitraum von 30 min alle 5 min vermessen.

Die Zeta-Potentiale der auf mRNA basierenden Polyplexe, sowie der Peptid basierenden Polyplexe wurden mittels ELS an einem Zetasizer Nano vermessen, das neben einer höheren Empfindlichkeit die Benutzung von Einwegküvetten mit integrierter Elektrode erlaubte. Hierzu wurden 100 μ l der Proben wie unter 2.8.1 beschrieben in HBS hergestellt (mRNA Menge 5 μ g) und vor der Messung mit 1 mM NaCl Lösung 1:10 verdünnt. Folgende Messparameter wurden verwendet: 10 bis 30 Läufe; Viskosität von Wasser (0,89 cP); Ref-Index 1,33; Dielektrizitätskonstante 78,5; Temperatur 25°C.

Agarosegelelektrophorese

Durch Agarosegelelektrophorese lässt sich der Grad der Komplexierung der Nukleinsäure (Plasmid-DNA, mRNA) in Polyplexen bestimmen. Hierzu wurden Polyplexe mit unterschiedlichen *N/P*-Verhältnissen wie unter 2.8.1 beschrieben in HBS hergestellt, mit 6-fach konzentriertem Ladepuffer versetzt und auf ein 0,8 %iges (Plasmid-DNA) beziehungsweise 1 %iges (mRNA) Agarosegel versetzt mit Ethidiumbromid (10 μ g/100 μ l) aufgetragen. Bei den Plasmid-DNA Proben wurde jeweils 100 ng pDNA, bei den mRNA Proben 400 ng aufgetragen, wobei für die mRNA Gelen soweit wie möglich unter DNase freien Bedingungen gearbeitet wurde. Als Referenz wurde ein entsprechender Größenmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 125 V für circa 1,5 h in 1x TAE-Puffer. Im Anschluss wurden die Banden der Nukleinsäure unter UV-Licht (360 nm) detektiert und mittels einer Gelkamera aufgenommen.

Im Agarosegel lässt sich eine unvollständige Komplexierung durch freie Nukleinsäure im Gel erkennen, wobei Polyplexe in der Geltasche verbleiben. Ferner kann je nach Intensität des Signals in der Geltasche ein Rückschluss auf den Grad der Kondensation gezogen werden. Dabei gilt, je schwächer die Bande, desto stärker wird die Nukleinsäure vom kationischen Polymer kondensiert. Die Zugabe eines Polyanions (0,1 μg oder 0,4 μg Heparansulfat/ μg pDNA und 0,05 μg oder 0,15 μg Heparansulfat/ μg mRNA, Inkubationszeit 45 min) verdrängte die Nukleinsäure aus dem Komplex und ermöglichte eine Integritätsprüfung (Topologie, Abbau) der Nukleinsäure. Der Anteil ungebundener Nukleinsäure im Agarosegel konnte anschließend mit einer Software (AIDA Image Analyzer Software, Raytest, Deutschland) quantifiziert werden. Die Intensität der Kontrollbande (unkomplexierte Nukleinsäure) wurde als 100 % Wert verwendet.

Fluoreszenz-Quenching-Assay

Zur weiteren Charakterisierung der Komplexe wurde die Plasmid-DNA mit einem bisinterkalierenden Fluoreszenz-Farbstoff TOTO-1 markiert (jedes zwanzigste Basenpaar) (Rudolph et al., 2005), wobei die Interkalation des Farbstoffes in die Doppelhelix der Plasmid-DNA generell zu einer 1000-fachen Verstärkung der Fluoreszenzintensität bei einer Wellenlänge von 535 nm gegenüber dem freien Farbstoff führt. Durch anschließende Komplexierung mit einem kationischen Polymer kommt es jedoch je nach Kondensierungsgrad der pDNA zu einer Löschung der Fluoreszenz, dem sogenannten Quenching. Das Ausmaß des Quenchings ist somit ein Maß für den Komplexierungsgrad der Plasmid-DNA, wobei die Fluoreszenzlöschung umso stärker ausgeprägt ist, je stärker die Plasmid-DNA kondensiert ist. Die Markierung der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 0,075 μl / μg Plasmid-DNA einer TOTO-1-Lösung (5 mg/ml) bei RT für 1 h im Dunkeln. Anschließend wurden die Polyplexe durch Zugabe gleicher Volumina an TOTO-1 markierter pDNA zur vorgelegten Polymerlösung in einer 96-Well-Platte in HBS hergestellt (0,25 μg pDNA/ 50 μl), für 20 min bei RT inkubiert und die Fluoreszenzintensität (F) bei einer Extinktionswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge bei 535 nm in einem Fluoreszenz-Plattenleser (Wallac Victor²/ 1420 Multilabel Counter) vermessen. Der Grad der Fluoreszenzreduktion (Q) wurde wie folgt bestimmt:

$$Q(\%) = \frac{F_{\text{Polyplexe}} - F_{\text{Hintergrund}}}{F_{\text{DNA}} - F_{\text{Hintergrund}}} \times 100 \%$$

Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Polyplexe wurden am Max Plank Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen sowie an der Universität Aarhus, Dänemark von Frau Dr. Monika M. Golas und Herrn Dr. Björn Sander aus der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Holger Stark angefertigt. Neben der Negativfärbung wurde eine native Kryopräparation durchgeführt. Die Polyplexe wurden wie unter 2.8.1 beschrieben in HBS mit einer finalen pDNA-Konzentration von $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ bei einem N/P -Verhältnis von 10 für br-PEI und einem N/P -Verhältnis von 20 für die P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Copolymere frisch hergestellt.

Für die Negativfärbung wurden $25 \mu\text{l}$ der Polyplexlösung auf einen mit Kohle bedampften Kunststoffilm (Trägerfilm) für 90 sec absorbiert. Für die Kontrastierung mit 2%iger Uranylformiat-Lösung wurde nach dem Anheften der Partikel an das Netzchen ein Teil der Probenflüssigkeit durch Kontrastmittel ersetzt und 2 min kontrastiert. Nach der Kontrastierung wurden die Proben mit Hilfe eines zweiten perforierten Trägerfilms aus der Färbelösung entnommen (Valentine et al., 1968) und bei RT getrocknet. Die Negativkontrastierung ermöglicht eine kontrastreiche Abbildung kleiner Partikel wie Polyplexe. Bei dieser Methode werden die Partikel durch Schwermetallsalze wie Uran umhüllt, wobei das Kontrastmittel nicht in hydrophile Bereiche der Probe reagiert und das Wasser ersetzen kann. Da Schwermetalle eine Barriere für Elektronenstrahlen darstellen, erscheinen diese Bereiche im Elektronenmikroskop mit negativem Kontrast, das heißt die Probe hell vor dunklem Untergrund (Hayat and Miller, 1990).

Zur Herstellung der nativen Kryopräparate wurden $5 \mu\text{l}$ der Polyplexlösung auf einen perforierten mit Kohle bedampften Kunststoffilm (Trägerfilm), der zur mechanischen Stabilisierung auf einen Metallnetz aufgebracht war, aufgetragen. Anschließend wurde der Trägerfilm in flüssigem Ethanol schockgefroren und bis zur Aufnahme in flüssigem Stickstoff gelagert (Adrian et al., 1984).

Die Auswertung erfolgte mit einem Transmissionselektronenmikroskop CM200 FEG (Philips/FEI, Eindhoven, Niederlande) bei 160 kV, wobei die Partikelgrößen im Anschluss mit Hilfe der Software EMMENU (TVIPS, Gauting, Germany) vermessen wurden. Folgende Parameter wurden für die Aufnahme verwendet: RT (Negativkontrastierung) beziehungsweise unter flüssigem Stickstoff (Kryopräparate), Kryogefäß (Gatan, Deutschland), Kamera 4k x 4k CCD (charge-coupled device; TVIPS, Gauting, Germany), 70.000-

fache Vergrößerung.

Rasterkraftmikroskopie (engl. *Atom Force Microscopy*, AFM)

Die Polyplexe wurden wie unter 2.8.1 beschrieben mit einem N/P -Verhältnis von 10 für br-PEI und mit einem N/P -Verhältnis 40 für P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Copolymere frisch hergestellt. Plasmid-DNA Komplexe wurde in HBS mit einer finalen Konzentration von $0,02 \mu\text{g/ml}$, mRNA Komplexe aus Stabilitätsgründen unter RNase freien Bedingungen in Wasser für Injektionszwecke bei einer Konzentration von $0,01 \mu\text{g/ml}$ hergestellt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei RT wurden die Proben auf eine mit Glimmer beschichtete Oberfläche (Mica, Al-K-(Mg)-Silikate) aufgetropft und mit Hilfe einer Heißluftpistole getrocknet. Die Probenvorbereitung und die Aufnahmen wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Schneider an der Universität Saarbrücken durchgeführt. Verwendet wurde ein BioScope Rasterkraftmikroskop (Veeco Instruments, Mannheim, Deutschland) ausgestattet mit NanoScope IV Kontroller und SiO₂ Tipps, $\nu = \text{kHz}$ mit $k \approx 40 \text{ N/m}$ (Anfatec, Oelsnitz, Deutschland). Die Proben wurden im trockenen Zustand im Tappingmodus aufgenommen.

2.8.3 *In vitro* Untersuchungen

***In vitro* Transfektionen**

Zur Durchführung von *in vitro* Transfektionsstudien wurden 24 h vor der Transfektion je nach Zelltyp 20.000 -25.000 Zellen (96-Well-Platte) beziehungsweise 90.000 bis 120.000 Zellen (24-Well-Platte) pro Well ausgesät, wobei nur Zellen bis Passagen 20 für die Transfektion verwendet wurden. Dies resultierte in einer Konfluenz von circa 70 % am Tag der Transfektion. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und $150 \mu\text{l}$ (96-Well-Platte) beziehungsweise $200 \mu\text{l}$ (24-Well-Platten) Medium ohne Serum vorgelegt. Für die Studien zur Freisetzung aus dem Endosom wurde dem Medium entsprechend $100 \mu\text{M}$ Chloroquin beziehungsweise 200 nM Bafilomycin zugesetzt. Im Anschluss wurden $50 \mu\text{l}$ der Polyplexe, entsprechend einer Plasmid-DNA Menge von $0,5 \mu\text{g}$ (96-Well-Platte) beziehungsweise $1 \mu\text{g}$ (24-Well-Platte) auf das vorgelegte Medium gegeben. Die Vergleichsstudien mit mRNA wurden mit gleicher Anzahl an Genkopien durchgeführt, was einer Plasmid-DNA Menge von $0,25 \mu\text{g}$ und einer mRNA Menge von $0,65 \mu\text{g}$ pro Well entsprach (24-Well-Platte). Nach einer Inkubationszeit von 4 h bei 37°C , 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchte wurden die Polyplexe abgenommen, die Zellen erneut ein-

malig mit PBS gewaschen und durch serumhaltiges Medium mit Zusatz von Antibiotika (Penicillin/Streptomycin 0,1 % (v/v); Gentamycin 0,5 % (v/v)) ersetzt.

Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Luziferaseaktivitätsmessung

Zur Untersuchung der Gentransfereffizienz chimärer Polymer-Polypeptid Konjugate *in vitro* wurde das Plasmid pCMVLuc verwendet, welches für das Reporter-Gen Luziferase kodiert (siehe 2.5.1). Das Luziferase-Enzym katalysiert in einer ATP-abhängigen Reaktion die oxidative Decarboxylierung des Luziferins (Substrat) unter gleichzeitiger Lichtemission bei einer Wellenlänge von 562 nm. Liegt ein Substratüberschuss vor, so ist die Lichtemission proportional zur Luziferasemenge (Abb. 2.12) (Viviani, 2002). Die Luzifera-

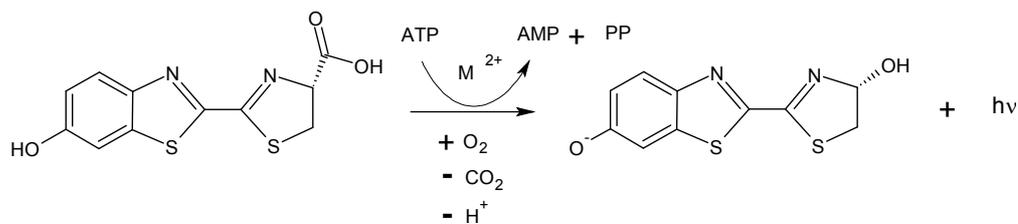


Abbildung 2.12: Mechanismus der *Photinus*-Luziferase Reaktion

seaktivität wurde 24 h nach der Transfektion gemessen, indem die Zellen einmal mit PBS gewaschen, pro Well mit 100 μl 1x Zellysepuffer versetzt und nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT für 60 sec geschüttelt wurden. Anschließend konnte zu einem Aliquot von 50 μl automatisch 100 μl Luziferin-Substrat zu pipettiert und die Lichtemission über einen Zeitraum von 5 sec in einem Plattenreader (Wallac Victor²/ 1420 Multilabel Counter) vermessen werden, wobei vor Zugabe des Substrats der Hintergrund ebenfalls über den Zeitraum von 5 sec bestimmt wurde. Die Luziferaseaktivität, gemessen als emittierte Photonen (engl. *Relative Light Units*, RLU), wurden nach Hintergrundkorrektur über einen Zeitraum von 10 sec integriert und auf die Gesamtproteinmenge der Zellmasse bezogen. Das Gesamtprotein wurde zuvor mittels eines Standard Protein Assays (Methode nach Biorad) bestimmt.

Bestimmung der metabolischen Zellviabilität

Die Zytotoxizität der Polymere wurde mittels eines auf ATP (Adenosintriphosphat) basierenden Testassays (ATPlite, Perkin Elmer) untersucht. ATP

dient als Marker für die akute Toxizität auf Zellebene, da die Zellviabilität in allen metabolisch aktiven Zellen rapide abnimmt, sobald Zellen durch Nekrose oder Apoptose absterben. Der Test bestimmt die Anzahl lebender Zellen anhand der ATP-Konzentration und beruht auf der bereits in Abbildung 2.12 beschriebenen Reaktion, wobei im Gegensatz zur Bestimmung der Luziferaseaktivität sowohl Luziferin als auch Luziferase den Proben zugesetzt werden müssen. Aus der Reaktion geht hervor, dass die ATP-Menge direkt proportional zum emittierten Licht ist. Mit einer Detektionsgrenze von 1.563 Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte weist der verwendete Test dabei eine extrem gute Sensitivität auf. Zur Durchführung der Zytotoxizitätsmessung wurden die Zellen analog Kapitel 2.8.3 in einer 96-Well-Platte ausgesät, unmittelbar vor dem Versuch das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit unterschiedlichen Konzentrationen an Polymer (16-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$), verdünnt in serumhaltigem Medium, versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37°C, 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchte wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 50 μl PBS pro Well vorgelegt. Daraufhin konnte die Zellviabilität gemäß den Angaben des Herstellers bestimmt werden. Die Messung der Lumineszenz erfolgte in einem Plattenreader (Wallac Victor²/ 1420 Multilabel Counter), wobei die Lumineszenz unbehandelter Zellen als Referenzwert mit einer Viabilität von 100 % verwendet wurde.

Studien zur Aufnahme der Polyplexe in die Zelle

Untersuchungen zur Aufnahme der Polyplexe in die Zelle wurden mit fluoreszenzmarkiertem pCMVLuc Plasmid durchgeführt (siehe 2.8.2). Die Zellen wurden analog Kapitel (2.8.3) in einer 24-Well-Platte ausgesät und transfiziert. Nach 1 h Inkubationszeit bei 37°C wurden zwei unterschiedliche Methoden angewandt, um zwischen extrazellulär gebundenen Polyplexen und intrazellulär aufgenommenen Polyplexen zu differenzieren.

Methode 1 bediente sich unterschiedlicher Waschpuffer. Werden die Zellen lediglich mit PBS gewaschen, so erhält man in der Summe extrazellulär gebundene und intrazellulär aufgenommene Polyplexe, wohingegen durch das Waschen mit CellScrub[™] Puffer (15 min, RT) extrazellulär gebundene Partikel durch positiv geladene Moleküle im Waschpuffer verdrängt werden. Nach dem Waschvorgang wurden die Zellen mittels Trypsin mit 0,05 % EDTA (8 min, 37°C) von den Platten abgelöst, in 400 μl Medium resuspendiert und bis zur Messung auf Eis gelagert. In Methode 2 wurde die Fluoreszenz extrazellulär gebundener Polyplexe mittels Trypanblau ausgelöscht (Trypanblau-Quenching) (Hed et al., 1987; Innes and Ogden, 1999). Da der Farbstoff nicht

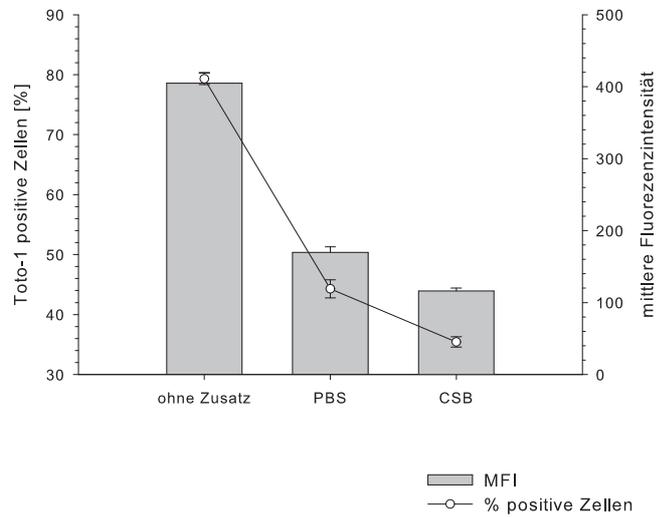
in lebende Zellen eindringen kann, wurde lediglich die Fluoreszenz der extrazellulär befindlichen Partikeln gelöscht. Die Zellen wurden hierzu einmal mit PBS gewaschen und direkt vor der Messung mit Trypanblau (0,15 mg/ml, pH 7,4) versetzt, wobei die Konzentration an Trypanblau und der pH-Wert der Lösung zuvor am Beispiel von P(DMAEMA)/pDNA Polyplexen optimiert wurde (Hed et al., 1987).

Zusätzlich wurde die Anzahl toter Zellen mittels Propidiumiodid bestimmt (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Die Messung der Proben erfolgte für beide Methoden mittels Durchflusszytometrie (FACSscan ausgestattet einem 488 nm luftgekühlten Argon Ionenlaser) unter Verwendung folgender Parameter: mindestens 2.000 Zellen pro Replikat, Größe der Zellen: Vorwärtsstreulicht (engl. *Forward Angle Light Scatter*, FSC), Granularität: Seitwärtsstreulicht (engl. *Side Angle Light Scatter*, SSC), Filter 1 mit einer Emission von 530 ± 30 nm zur Detektion TOTO-1 positiver Zellen, Filter 2 mit einer Emission von 585 ± 42 nm zur Detektion toter Zellen. Die Auswertung wurde mittels CellQuest 3.1 Software (Becton Dickinson GmbH, Deutschland) durchgeführt. In Abbildung 2.13 sind beide Methoden vergleichend dargestellt.

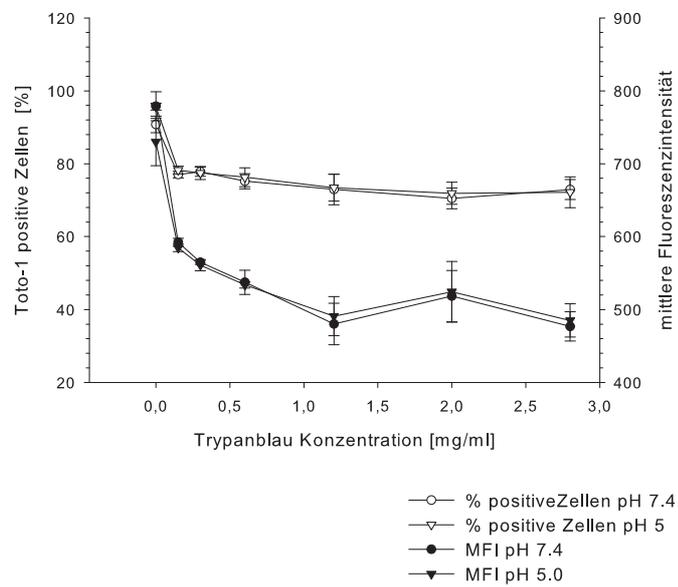
2.8.4 *In vivo* Untersuchungen

Die *in vivo* Applikation erfolgte über die intratracheale Route lokal in die Lunge. Pro Gruppe wurden 5 weibliche Balb/c Mäuse im Alter von 6-8 Wochen (Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle, Frankreich) behandelt. Die Tiere wurden unter definiert pathogenfreien Bedingungen gehalten und mindestens 7 Tage an die Umgebung der Tierversuchsanstalt akklimatisiert. Die Durchführung der Versuche erfolgte gemäß den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes und unter Kontrolle der lokalen Ethikkommission. Die Narkose wurde mittels antagonistischer Triple-Kombination (Medetomidin 0,5 mg/kg Körpergewicht (KG), Midazolam 5 mg/kg KG und Fentanyl 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG) intraperitoneal (i.p.) eingeleitet und mit den entsprechenden Antagonisten (Atipamezol 2,5 mg/kg KG, Flumazenil 0,5 mg/kg KG und Naloxon 1,2 mg/kg KG) bei Bedarf beendet. Die Polyplexe wurden analog Kapitel 2.8.1 in HBS bei einem *N/P*-Verhältnis von 10 beziehungsweise 20 für br-PEI und P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Copolymer (F_{OEGMA} 33,3 % und 9 EG-Einheiten) unter Verwendung von ccc pCpGLuc (siehe 2.5.1) hergestellt.

Die intratracheale Applikation erfolgte mittels Microspray[®] Aerosolizer. Es wurden pro Maus 50 μl entsprechend einer Plasmid-DNA Menge von 12,5 μg appliziert. Vor der Applikation wurden die Mäuse narkotisiert und auf einem Plattensystem (HaloWell EMC) so positioniert, dass die Intubation



(a) CellScrub™ Puffer Methode



(b) Trypanblau-Quenching

Abbildung 2.13: Methoden zur Diskriminierung zwischen extrazellulär gebundenen und internalisierten Polyplexen

erleichtert wurde (Bivas-Benita et al., 2005). 5 min nach erfolgter Applikation wurde die Intubationskapillare entfernt, die Tiere nach weiteren 5 min von der Fixierung befreit und die Narkose ausgeleitet.

Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte durch Messung der Biolumineszenz (Luziferase-Reaktion siehe Kapitel 2.9) unter nicht-invasiven Bedingungen (IVIS[®] 100 Imaging System). Hierzu wurden die Tiere 24 h nach der Applikation narkotisiert und das Substrat D-Luziferin (3 mg pro Maus) i.p. injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min erfolgte die Messung der Biolumineszenz mittels IVIS[®] 100 Imaging System auf einer beheizten Platte (37°C). Folgende Kameraeinstellungen wurden verwendet: Sichtfeld 10, f1 f-stop, high resolution binning, Belichtungszeit 10 min. Anschließend konnte das Signal in der Lunge mit Hilfe der Living[®]Image Software Version 2.50 (Xenogen, Alameda, CA, USA) nach Hintergrundkorrektur quantifiziert werden.

2.8.5 Bestimmung der Filmgüte in Abhängigkeit vom Biomaterial und Lösungsmittel

Um die Filmbildung in Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel und dem Polymertyp näher charakterisieren zu können, wurden Sprühversuche in Petrischalen durchgeführt. Hierzu wurde eine 10 %ige (m/v) Polymerlösung im jeweiligen Lösungsmittel hergestellt und jeweils 1 ml Polymerlösung (Spritze 1) mit 1 ml Wasser für Injektionszwecke (Spritze 2) bei 1,5 bar versprüht. Eine Wartezeit von 5 min sollte eine vollständige Ausbildung der Matrix ermöglichen. Für die visuelle Betrachtung der Matrix wurde die wässrige Phase mit Brillantblau G angefärbt und der Abstand zur Sprühfläche mit 11 cm eingestellt. Die weiteren Versuche wurden allerdings ohne Fixierung durchgeführt, da dadurch ein homogenerer Film erzielt werden konnte.

Um die Matrixgüte besser beurteilen zu können, wurde der Überstand abgenommen und in einer Vakuumanlage (Speed-Vac) bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Analog dazu wurde die Matrix in einer Gefrier Trocknungsanlage ebenfalls bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, wodurch anschließend der prozentuale Anteil des Polymers im Überstand (Verlust) und im Präzipitat (Matrixgüte) bezogen auf die Gesamtmenge an eingesetzten Polymer ermittelt werden konnte.

2.8.6 Bestimmung der Gewebeverträglichkeit des Lösungsmittels

Die Zytotoxizität der Lösungsmittel wurde mittels eines auf ATP-basierenden Testassays (ATPlite, Perkin Elmer) bestimmt (siehe 2.8.3). Analog Kapitel 2.8.3 wurden 24 h vor dem Versuch Zellen in einer 96-Well-Platte ausgesät, unmittelbar vor dem Versuch das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 50 μl serumhaltiges Medium mit Antibiotikazusatz (Penicillin/Streptomycin 0,1 % (v/v); Gentamycin 0,5 % (v/v)) vorgelegt. Daraufhin wurde jeweils 50 μl unterschiedlicher Konzentrationen an Lösungsmittel (16-500 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), verdünnt in Wasser für Injektionszwecke, zugegeben und unterschiedlich lange bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchte inkubiert (15, 30, 60, 221, 360 und 640 min). Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen, 50 μl PBS pro Well vorgelegt und die Zellviabilität gemäß den Angaben des Herstellers bestimmt. Die Messung der Lumineszenz erfolgte in einem Plattenreader (Wallac Victor²/ 1420 Multilabel Counter), wobei die Lumineszenz unbehandelter Zellen (50 μl Wasser für Injektionszwecke) als Referenzwert mit einer Viabilität von 100 % verwendet wurde. Für jeden Zeitpunkt wurde die Konzentration des Lösungsmittels gegen die gemessene Zellviabilität (Mittelwerte \pm Standardabweichung aus n=4 Ansätzen) aufgetragen und eine nicht-lineare Standardfunktion angepasst:

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + \left(\frac{x}{EC50}\right)^{Hilfslope}}$$

Diese Funktion ergab für alle Lösungsmittel eine gute Anpassung: Tetraglykol ($R^2 = 0,9181-0,9900$), Glycerolformal ($R^2 = 0,9268-0,9945$), Dimethylisobutylid ($R^2 = 0,9647-0,9894$). Die LD50 Werte wurden den Schätzwerten der geplotteten Regressionskurve entnommen. Es handelt sich dabei um die Konzentration, bei der noch 50 % Zellviabilität gemessen werden konnte.

2.8.7 Viskoelastische Eigenschaften *in situ* gebildeter Filme

Um eine Vorstellung über die viskoelastischen Eigenschaften der Matrix zu erhalten, wurden rheologische Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurden die Filme auf die Platte eines Rotationsviskosimeters (Physica MCR 301) aufgesprüht und die Biomaterialien (Rhesomer[®] RG 504 H und 502 H) in einem dynamischen Scherexperiment in Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel getestet. Hierbei wird eine harmonisch oszillierende Scherspannung mit definierter Amplitude und Frequenz an eine Probe angelegt und

die resultierende Scherverformung bestimmt, die durch zwei Antwortgrößen, die Antwortamplitude und die Antwortfrequenz, auch Phasenverschiebung genannt, charakterisiert ist. Beide Antwortgrößen können mathematisch in das Speichermodul G' und Verlustmodul G'' umgeformt werden, wobei das Speichermodul den gespeicherten und somit wiederverwertbaren Anteil der eingebrachten Bewegungs- beziehungsweise Verformungsenergie kennzeichnet (elastischer Anteil) und das Verlustmodul, ein Maß für die pro Schwingung in Wärme abgegebene Energie und somit und somit verlorenen Anteil darstellt (reibungsbefahter Anteil).

2.8.8 Herstellung und Charakterisierung pulverförmiger Polyplexe

Die Polyplexe wurden unter Verwendung von pCMVLuc und l-PEI bei einem N/P -Verhältnis von 10 analog Kapitel 2.8.1 in Wasser für Injektionszwecke hergestellt. Zur Testung unterschiedlicher kryoprotektiver Stoffe wurden die Polyplexe nach der Inkubationszeit mit einer 20 %ige (m/v) Saccharose-Lösung, einer 20 %ige (m/v) Mannose-Lösung oder einer 4 %ige (m/v) Dextran 5.000 Lösung 1:2 verdünnt, gemischt und aliquotiert. Diese konnten anschließend in Stickstoff schockgefroren und circa 24 h bei maximaler Leistung in der Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert werden. Die Lyophilisate wurden zu einer finalen Konzentration von $0,02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (gleiche Ausgangskonzentration) in dem jeweiligen Medium resuspendiert und eine Transfektion auf BEAS-2B Zellen in 96-Well-Platten analog Kapitel 2.8.3 durchgeführt.

Um in späteren Versuchen größere Mengen handhaben zu können, wurde Saccharose in Pulverform nach einer Inkubationszeit von 10 min zugegeben und die Komplexe weitere 10 min inkubiert, wobei vor und nach Zugabe von Saccharose die Partikelgröße mittels PCS (siehe 2.8.2) kontrolliert wurde. Nach Lyophilisation konnte das Pulver in einem Mörser mit Pistill homogenisiert und anschließend mittels Homogenisator, einem zylindrischen Glasgefäß mit Glas-Pistill (Schütt Labortechnik, Deutschland), oder mittels Ultra-Turrax[®] (Stufe 3, 14 sec) in der PLGA-Lösung suspendiert werden. Alternativ dazu wurde das Pulver direkt oder vorher mittels Mörser homogenisiert in Wasser für Injektionszwecke resuspendiert. Die Gelelektrophorese wurde analog Kapitel 2.8.2 unter Zugabe von Heparansulfat durchgeführt. Die Lyophilisate wurden zu einer finalen Konzentration von $0,02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ in dem jeweiligen Medium resuspendiert, eine Transfektion auf BEAS-2B Zellen oder A549 Zellen in 24-Well-Platten analog Kapitel 2.8.3 und eine Gelelektrophorese analog Kapitel 2.8.2 unter Zugabe von Heparansulfat durchgeführt.

2.8.9 Versuche zur Bestimmung der Freisetzungskinetik aus *in situ* gebildeten Filmen

Die Versuche zur Ermittlung der Freisetzungskinetik wurden in verschließbaren Petrischalen (Petri dishes without absorbent 50x9mm, PAll) bei 37°C unter ständigem Schütteln in einem Inkubator durchgeführt. Hierzu wurden die Proben analog Kapitel 2.8.5 mit Wasser für Injektionszwecke versprüht. Lyophilisierte l-PEI/pCMVLuc Komplexe (*N/P*-Verhältnis 10, 10 %ige Saccharose, 25 µg pDNA/Ansatz) wurden in homogenisierter Form (Mörser und Pistill) zuvor in der PLGA-Lösung dispergiert oder in der Wasserphase resuspendiert (siehe Kapitel 2.8.8). Als Kontrolle wurde Wasser für Injektionszwecke eingesetzt. Nach dem Sprühen wurde 5 min gewartet, der Überstand abgenommen (0 h-Wert) und 1 ml PBS zugegeben und in regelmäßigem Abstand komplett ausgetauscht, wobei die Proben bis zur Analyse bei -20 °C gelagert wurden.

Die Quantifizierung der freigesetzten Plasmid-DNA aus der *in situ* geformten Matrix erfolgte photometrisch. Vor der Vermessung wurden die Proben mit Chloroform ausgeschüttelt (1 ml, 400 g, RT, 10 min), um PLGA Abbauprodukte abzutrennen, die bei einer photometrischen Quantifizierung stören würden (Csaba et al., 2005). Die Proben wurden anschließend photometrisch bei 260 nm vermessen (Nanodrop-1000). Im Vorfeld wurden l-PEI/pDNA Polyplexe (pDNA-Konzentration 100 µg/ml) in Wasser für Injektionszwecke hergestellt (siehe 2.8.1) und eine Standardreihe durch serielles Verdünnen mit PBS an 5 individuellen Tagen bei 260 nm ermittelt (Abb. 2.14), an Hand derer anschließend die Konzentration an freigesetzter komplexierter Plasmid-DNA berechnet werden konnte. Als Kontrolle wurden unbeladene Filme untersucht (Hintergrundkorrektur), kleine Abweichungen in den Volumina wurden durch Auswaage der Proben über die Dichte von Wasser berücksichtigt.

2.8.10 Durchführung der *in vitro* Sprühversuche

L-PEI/Plasmid-DNA Polyplexe (*N/P*-Verhältnis 10, 100 µg pDNA/ Ansatz) wurden analog Kapitel 2.8.5 formuliert, mit 10 % Saccharose lyophilisiert und mittels Mörser und Pistill homogenisiert, wodurch diese nach Gewicht dosiert und entweder in einer steril filtrierten PLGA-Lösung dispergiert oder in der Wasserphase (Wasser für Injektionszwecke) resuspendiert werden konnten (siehe 2.8.8). Wasser für Injektionszwecke ohne Zusätze wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Als Plasmid-DNA wurde pMetLuc und pCMV-tPA-IRES-Luc in gleichem Verhältnis verwendet.

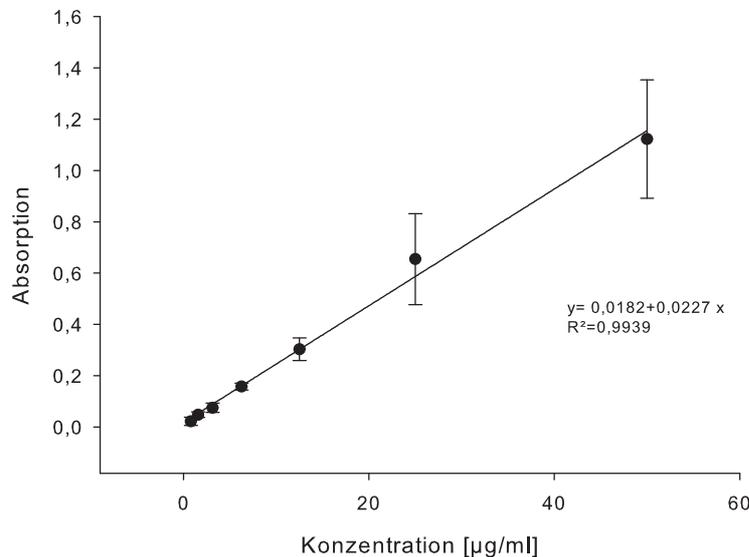


Abbildung 2.14: Verdünnungsreihe von l-PEI/pDNA Polyplexen in PBS

3 Tage vor Beginn der Versuche wurden Met5A Zellen auf hängenden Einsätzen (1 µm PET Millicell) mit einer Polyethylene terephthalate (PET) Membran ausgesät, die eine lichtmikroskopische Kontrolle der Zellen ermöglicht. Jeweils 1,5 ml Zellkulturmedium wurde vorgelegt, die Einsätze 2 min darin äquilibriert und anschließend 250.000 Zellen pro Well in 1,5 ml Medium auf der Membran ausgesät. Vor dem Versuch wurde das Medium abgenommen, einmal mit PBS gewaschen und die Proben analog Kapitel 2.8.5 auf die Zellen aufgesprüht. Die Probenentnahme erfolgte zu Beginn täglich, später alle zwei bis drei Tage, wobei das Medium komplett gewechselt, die Proben sofort auf Eis gestellt und bei -80°C bis zur analytischen Bestimmung gelagert wurden.

2.8.11 Bestimmung der Transfektionseffizienz über die Expression der Metridialuziferase

Erste *in vitro* Sprühversuche wurden mit einer Mischung aus l-PEI/pMetLuc und l-PEI/pIRES-Luc-tPA Polyplexen durchgeführt. Das pMetLuc Plasmid kodiert für ein von der Zelle sezerniertes Luziferase-Enzym, die Metridialuziferase, und ermöglichte daher die Messung der Gentransfereffizienz über die Enzymexpression im Überstand der Proben. Analog Kapitel 2.8.3 katalysiert

die Luziferase die oxidative Decarboxylierung des Luziferins, in diesem Fall Coelenterazin, unter gleichzeitiger Lichtemission bei einer Wellenlänge von 482 nm. Zu ausgewählten Probenzeitpunkten wurden Proben mittels Ready-To-Glow Automation Kit (Clontech, A Takara Bio Company, Frankreich) untersucht, indem diese auf Eis aufgetaut und die Lichtemission über einen Zeitraum von 5 sec ohne vorheriges Verdünnen gemäß den Angaben des Herstellers in einem Plattenreader (Wallac Victor²/ 1420 Multilabel Counter) vermessen wurden. Vor Zugabe des Substrats wurde der Hintergrund ebenfalls über den Zeitraum von 5 sec bestimmt, so dass die Luziferaseaktivität (RLU Werte) nach Hintergrundkorrektur über einen Zeitraum von 10 sec integriert und die jeweiligen Negativkontrollen von den Werten subtrahiert werden konnte. Unbehandelte Zellen dienten dabei als Negativkontrolle für die Bolusgabe (Einmalapplikation der kompletten pDNA Menge in Wasser für Injektionszwecke) und unbeladene Filme wurden als Negativkontrolle für die Matrixsysteme verwendet.

2.8.12 Bestimmung der Gesamtgewebeplasminogen Konzentration mittels ELISA

Als Zusatz zu Kapitel 2.8.11 wurde die Gesamtgewebeplasminogen-Konzentration in ausgewählten Proben mittels Antigenassays (engl. *Enzyme Linked Immuno fluoreszenz Polymerisation*, ELISA) im Überstand der Zellen bestimmt (Human tPA Total Antigenassays, Innovative Research, Dunn Labortechnik GmbH, Deutschland), wobei mit dem eingesetzten Assay neben freiem und somit aktivem tPA auch die latente und an den Inhibitor gebundene Form detektiert wurde. Da es sich um Überstände aus der Zellkultur handelte, wurde der Standard analog den Proben in Zellkulturmedium der verwendeten Zellen ohne FCS verdünnt. Die Positivkontrolle (Bolusgabe) wurde wie folgt verdünnt: 1:50 (48 h, 9 d), 1:10 (16, 23 und 29 d). Die Proben aus dem inneren Kompartiment wurden aufgefüllt (30 μ l Probe ad 100 μ l), wohingegen die Proben aus dem äußeren Kompartiment unverdünnt analysiert wurden. Der Assay wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt und die Absorption bei 450 nm über einen Zeitraum von 0,1 sec in einem Plattenreader (Wallac Victor²/ 1420 Multilabel Counter) gemessen. Die Standardkurve ist in Abbildung 2.15 dargestellt. Die Negativkontrollen wurden analog Kapitel 2.8.11 verwendet.

2.8.13 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

Nach Beendigung des Versuchs wurde das Medium entnommen und die in der Matrix verbliebene Plasmid-DNA mit Propidiumiodid angefärbt. Hier-

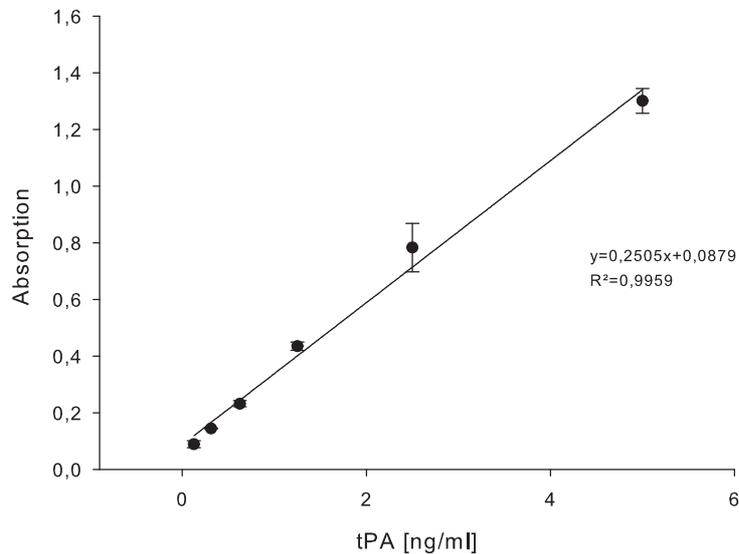


Abbildung 2.15: Standardkurve des humanen tPA-Antigenassays

zu wurde die Matrix mit Propidiumiodid in einer 1:10 Verdünnung in PBS 10 min bei RT inkubiert, vor der Aufnahme erneut mit PBS gewaschen und mit einem Epifluoreszenzmikroskop (Axiovert 135, Carl Zeiss, Jena, 10x Objektiv) Bilder aufgenommen. Die Anregung von Propidiumiodid erfolgte bei 470 ± 20 nm, wohingegen die Emission bei 540 ± 25 nm detektiert wurde. Für die Auswertung wurde die Software Axiovision LE 4.5 verwendet.

2.8.14 Kotransfektion von siRNA und Plasmid-DNA und Bestimmung des tPA/PAI-1-Verhältnis mittels Western Blot

Die Transfektion erfolgte analog Kapitel 2.8.3 in 24-Well-Platten mit einigen Besonderheiten. Es wurden jeweils 750 ng Plasmid-DNA und 30 pmol siRNA komplexiert mit l-PEI bei einem N/P -Verhältnis von 10 (bezogen auf die Plasmid-DNA Menge) eingesetzt. Der Wechsel des Mediums erfolgte nach 6 h. Die Proteine, der gewebespezifische Plasminogenaktivator und der Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 (engl. *Tissue Plasminogen Activator Inhibitor 1*, PAI-1), wurden nach der Transfektion mittels Western Blot analysiert. Da es sich um sezernierte Proteine handelte, konnten diese im Überstand der Zellen nachgewiesen werden, so dass zu unterschiedlichen

Zeitpunkten jeweils 20 μl des Überstands der Zellen entnommen, die Proben pro Ansatz ($n=3$) gepoolt und bei 14.000 rcf und 4°C für 10 min zentrifugiert wurden, um tote Zellen abzutrennen. Die Proben wurden stets auf Eis gelagert und bis zur endgültigen Analyse bei -20°C eingefroren.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte entsprechend ihrer Molekülmasse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Zusammensetzung aller verwendeten Puffer ist im Kapitel 2.3 zusammengestellt. Um Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine zu zerstören, wurden die Ansätze (3,75 μl Probe, 15 μl 1x Auftragspuffer (Western Blot) ad 60 μl Wasser für Injektionszwecke) zuvor für 5 min bei 95°C denaturiert, jeweils 20 μl mittels Elektrophorese auf einem 7,5%igem Tris-HCl Gel (Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland) aufgetrennt und mittels Elektrottransfer (1 h, 200 mA, Transferpuffer) auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen. Nach dem Blotten wurde die Membran zum Zwecke der Inkubation mit verschiedenen Primärantikörpern bei 50 kDa geschnitten (Größenstandard, Precision Plus Protein Standards) und unspezifische Proteinbindungsstellen in einem Absättigungspuffer für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln blockiert. Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln (Maus-Anti-alpha-Aktin 1:15.000, Maus-anti-huPAI-1 monoklonal 1:200, Maus-anti-hutPA monoklonal 1:400 in 1:10 verdünntem Absättigungspuffer). Zur Detektion wurde der sekundäre Antikörper (Ziege-anti-Maus HRP-konjugiert) in einer 1:10.000 Verdünnung (tPA, PAI-1) beziehungsweise in einer 1:20.000 Verdünnung (Aktin) eingesetzt und die Membran für 1,5 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend konnten die markierten Proteine mittels ECL-Chemilumineszenz (Amersham Bioscience, USA) auf einem Film detektiert und zur Quantifizierung mittels Image J Basics Version 1.38 analysiert werden. Die Normalisierung erfolgte über die Aktinbande der unbehandelten Zellen.

2.9 Statistische Auswertung

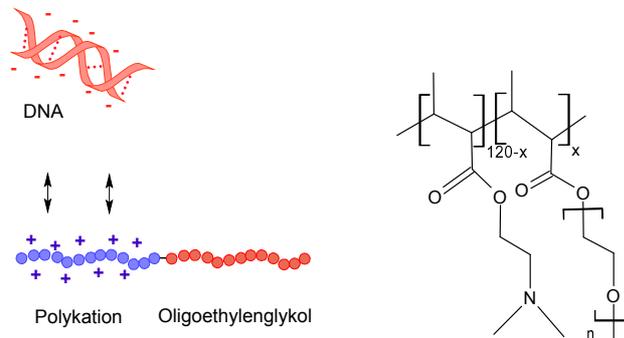
Die Ergebnisse sind, falls nichts anderes angegeben, als Mittelwerte \pm Standardabweichungen dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests berechnet. Statistische Signifikanz wurde bei $\alpha = 0,05$ (*) beziehungsweise bei $\alpha = 0,01$ (**) angenommen.

Kapitel 3

Charakterisierung makromolekularer chimärer Polymer-Peptid-Konjugate als Genvektoren für den nicht-viralen Gentransfer

3.1 Design und Synthese der P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Copolymere

Eine Serie maßgeschneiderter Copolymere auf Methacrylat-Basis wurde mittels ATRP unter ausgewählten Bedingungen synthetisiert. Diese Copolymere zeichneten sich durch eine definierte Zusammensetzung mit bekannter Molekülmasse und enger Molekülmassenverteilung aus und lieferten daher eine gute Basis für die Anwendung als nicht-virale Gentransfervehikel. Im Detail bestanden die Polymere aus zwei Monomerbausteinen, dem kationischen Anteil 2-Dimethylaminoethylmethacrylat (DMAEMA), der für die Komplexierung mit der Nukleinsäure verantwortlich war, und einem variablen EG-Anteil, dem Oligo(ethylenglykol)methacrylat (OEGMA) (Abb. 3.1 (a), (b)). Durch die Einführung des variablen EG-Anteils konnte die Wasserlöslichkeit der Polymere deutlich verbessert werden. Darüber hinaus sollte die Stabilität der Polyplexe im wässrigen System erhöht, die Biokompatibilität verbessert und die Plasmahalbwertszeit nach i.v. Applikation verlängert werden, um in der Folge eine höhere Gentransfereffizienz zu erreichen. Mittels einfacher Click-Chemie war es nachträglich möglich, die Copolymere durch Kopplung mit Peptiden zu funktionalisieren und dadurch chimäre Polymer-Polypeptid-



(a) Schematische Darstellung (b) Strukturformel

Abbildung 3.1: Pfropfcopolymere auf Methacrylat-Basis

Konjugate zu generieren (siehe Kapitel 1.4.4).

3.2 Einfluss der PEGylierung auf die biophysikalischen Eigenschaften der Polyplexe mit Plasmid-DNA

3.2.1 Komplexierung von Plasmid-DNA

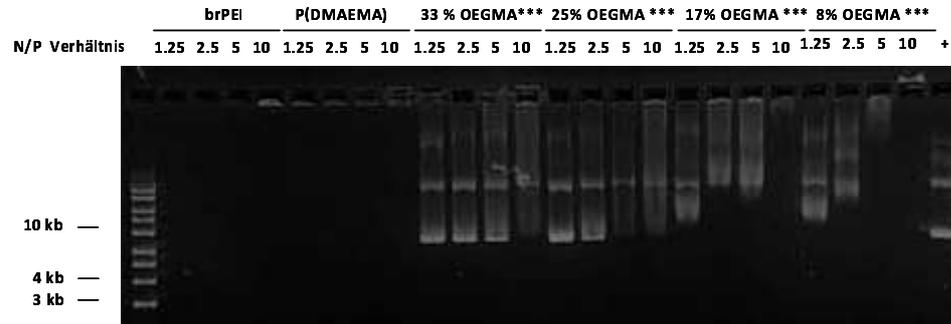
Die Komplexbildungseigenschaften der Copolymere mit Plasmid-DNA wurden mittels Gelelektrophorese untersucht. Ferner wurde der Einfluss der Oligoethylenglykol-(OEG)-Einheiten auf die Polyplexbildung herausgearbeitet. Das Komplexierungsverhalten bei verschiedenen N/P -Verhältnissen ist in Abbildung 3.2 (a), (b) dargestellt. Als Vergleichsstandards wurden br-PEI und P(DMAEMA) untersucht. Beide Polymere zeigten bei allen getesteten N/P -Verhältnissen eine vollständige Komplexierung der Plasmid-DNA, wobei im Falle von br-PEI eine derartig starke Kondensierung der pDNA vorlag, so dass eine Interkalation von Ethidiumbromid nur geringfügig möglich war. Im Vergleich dazu zeigten P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Copolymere mit steigendem PEGylierungsgrad ein reduziertes Komplexierungsverhalten. Während bei niedrigem OEG-Anteil ($F_{OEGMA} < 50\%$ und 9 EG-Gehalt) und höherem N/P -Verhältnis die Plasmid-DNA vollständig komplexiert wurde, war das Komplexierungsverhalten für Copolymere mit höherem PEGylierungsgrad ($F_{OEGMA} > 50\%$ oder EG-Einheiten > 9) unabhängig vom getesteten N/P -Verhältnis unzureichend, so dass ungebundene pDNA im Gel zu erkennen war. Eine Quantifizierung der ungebundenen Plasmid-DNA im Gel

Polymer	# EG-Einheiten	$F_{OEGMA}\%$	rel. Fluoreszenz %
P(DMAEMA)	0	0	66 ± 2
P[DMAEMA _{90-co} -OEGMA(9) ₃₀]	9	25	82 ± 4
P[DMAEMA _{30-co} -OEGMA(9) ₉₀]	9	75	107 ± 3
P[DMAEMA _{90-co} -OEGMA(45) ₃₀]	45	25	108 ± 11
Br-PEI 25 kDa	0	0	14 ± 4

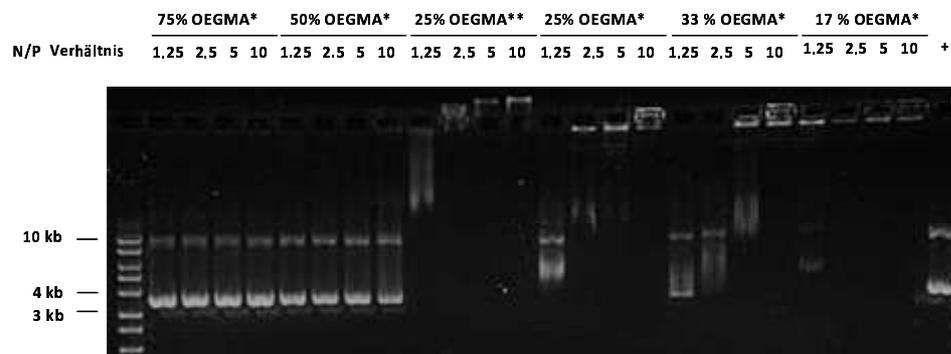
Tabelle 3.1: Fluoreszenz-Quenching-Assay: Ausmaß der Fluoreszenzlöschung von TOTO-1 gelabelter pDNA nach Komplexierung mit P(DMAEMA-co-OEGMA) Copolymeren bei einem N/P-Verhältnis von 20. Als Vergleich wurde br-PEI bei einem N/P-Verhältnis von 10 untersucht. Die relativen Fluoreszenzintensitäten gegenüber unkomplexierter pDNA sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben.

ermöglichte eine bessere Diskriminierung zwischen den verschiedenen PEGylierungsgraden (Abb. 3.2 (c), (d)). Die Daten bestätigen den visuell erkennbaren Trend und zeigten einen drastischen Anstieg auf über 50 % ungebundener Plasmid-DNA bei steigendem OEG-Anteil ($F_{OEGMA} > 25\%$ oder EG-Gehalt > 23). Überraschenderweise war bei einem OEGMA-Gehalt von 25 % kein Unterschied zwischen einem Oligomerisierungsgrad von 9 und 23 EG-Einheiten in der Seitenkette zu erkennen.

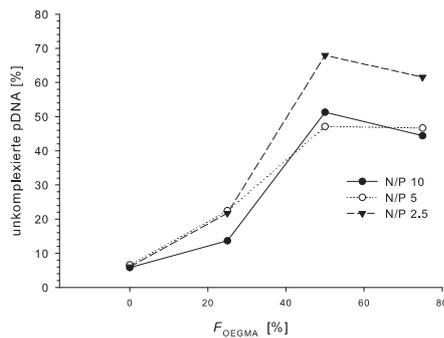
Die Stärke der Komplexbildung wurde darüber hinaus mit einer fluoreszenzbasierten Methode untersucht, indem die pDNA mit einem bisinterkalierenden Fluoreszenzfarbstoff markiert wurde. Es ist bekannt, dass dieser nach Interkalation eine 1000-fach höhere Fluoreszenzintensität aufweist. Wird die pDNA anschließend mit einem kationischen Polymer komplexiert, kommt es je nach Stärke der Komplexierung zu einer Auslöschung der Fluoreszenz, dem sogenannten *Quenching*. In Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse einiger ausgewählter Polymere dargestellt. Die guten Komplexierungseigenschaften von br-PEI, die bereits mittels Gelelektrophorese deutlich wurden, konnten bestätigt werden. Während br-PEI zu einer Reduktion der Fluoreszenz auf 14 % führte, zeigte das Homopolymer P(DMAEMA) mit 66 % relativer Fluoreszenz bereits eine moderate Fluoreszenzlöschung, die mit steigendem PEGylierungsgrad weiter abnahm. Diese extrem großen Unterschiede im Quenching der Polymere auf Methacrylat-Basis im Vergleich zu br-PEI deuteten auf eine unterschiedliche Struktur der gebildeten Komplexe hin. Aufschluss hierüber sollten Untersuchungen zur Bestimmung der Partikelgröße und des Zeta-Potentials sowie elektronenmikroskopische Aufnahmen geben.



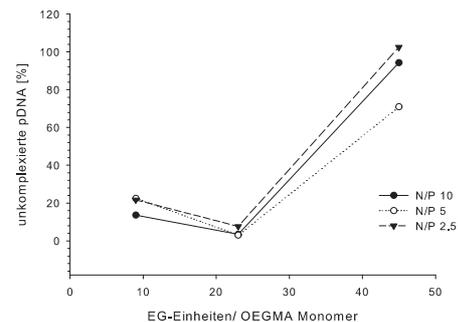
(a) Komplexierung als Funktion des OEGMA-Gehaltes mit 45(***) EG-Einheiten in der Seitenkette



(b) Komplexierung als Funktion des OEGMA-Gehaltes mit 9(*) und 23 (**) EG-Einheiten in der Seitenkette



(c) Anteil unkomplexierter pDNA als Funktion des OEGMA-Gehaltes



(d) Anteil unkomplexierter pDNA in Abhängigkeit vom Oligomerisierungsgrad des EG-Anteils

Abbildung 3.2: Elektrophoretische Mobilität von $P(\text{DMAEMA-co-OEGMA})/p\text{DNA}$ Polyplexen getestet bei unterschiedlichen N/P -Verhältnissen. Als Vergleichsstandards wurden br-PEI und $P(\text{DMAEMA})$ sowie unkomplexierte pDNA (+) untersucht (a, b). Quantitative Auswertung ungebundener Plasmid-DNA in Abhängigkeit vom OEGMA Gehalt (c) und dem Oligomerisierungsgrad der EG-Einheiten (d) im OEGMA-Monomer.

3.2.2 Partikelgröße und Zeta-Potential

Die Partikelgröße und das Zeta-Potential der Polyplexe sind entscheidende Faktoren für die *in vitro* und *in vivo* Gentransfereffizienz von Komplexen, wobei gezeigt werden konnte, dass positiv geladene Polyplexe mit einer Größe von maximal 200 nm gute Gentransfereffizienz aufweisen. Der Einfluss des PEGylierungsgrades auf die Größe und die Oberflächenladung von P(DMAEMA-*co*-OEGMA)/pDNA Polyplexen wurde unter Verwendung eines festen *N/P*-Verhältnisses untersucht. In Abbildung 3.3 wird der Einfluss des EG-Anteils im Copolymer (F_{OEGMA} , $Mw_{OEGMA} = \text{EG-Einheiten} / \text{OEGMA-Monomer}$) auf die biophysikalischen Eigenschaften wie die Partikelgröße und das Zeta-Potential der Polyplexe deutlich. Primär konnte eine Reduktion des hydrodynamischen Durchmessers mit steigendem PEGylierungsgrad beobachten werden, wobei ein Minimum von $115 \pm 0,6 \text{ nm}$ bei $F_{OEGMA} = 25\%$ und 9 EG-Einheiten in der Seitenkette erreicht werden konnte. Die Nanopartikel zeigten dabei eine enge Partikelgrößenverteilung mit einem Polydispersitätsindex (PI) von 0,3 und kleiner ($0,167 \pm 0,085$ bis $0,334 \pm 0,063$). Einzige Ausnahme bildete das Polymer P[DMAEMA₉₀-*co*-OEGMA(9)₃₀] mit einem PI von $0,677 \pm 0,241$. Eine Erhöhung des PEGylierungsgrades durch Erhöhung des OEGMA-Anteils sowie durch Erhöhung des Oligomerisierungsgrades der EG-Einheiten führte zu einer erneuten Zunahme der Partikelgröße. Eine reduzierte Bindungsstärke zwischen Plasmid-DNA und Trägersystem und ein damit verbundener Verlust der kompakten sphärischen Form der Polyplexe bei höherem PEGylierungsgrad wurden als Ursache vermutet (Petersen et al., 2002a).

Die Messung des Zeta-Potentials zeigte ebenfalls einen klaren Trend (Abb. 3.3). Mit steigender PEGylierung kam es zu einer deutlichen Abschirmung der Partikeloberfläche, so dass das Zeta-Potential der Polyplexe mit höherem OEG-Anteil nahe des isoelektrischen Punktes lag ($F_{OEGMA} > 50$, Abb. 3.3 (a)). Im Vergleich dazu wurde ein Zeta-Potential von $+25 \text{ mV}$ für das Homopolymer P(DMAEMA) bestimmt, was den in der Literatur beschriebenen Werten entsprach (Cherng et al., 1996; van de Wetering et al., 1998). Zu beachten gilt dabei allerdings, dass die Messungen in Wasser für Injektionszwecke durchgeführt wurden. Daher sind für Partikel, die in Medien mit höherer Ionenstärke wie HBS generiert werden, etwas geringere Werte zu erwarten als in Abbildung 3.3 dargestellt. Eine weitere Erhöhung des Oligomerisierungsgrades der EG-Einheiten (EG-Einheiten 23 oder 45) führte ferner zu einer negativen Oberflächenladung (Abb. 3.3 (b)). Vermutet wird in diesem Zusammenhang eine „Core-Shell-Corona“-artige Partikelstruktur, die aus einem Kern aus pDNA und dem kationischem Polymeranteil P(DMAEMA)

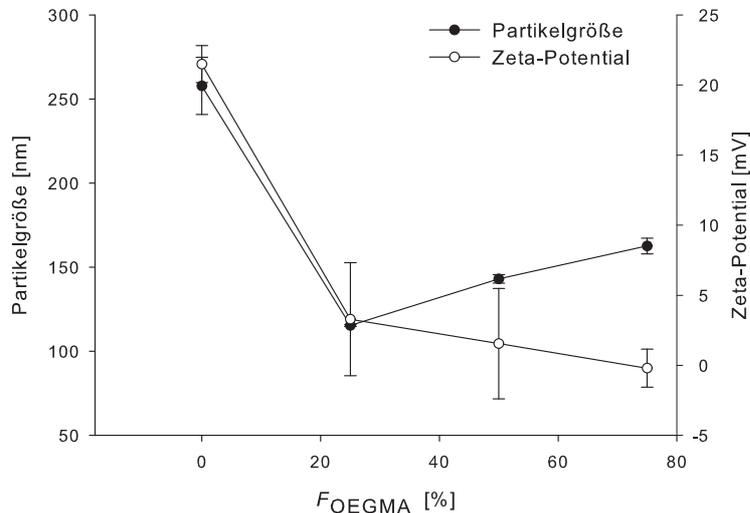
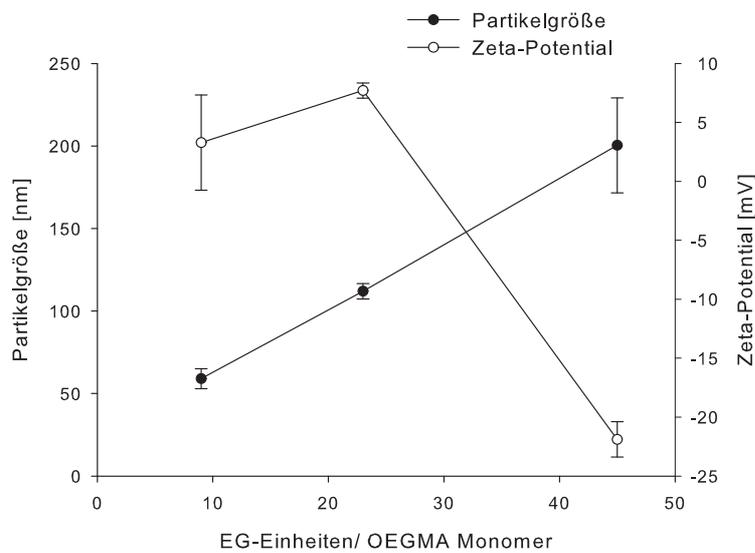
umhüllt von einer EG-Schale aufgebaut ist und zu einer Abschirmung der positiven Nettoladung des Kerns führt. Bei hohen PEGylierungsgraden scheint es jedoch zu einem Verlust der kompakten Struktur zu kommen, so dass pDNA Molekülen an der Oberfläche zugänglich werden.

3.2.3 Kolloidale Stabilität der Polyplexe

Die Stabilität der Polyplexe in Lösung bei Verwendung hoher Nukleinsäurekonzentrationen ist eine wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche *in vivo* Anwendung. Die auf P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Copolymeren basierenden Polyplexe erwiesen sich in isotonischer Salzlösung (HBS, pH 7.4) als kinetisch stabil. Eine Zunahme der Partikelgröße bei geringem PI ($0,123 \pm 0,006$ bis $0,362 \pm 0,009$) konnte über einen Zeitraum von 30 min unabhängig vom PEGylierungsgrad nicht beobachtet werden (Abb. 3.4). Im Gegensatz dazu zeigten Polyplexe, die mit dem unpegylierten Homopolymer P(DMAEMA) generiert wurden, starkes Aggregationsverhalten und führten nach 30 min zu Partikeln mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 600 nm bei enger Partikelgrößenverteilung ($PI\ 0,087 \pm 0,033$). Die gute kolloidale Stabilität der Copolymere im Vergleich zum Homopolymer ist im Wesentlichen auf die Einführung hydrophiler, ungeladener OEG-Segmente in der Polymerstruktur zurückzuführen. Diese tragen zu einer sterischen Stabilisierung der Partikel bei. So gelang es bei einer pDNA-Konzentration von 1 mg/ml stabile Komplexe mit P(DMAEMA-*co*-OEGMA) herzustellen, wohingegen dies für P(DMAEMA) nicht möglich war. Eine Studie mit Polymethacrylaten hatte in diesem Zusammenhang gezeigt, dass es bis zu einer pDNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ möglich war, stabile Komplexe in physiologischem pH-Wert herzustellen. Stabile Polyplexe bei höheren pDNA-Konzentrationen von bis zu 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ könnten nur durch pH-Erniedrigung oder in Anwesenheit eines Schutzkolloids wie Saccharose bei gleichzeitig geringer Ionenkonzentration im verwendeten Medium erzielt werden (Cherng et al., 1999a; Rungsardthong et al., 2003).

3.2.4 Morphologie der Polyplexe

Ergänzend zu den biophysikalischen Untersuchungen wurden Größe, Dispersität und Morphologie der Polyplexe mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Neben der üblichen Negativkontrastierung bei RT wurden die Proben zusätzlich nach nativer Kryopräparation aufgenommen, wobei beide Methoden zu identischen Ergebnissen führten. In Übereinstimmung mit den Lichtstreuungsmessungen konnte für das Homopolymer P(DMAEMA) starke Agglo-

(a) Einfluss des OEGMA-Gehaltes (F_{OEGMA})

(b) Einfluss des Oligomerisierungsgrades der OEGMA-Seitenkette

Abbildung 3.3: Physikalische Eigenschaften der Polyplexe basierend auf $P(DMAEMA-co-OEGMA)$ Copolymeren und $pCMVLuc$ in Abhängigkeit vom PEGylierungsgrad. Die Polyplexe wurden in destilliertem Wasser mit einem N/P -Verhältnis von 20 und einer $pDNA$ -Konzentration von $20 \mu\text{g/ml}$ generiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes angegeben.

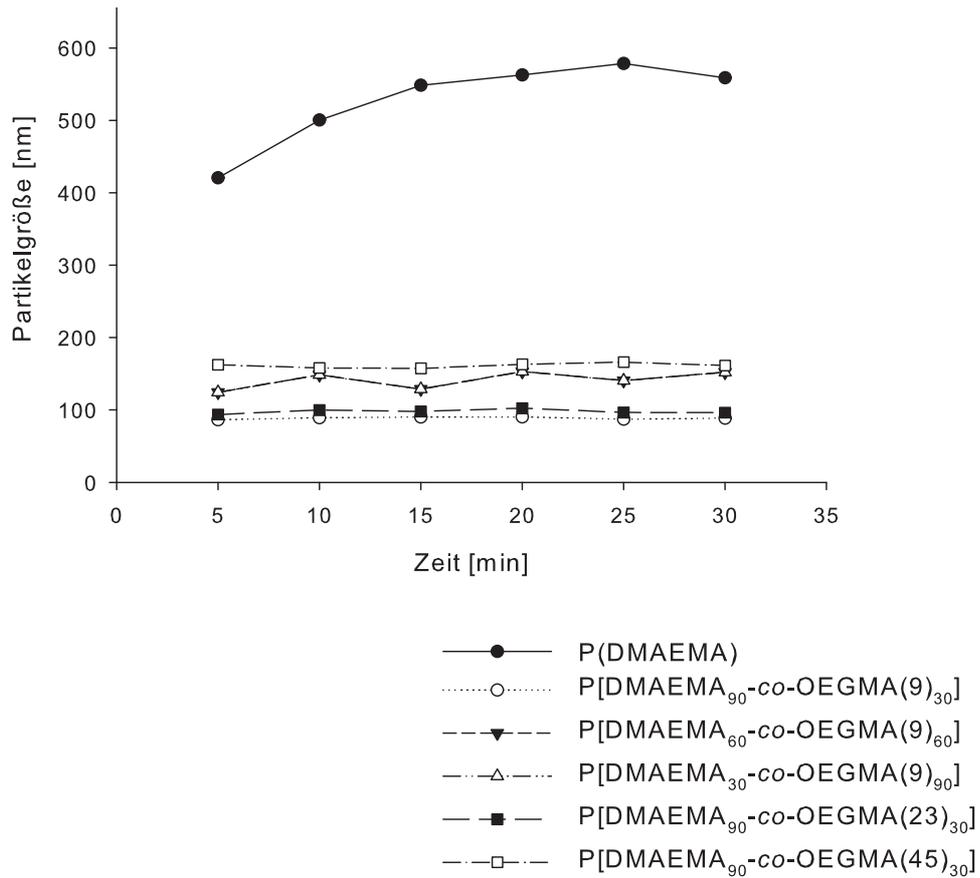


Abbildung 3.4: Kolloidale Stabilität der Polyplexen basierend auf $P(\text{DMAEMA-co-OEGMA})$ Copolymeren und $p\text{CMVLuc}$ in Abhängigkeit vom PEGylierungsgrad. Die Polyplexe wurden in destilliertem Wasser mit einem N/P -Verhältnis von 20 und einer $p\text{DNA}$ -Konzentration von $20 \mu\text{g/ml}$ generiert und die Partikelgröße über einen Zeitraum von 30 min in isotoner Salzlösung ermittelt.

meratbildung nachgewiesen werden. Die Agglomerate zeichneten sich durch eine kompakte sphärischer Form und eine stark schwankende Partikelgröße, im Mittelwert von ungefähr 600 nm, aus (Abb. 3.5 A). Die Einführung von OEG-Einheiten über das OEGMA-Monomer führte zu einer Reduktion der Partikelgröße auf 100-200 nm (Abb. 3.5 B, E), die allerdings bei höheren PEGylierungsgraden mit einem Verlust der sphärischen Partikelstruktur einherging. Eine Veränderung der Partikelstruktur gegenüber den nicht pegylierten Homopolymeren brPEI und P(DMAEMA) hatte sich bereits im Vorfeld durch reduziertes Quenching (siehe Kapitel 3.2.1), steigender Partikelgröße und negativem Zeta-Potential (siehe Kapitel 3.2.2) angedeutet. Mit steigendem PEGylierungsgrad wurden Partikel mit ellipsoid bis schlauchförmiger (toroidal) Struktur beobachtet (Abb. 3.5 B, C), wobei neben Polyplexen zunehmend unkomplexierte pDNA erkennbar war. Diese nahm mit zunehmenden PEGylierungsgrad weiter zu, so dass der größte Anteil der Plasmid-DNA unkomplexiert in einer für sie charakteristischen, filamentartigen Struktur vorlag (Abb. 3.7 C). Ferner fiel im Vergleich zur Kontrolle auf, dass sich das Polymer an die Plasmid-DNA Faser angelagert und diese punktuell kondensiert hatte. Eine Zunahme der Partikelgröße und der Faserdicke der Plasmid-DNA waren die Folge (Abb. 3.7 E).

3.2.5 Untersuchungen zur Zytotoxizität der Polymere

Ein weiterer limitierender Faktor für die Verwendung kationischer Polymere als Gentransfervektoren für die Gentherapie stellt die hohe Zytotoxizität der Polymere dar. Für den gentherapeutischen Ansatz ist man bis heute auf der Suche nach effizienten Gentransfersystemen, die möglichst biokompatibel und nebenwirkungsarm sind. Die akute Zytotoxizität der Copolymere wurde in einem zellbasierten Assays auf ATP-Basis untersucht. Es ist bekannt, dass Polymere mit hoher positiver Ladungsdichte bereits in geringen Konzentrationen potentiell zytotoxisch wirken (Godbey et al., 1999b; Jones et al., 2004; van de Wetering et al., 1998), dieser Effekt allerdings durch Komplexierung mit Plasmid-DNA maskiert werden kann (Dubruel et al., 2003; van de Wetering et al., 1998). Daher wurden die Copolymere ohne Komplexierung in unterschiedlichen Konzentrationen (500- 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$) auf Bronchialepithelzellen untersucht (Abb. 3.6). Durch effiziente Abschirmung der kationischen Ladungsdichte mittels OEG-Einheiten sollte eine Reduktion der Zytotoxizität ermöglicht werden.

Wie erwartet zeigte sich im Falle der kationischen Homopolymere P(DMAEMA) und br-PEI 25 kDa eine hohe Zytotoxizität mit Zellviabilitäten unter 5 % (0,8 % für P(DMAEMA) und 3,7 % für br-PEI bei der höchsten

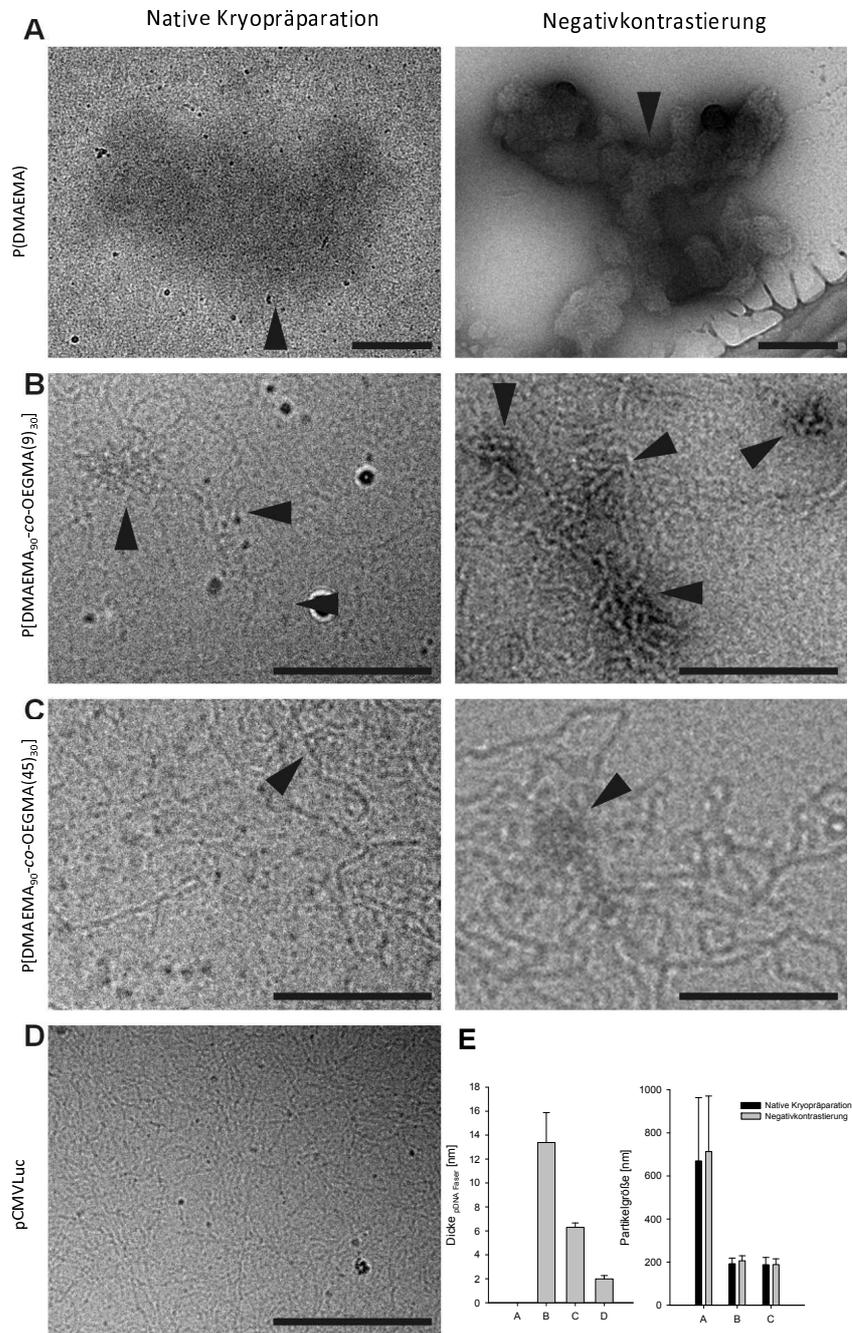


Abbildung 3.5: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von $P(\text{DMAEMA})$ (A) und $P(\text{DMAEMA-co-OEGMA})/\text{pDNA}$ Polyplexen (B, C) hergestellt in HBS bei einem N/P -Verhältnis von 20. Die Polyplexe wurden nach nativer Kryopräparation (linke Bildseite) und mittels Negativkontrastierung (rechte Bildseite) im Elektronenmikroskop untersucht. Einzelne Partikel sind mit Pfeilen markiert. Die Skalierung entspricht 200 nm. Plasmid-DNA (pCMV-Luc) ist als Kontrolle (D) dargestellt. Die Ausmessung der Partikelgröße und die Dicke der Plasmid-DNA Faser sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt (E).

getesteten Polymerkonzentration), wobei P(DMAEMA) sich bei niedrigen Konzentration ($\leq 30\mu\text{g}/\mu\text{l}$) als wesentlich verträglicher herausstellte als br-PEI. Selbst in komplexierter Form wurden für br-PEI Zellviabilitäten von lediglich 65- 80 % beschrieben (Dubruel et al., 2000; Elfinger et al., 2009). Im Vergleich dazu konnte selbst bei hohen Polymerkonzentrationen und niedrigem PEGylierungsgrad kein akuter zytotoxischer Effekt der getesteten Copolymere festgestellt werden.

3.3 *In vitro* Transfektionsstudien: Einfluss des PEGylierungsgrades auf die Transfektionseffizienz

3.3.1 Transfektionseffizienz in Abhängigkeit vom N/P -Verhältnis und Zelltyp

In vitro Transfektionsstudien zur Bestimmung des optimalen N/P -Verhältnisses wurden mittels pCMVLuc auf Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) durchgeführt. Untersucht wurden P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Copolymere im Vergleich zu den nicht pegylierten Standardpolymeren P(DMAEMA) und br-PEI 25 kDa. Ein Überblick über die Transfektionsergebnisse gibt Abbildung 3.7. Eine für kationische Polymere typische gaußförmige Verteilung der Gentransfereffizienz mit einem Maximum bei mittleren N/P -Verhältnissen wurde für die Standardpolymere und die Copolymere mit geringem PEGylierungsgrad beobachtet. Br-PEI zeigte bei einem N/P -Verhältnis von 10 eine 10-fach höhere Gentransfereffizienz gegenüber P(DMAEMA), wenn dieses bei einem optimalem N/P -Verhältnis von 20 eingesetzt wurde. Bei Verwendung höherer N/P -Verhältnisse sank die Gentransfereffizienz bei beiden Polymeren drastisch, was auf die Anwesenheit ungebundener, zytotoxisch wirkender Polymere zurückzuführen ist (Dubruel et al., 2003; van de Wetering et al., 1997; Verbaan et al., 2005).

Im Falle der P(DMAEMA-*co*-OEGMA)/pDNA Polyplexe stieg die Transfektionseffizienz mit zunehmenden N/P -Verhältnis analog zu den Homopolymeren, wobei in Übereinstimmung mit den Komplexierungseigenschaften (Kapitel 3.2.1) relativ hohe N/P -Verhältnisse notwendig waren (N/P -Verhältnis > 10), um eine zufriedenstellende Genexpression zu erreichen. Gentransferraten vergleichbar mit P(DMAEMA) und 10-fach geringer als br-PEI konnten bei niedrigen PEGylierungsgraden (OEGMA-Gehalt $< 33,3\%$ und 9 OEG-Einheiten in der OEGMA-Seitenkette) erreicht werden. Mit zu-

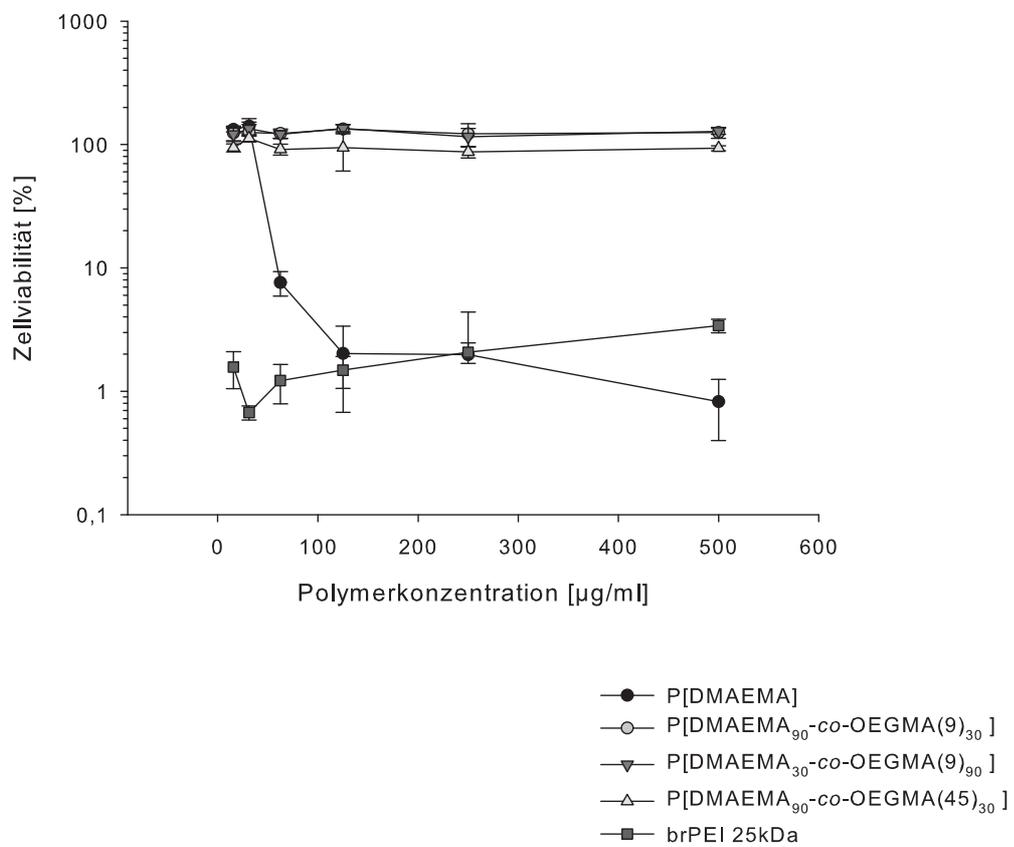


Abbildung 3.6: Einfluss der $P(\text{DMAEMA-co-OEGMA})$ Copolymere auf die metabolische Zellviabilität von BEAS-2B Zellen. Die Bestimmung der ATP-Konzentration erfolgte 24 h nach Inkubation. Die Messdaten wurden auf unbehandelte Zellen normalisiert und sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=4$) angegeben.

nehmenden PEGylierungsgrad sank die Genexpressionsrate allerdings drastisch, wobei bei hohen N/P -Verhältnissen aufgrund der guten Verträglichkeit der Copolymere kein zytotoxischer Effekt analog zu br-PEI oder P(DMAEMA) beobachtet wurde.

Die Ergebnisse der Genexpressionsstudien auf Bronchialepithelzellen konnten auf einer weiteren Zelllinie, einer murinen Alveolarepithelzelllinie (MLE-12), bei einem festen N/P -Verhältnis von 10 reproduziert werden. In Abbildung 3.8 sind beide Zelllinien vergleichend dargestellt. Die beiden Zelllinien unterschieden sich dabei sowohl hinsichtlich ihres Ursprungs (murin *versus* human) als auch der Zellart (alveolar *versus* bronchial). Unabhängig von der verwendeten Zelllinie korrelierte die Genexpressionsrate mit dem PEGylierungsgrad der Copolymere, wobei Copolymere mit einem OEGMA-Anteil $> 16,6\%$ und einer kurzen OEGMA-Seitenkette (9 OEG-Einheiten) zu einer Reduktion der Gentransferrate um den Faktor 50 führten (Abb. 3.8 (a)). Der Einfluss der Seitenkettenlänge war hingegen minimal ausgeprägt (Abb. 3.8 (b)).

3.3.2 Untersuchungen zur Zellbindung, Internalisierung und intrazellulärer Freisetzung der Polyplexe

Die Herausforderungen an eine erfolgreiche Gentherapie mit nicht-viralen Gentransfervehikeln sind groß. Wichtige Formulierungsparameter wie die Partikelgröße, die Oberflächenladung und die Struktur der Polyplexe wurden bereits im Abschnitt 3.2 untersucht. Es zeigte sich, dass die Komplexierung der Plasmid-DNA, das Zeta-Potential der resultierenden nanoskaligen Gentransfervehikel sowie die Gentransfereffizienz stark durch die Einführung des OEG-Anteils variierten, wohingegen der Effekt auf die Zytotoxizität und die Partikelgröße geringer ausgeprägt war. Neben den Anforderungen an die biophysikalischen Eigenschaften der Formulierung spielen die Aufnahme in die Zielzelle und die anschließende intrazelluläre Prozessierung eine entscheidende Rolle für den Erfolg des Gentransfers (Abb. 1.2). Im folgenden Abschnitt sollte daher auf zellulärer Ebene untersucht werden, welche Auswirkungen die PEGylierung auf i) die intrazelluläre Aufnahme der Polyplexe und ii) die Freisetzung aus dem endosomalen/lysosomalen Kompartiment hat und inwiefern dadurch eine Reduktion der Gentransfereffizienz mit steigendem PEGylierungsgrad erklärt werden kann.

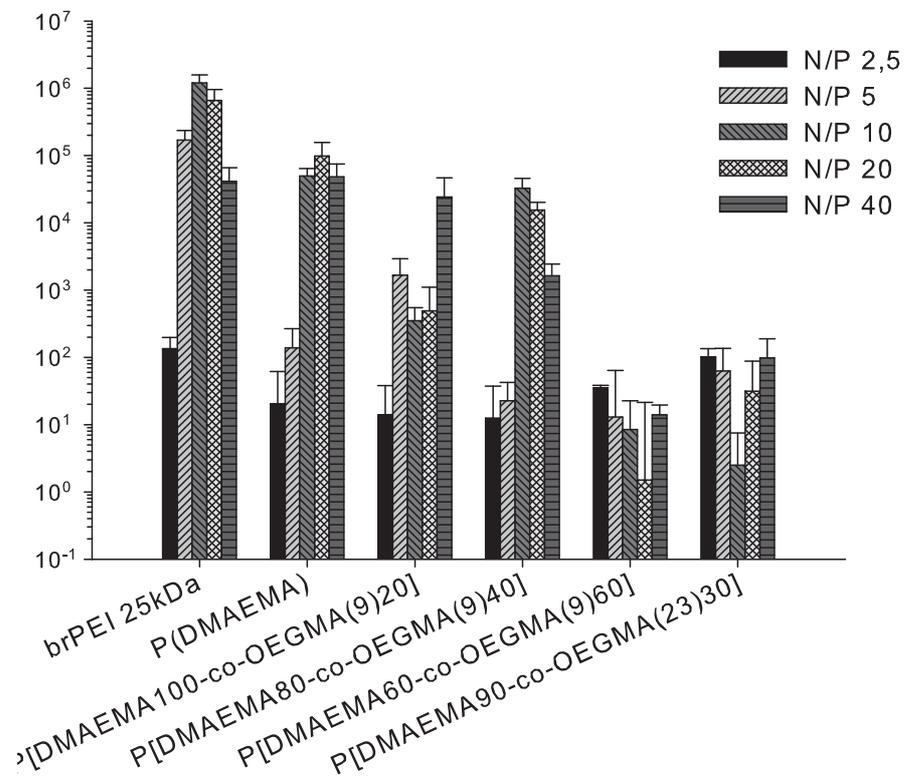
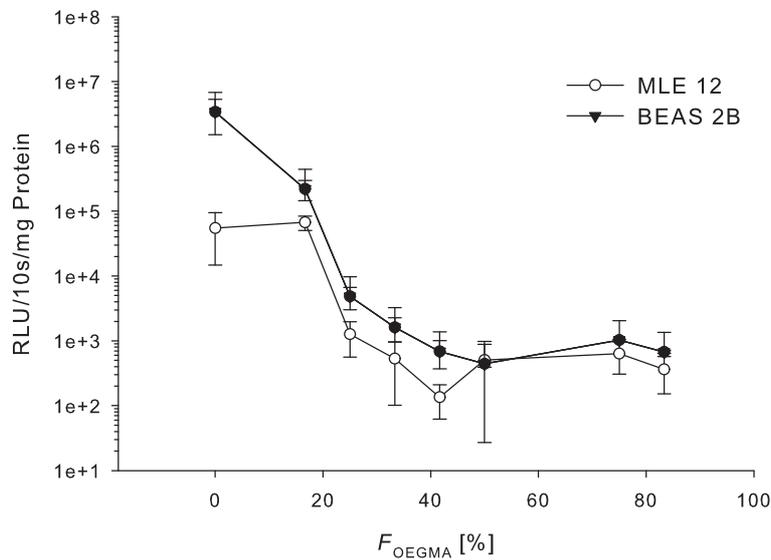
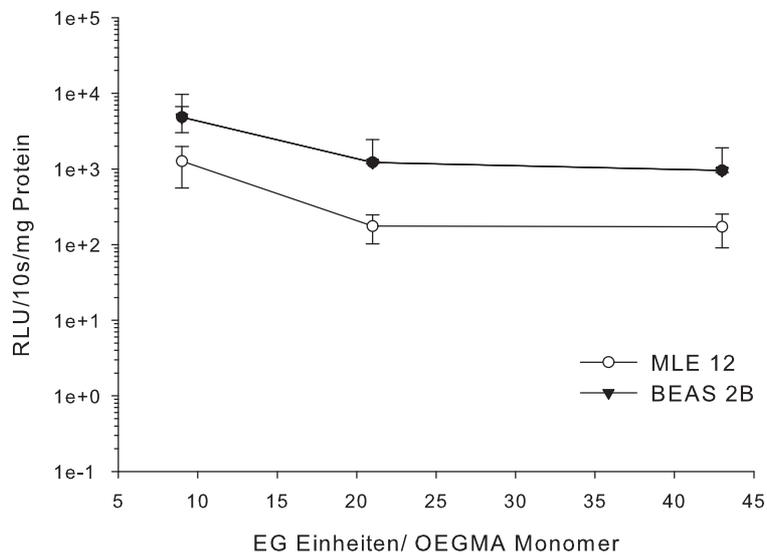


Abbildung 3.7: Transfektionseffizienzen von $P(\text{DMAEMA-co-OEGMA})/\text{pDNA}$ Polyplexen auf Bronchialepithelzellen in Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis. Als Vergleich ist die Genexpression von br-PEI/pDNA und $P(\text{DMAEMA})/\text{pDNA}$ Polyplexen dargestellt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=4$) angegeben.

(a) Einfluss des OEGMA-Gehaltes (F_{OEGMA})

(b) Einfluss des Oligomerisierungsgrades der OEGMA-Seitenkette

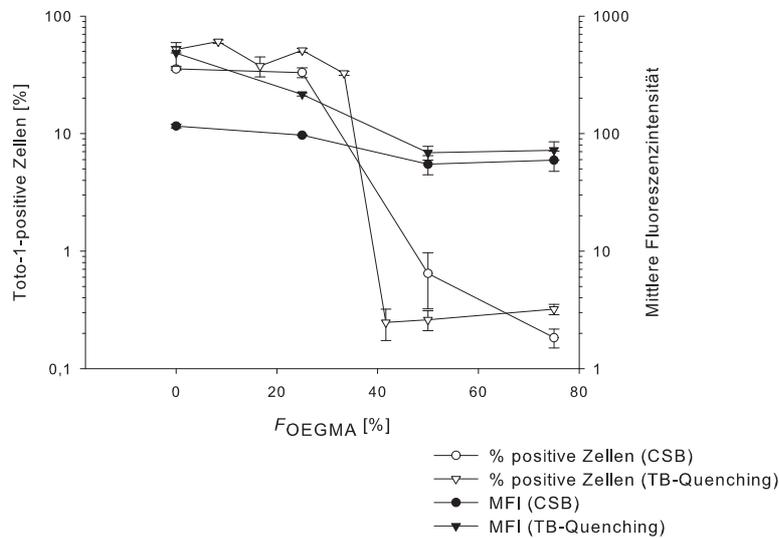
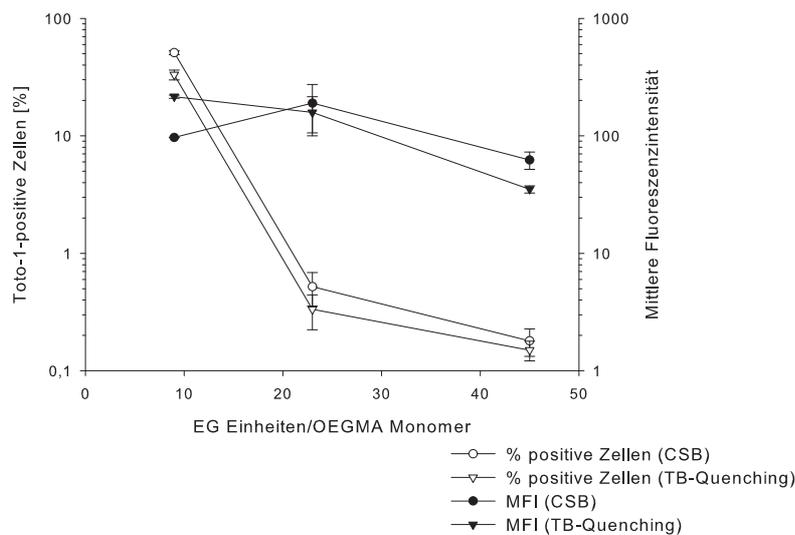
Abbildung 3.8: Einfluss des PEGylierungsgrades auf die Genexpression in humanen Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) und murinen Alveolarepithelzellen (MLE-12). Polyplexe aus $P(DMAEMA)$ oder $P(DMAEMA-co-OEGMA)$ Copolymeren mit $pCMVLuc$ wurden in HBS mit einem N/P -Verhältnis von 10 generiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes angegeben.

Zellbindung und Internalisierung

Frühere Studien hatten bereits gezeigt, dass die PEGylierung von Polymeren einen großen Einfluss auf die Zellbindung und die anschließende intrazelluläre Aufnahme der Partikel hat. Allerdings sind die Ergebnisse recht widersprüchlich, so dass sowohl eine Reduktion der Zellbindung und Internalisierung (Choi et al., 1998; Lemieux et al., 2000) als auch eine Erhöhung der zellulären Aufnahme beobachtet wurde (Petersen et al., 2002b).

Die Zellbindung und die anschließende intrazelluläre Aufnahme der Polyplexe wurden auf Bronchialepithelzellen untersucht. Hierzu wurden diese mit fluoreszenzmarkierten Polymer/pDNA Polyplexen transfiziert, die Fluoreszenz extrazellulär gebundener Partikel mittels Trypanblau ausgelöscht (Trypanblau-Quenching) beziehungsweise extrazellulär gebundene Polyplexe mit Hilfe eines CellScrub™ - Waschpuffers von der Zelloberfläche entfernt und die Anzahl transfizierter Zellen (TOTO-1-positiver Zellen) und deren mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist für beide Methoden in Abbildung 3.9 dargestellt, wobei beide Methoden vergleichbare Werte lieferten.

Auffallend ist, dass die Anzahl transfizierter Zellen ab einem bestimmten PEGylierungsgrad (OEGMA-Anteil $>33\%$ oder OEG-Einheiten >9) um den Faktor 100 abnahm. Dementsprechend zeigten lediglich 1% der Zellen eine Aufnahme von Polyplexen, die aus Copolymeren mit einem OEGMA-Anteil von 42% und einem Oligomerisierungsgrad von 9 EG-Einheiten beziehungsweise 25% OEGMA-Anteil mit 23 EG-Einheiten in der OEGMA-Seitenkette hergestellt wurden. Die MFI der positiven Zellpopulation war hingegen nur marginal reduziert (Faktor 2-3). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Zellbindungen der Polyplexe, nicht aber deren Internalisierung durch die Einführung der OEG-Anteile negativ beeinflusst werden. Sobald die Polyplexe jedoch an die Zelloberfläche gebunden waren, spielte die PEGylierung für die intrazelluläre Aufnahme eine untergeordnete Rolle. Dennoch zeigten P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Copolymere bei einem optimiertem OEG-Anteil ($F_{OEGMA} < 41\%$, EG-Einheiten < 23) Zellbindungen (Trypanblau: $67,1 \pm 3,7$ TOTO-1 positive Zellen, MFI 5374 ± 789), die mit P(DMAEMA) und br-PEI 25 kDa vergleichbar waren. Dennoch wurde im Vorfeld eine um den Faktor 10 geringere Gentransfereffizienz beobachtet (Kapitel 3.3.1), was nahe legt, dass neben der Zellbindung ein weiterer Faktor für die reduzierte Gentransfereffizienz der P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Copolymere gegenüber den nicht pegylierten Polymeren verantwortlich sein muss.

(a) Einfluss des OEGMA-Gehaltes (F_{OEGMA})

(b) Einfluss des Oligomerisierungsgrades der OEGMA-Seitenkette

Abbildung 3.9: Einfluss des PEGylierungsgrades auf die Zellbindung und Internalisierung der Polyplexe in humanen Bronchialepithelzellen (BEAS-2B): (a) in Abhängigkeit vom OEGMA-Gehalt und (b) in Abhängigkeit von der Anzahl der EG-Einheiten in der OEGMA-Seitenkette. Polyplexe bestehend aus $P(\text{DMAEMA})$ oder $P(\text{DMAEMA-co-OEGMA})$ Copolymeren mit TOTO-1 markierter Plasmid-DNA wurden in HBS mit einem N/P -Verhältnis von 20 generiert. Der Anteil internalisierter Polyplexe wurde mittels Trypanblau-Quenching (TB-Quenching) und CellScrub™-Puffer-Methode (CSB) analysiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes ($n=3$) dargestellt.

Untersuchungen zur Freisetzung aus dem endosomalen Kompartiment

Ein weiterer kritischer Punkt des nicht-viralen Gentransfers mittels kationischer Polymere ist die intrazelluläre Freisetzung der Polyplexe aus dem Endosom. Gelingt es nicht, die Partikel rechtzeitig aus dem Endosom freizusetzen, kommt es intrazellulär zur Prozessierung über späte Endosomen hin zu Lysosomen, in denen der Hauptabbau der Partikel erfolgt (Kapitel 1.4.3). Der saure pH-Wert der Lysosomen ist dabei entscheidend für die Aktivität von Enzymen, die für den Abbau von Nukleinsäuren verantwortlich sind (DNasen, RNasen). Eine schnelle Freisetzung der Polyplexe aus den Endosomen ist essentiell, um die Stabilität der Polyplexe und letztendlich der Nukleinsäure zu garantieren.

Eine Möglichkeit besteht darin, über einen abweichenden Aufnahmemechanismus den endosomalen Weg komplett zu umgehen, was letztendlich von der gewählten Arzneiform abhängt (siehe Kapitel 1.4.3). Sollen nanoskalige Transfervehikel eingesetzt werden, kann eine Steigerung der Pufferkapazität der Polymere die Freisetzung der Polyplexe ins Zytoplasma entscheidend verbessern. Frühere Studien hatten verdeutlicht, dass P(DMAEMA) aufgrund der ausschließlich tertiären Aminfunktionen eine geringere Pufferkapazität gegenüber br-PEI 25 kDa aufweist. So ist P(DMAEMA) mit einer guten Pufferkapazität bis pH 6,0/5,5 nicht in der Lage den gesamten pH-Bereich der Endosomen bis pH 5 abzudecken (van de Wetering et al., 1998). Zudem gibt es Hinweise, dass die Freisetzung von P(DMAEMA)/pDNA Polyplexen aus dem Endosom womöglich langsamer und über einen anderen Mechanismus, als es für br-PEI beschrieben wurde, erfolgt. Eine Veränderung der Endosomenmorphologie wird in diesem Zusammenhang diskutiert (Jones et al., 2004).

Die Pufferkapazität der Polymere wurde von Herrn Özgür Akdemir am Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung in Golm untersucht (Daten nicht dargestellt). Im Titrationsversuch konnte jedoch gezeigt werden, dass die Pufferkapazität *per se* bei Verwendung gleicher N/P -Verhältnisse lediglich bei hohem Oligomerisierungsgrad der OEGMA-Seitenketten ($F_{OEGMA} \geq 25$ und 45 EG-Einheiten) beeinträchtigt war. Somit war eine Verschlechterung der endosomalen Freisetzung gegenüber P(DMAEMA) aufgrund der Pufferkapazitäten der Copolymere für P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Copolymere mit niedrigem PEGylierungsgrad nicht zu erwarten. Daraufhin wurde die Freisetzung aus dem endosomalen Kompartiment *in vitro* untersucht. Hierzu wurden Transfektionsstudien in Anwesenheit des Protonen-

pumpenhemmers Bafilomycin beziehungsweise der endosomolytisch aktiven Substanz Chloroquin in humanen Bronchialepithelzellen durchgeführt. Zeigt das getestete Polymer eine gute Freisetzung aus dem endosomalen Kompartiment, ist ein Rückgang der Gentransfereffizienz durch die Anwesenheit von Bafilomycin zu erwarten, wohingegen keine weitere Steigerung der Gentransfereffizienz durch Einsatz von Chloroquin anzunehmen ist. Der gegenteilige Effekt ist für Polymere mit geringer endosomolytischer Aktivität zu erwarten.

Eine Übersicht über die endosomolytischen Studien liefert Abbildung 3.10. Überraschenderweise reagierte das Homopolymer P(DMAEMA) vergleichbar empfindlich auf den Protonenpumpenhemmer wie das Standardpolymer br-PEI. In beiden Fällen sank die Gentransfereffizienz bei Zusatz von Bafilomycin um das 16-fache für P(DMAEMA) und um das 10-fache für br-PEI. Der Zusatz von Chloroquin hingegen führte lediglich zu einem leichten Rückgang der Expressionsraten, das mit großer Wahrscheinlichkeit auf den zytotoxischen Effekt der Substanz selbst zurückgeführt werden kann, so dass von einer zufriedenstellenden Freisetzungskapazität beider Polymere auszugehen ist. Dieses Ergebnis unterstreicht die Notwendigkeit einer funktionsfähigen Protonenpumpe für die Freisetzung der Polyplexe aus dem endosomalen Kompartiment. Im Gegensatz dazu ist der Einfluss des Protonenpumpenhemmers auf die Transfektionseffizienz der Copolymer ($F_{OEGMA} = 16,7\%$, 9 EG-Einheiten) vernachlässigbar. Eine signifikante Steigerung (P-Wert $< 0,01$) der Transfektionseffizienz um das 16-fache gegenüber dem Polymer alleine wurde hingegen durch den Zusatz von Chloroquin beobachtet. In der Folge konnten Transfektionsraten vergleichbar mit br-PEI 25Da gemessen werden.

3.4 Steigerung der Gentransfereffizienz durch Modifikation des Polymerdesigns

Um die in Kapitel 3.3.2 aufgezeigten Defizite der P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Copolymere zu verbessern und folglich die Effizienz des Gentransfers zu steigern, wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt:

- 1.) Steigerung der Pufferkapazität der Copolymere
- 2.) Einführung funktioneller Peptide in den Gentransferkomplex

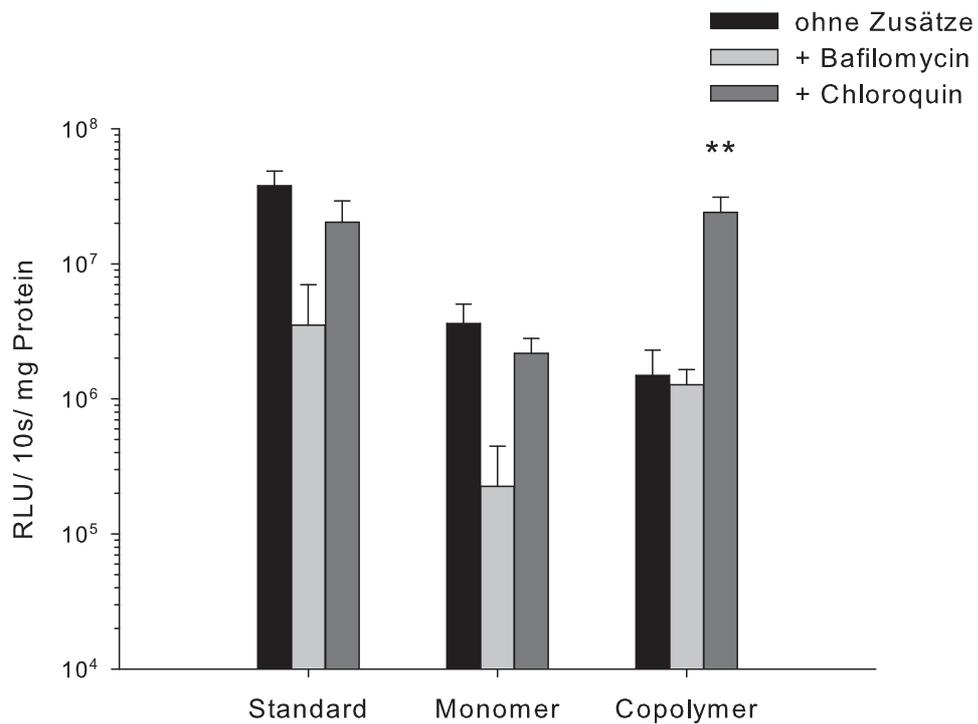


Abbildung 3.10: Endosomolytische Aktivität der *P(DMAEMA-co-OEGMA)* Copolymer. Transfektionsstudien wurden in Anwesenheit des Protonenpumpenhemmers Bafilomycin beziehungsweise der endosomolytisch aktiven Substanz Chloroquin durchgeführt. Br-PEI 25 kDa und *P(DMAEMA)* wurden als Vergleichsstandards eingesetzt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=4$) dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet ($P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**)).

3.4.1 Steigerung der Pufferkapazität der Copolymere

Eine Steigerung der Pufferkapazität der Copolymere wurde durch Veränderung im Polymerdesign erzielt. Hierzu wurde ein Gradientencopolymer hergestellt, das gegenüber dem Standardcopolymer bei gleicher Zusammensetzung einen konzentrierten Bereich an kationischer Ladungsdichte aufweist. In der Tat konnte die Pufferkapazität des Gradientencopolymers gegenüber dem Standardcopolymer um 60 % gesteigert werden (Versuche durchgeführt von Herrn Özgür Akdemir am Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung in Golm). Der Einfluss der Pufferkapazität auf die Gentransfereffizienz wurde in einer signifikanten ($P < 0,05$) 6-fachen Steigerung gegenüber dem Standardcopolymer deutlich (Abb. 3.11).

3.4.2 Einführung funktioneller Peptide in den Gentransfervektor

Neben den Veränderungen im Polymerdesign lässt sich die Gentransfereffizienz durch den Einsatz funktioneller Peptide verbessern (vgl. Tab. 1.3). Prinzipiell kann die Einführung der Peptide in den Gentransferkomplex über eine kovalente Bindung des Peptids an das Polymer oder elektrostatisch durch Bildung ternärer Komplexe erfolgen (Abb. 3.12). Obgleich die kovalente Bindung den Vorteil hat, relativ stabil zu sein, besteht die Gefahr, das Peptid während der Kopplung zu inaktivieren. Ternäre Komplexe lassen sich hingegen ohne großen Aufwand herstellen, wenn das Peptid einen isoelektrischen Punkt im sauren oder basischen Bereich besitzt. Allerdings sind diese Komplexe gegenüber pH-Wert Verschiebungen und Änderungen der Ionenstärke anfälliger.

Einführung eines endosomolytisch aktive Peptids in den Gentransferkomplex

Das Influenza-Peptid 7 (INF7-Peptid) (Plank et al., 1994), ein endosomolytisch aktives Peptid, wurde über elektrostatische Bindung (Abb. 3.13 (a)) und mittels kovalenter Kopplung (Abb. 3.13 (b)) in den Gentransferkomplex eingeführt, um eine Erhöhung der Gentransfereffizienz in humanen Bronchialepithelzellen zu erzielen.

Die elektrostatische Bindung des Peptids an den Gentransferkomplex, auch als ternärer Komplex bezeichnet, führte zu einer signifikanten Steigerung ($P < 0,01$) der Gentransfereffizienz sowohl für das Standardcopolymer, als auch für das Gradientencopolymer (Abb. 3.13 (a)). Während im Falle des

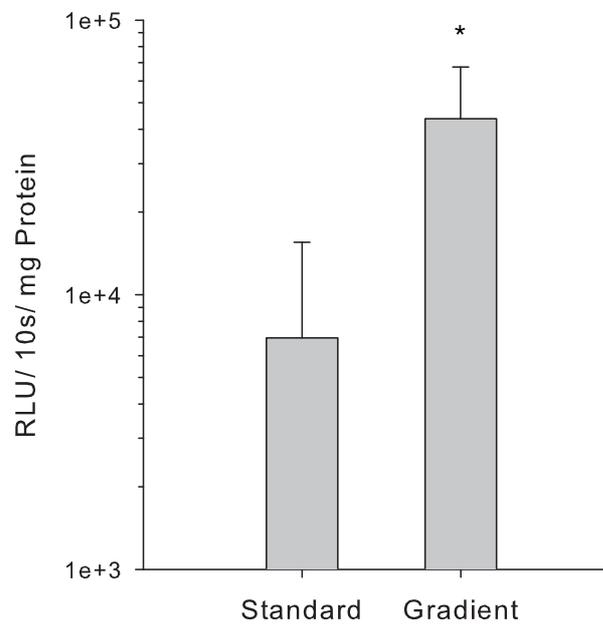


Abbildung 3.11: Steigerung der Gentransfereffizienz durch Erhöhung der Pufferkapazität des Copolymers. Gentransfereffizienz von Standard- und Gradientencopolymer im Vergleich. Polyplexe mit pCMVLuc wurden in HBS mit einem N/P-Verhältnis von 20 hergestellt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=4$) angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet ($P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**)).

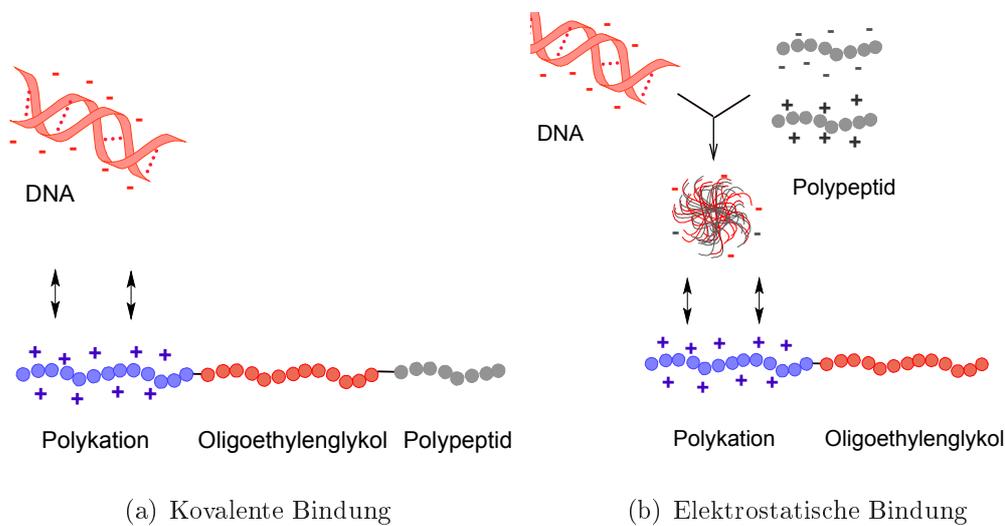
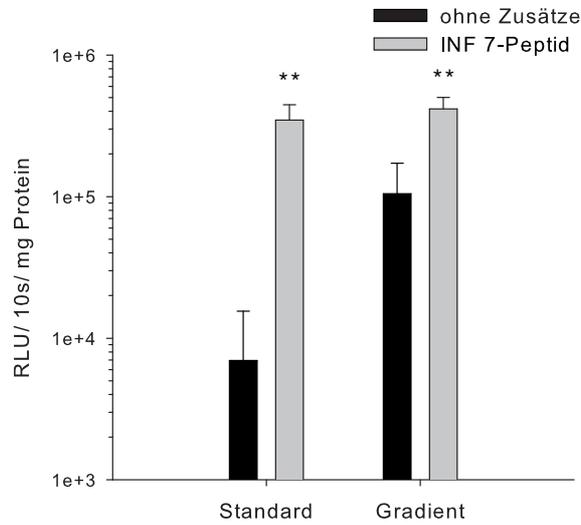


Abbildung 3.12: Einführung funktioneller Peptide in nanoskaligen Trägersystemen basierend auf kationischen Polymeren

Standardcopolymeren eine Steigerung der Gentransferrate um das 50-fache erzielt werden konnte, wurde für das Gradientencopolymer lediglich eine 4-fache Steigerung beobachtet. Allerdings zeigte das Gradientencopolymer *per se* aufgrund der besseren Pufferkapazität eine um den Faktor 6 gesteigerte Gentransfereffizienz gegenüber dem Standardcopolymer, so dass bei einem Vergleich der Absolutwerte, das Gradientencopolymer in Kombination mit dem INF7-Peptid dem Standardcopolymer deutlich überlegen war (1,2-fache Steigerung, $P < 0,01$). Eine Veränderung der Partikelgröße konnten in diesem Zusammenhang nicht beobachtet werden. Beide Polyplexe zeigten eine Partikelgröße von ≈ 100 nm mit einem $PI < 0,3$. Lediglich das Standardcopolymer mit elektrostatisch gekoppeltem INF 7 zeigte mit einem PI von $0,475 \pm 0,057$ eine Tendenz zur Agglomeration.

Das Gradientencopolymer wurde aufgrund der verbesserten Transfektionseffizienz bevorzugt für weitere Kopplungsversuche eingesetzt. Die anschließende kovalente beziehungsweise elektrostatische Kopplung des INF7-Peptids ergab vergleichbare Genexpressionsraten auf Bronchialepithelzellen (Abb. 3.15 (b)). So führte die kovalente Bindung des Peptids in den Polymer/pDNA Polyplex zu einer signifikanten Steigerung ($P < 0,01$) der Genexpression um das 28-fache, wohingegen durch elektrostatische Bindung eine ebenfalls signifikante ($P < 0,01$) 22-fache Steigerung erzielt werden konnte. Die Partikelgröße war bei einem PI von 0,3 vergleichbar (elektrostatisch: 103 ± 1 nm, Kovalent: 124 ± 1 nm).



(a) Ternäre Komplexe im Vergleich

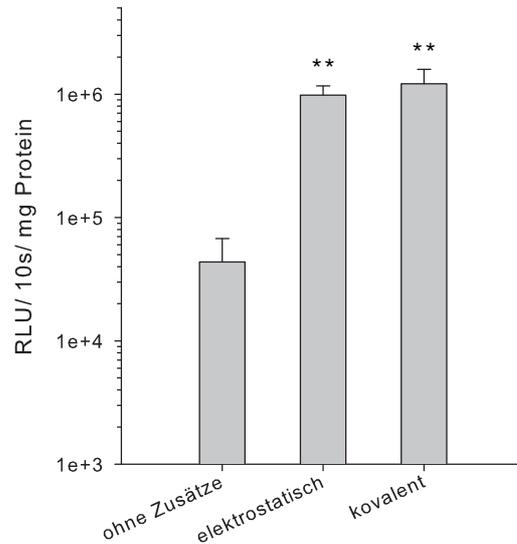
(b) Kovalent *versus* elektrostatisch gebundenem INF7-Peptid

Abbildung 3.13: Steigerung der Gentransfereffizienz durch Einführung eines endosomolytischen Peptids in den Polymer/pDNA Polyplex auf Bronchialepithelzellen BEAS-2B. Die Einführung erfolgte a) elektrostatisch (ternäre Komplexe) oder b) über eine kovalente Kopplung an das Polymer. Die Polyplexe wurden in HBS mit einem N/P-Verhältnis von 20 hergestellt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=4$) angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet ($P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**)).

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt durch unterschiedliche Ansätze gezeigt werden, dass die Freisetzung aus dem Endosom ein stark limitierender Faktor im Gentransfer mittels P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Copolymeren darstellt und eine Verbesserung der endosomalen Freisetzung zum Erfolg des Gentransfervehikels beitragen kann.

Einführung eines zellpenetrierenden Peptids mit Kernlokalisationssequenz

Über die Einführung eines weiteren Peptids sollte die Aufnahme in die Zelle und der Transport in den Zellkern gesteigert werden. Bekanntester Vertreter dieser Klasse ist das TAT-Peptid aus dem HI-Virus, das die intrazelluläre Aufnahme verbessert und gleichzeitig als Kernlokalisationssequenz fungiert (Rudolph et al., 2003). Erste Transfektionsstudien mit elektrostatischer Kopplung von TAT-Dimeren in Kombination mit dem INF7-Peptid wurden auf Bronchialepithelzellen durchgeführt. Eingesetzt wurde für diese Versuche ein Copolymer mit geringen PEGylierungsgrad ($F_{OEGMA} = 8,3\%$, 9 EG-Einheiten), das im Vorfeld bereits sehr gute Ergebnisse gezeigt hatte. Ternäre Komplexe wurden analog Rudolph und Kollegen hergestellt (Rudolph et al., 2003).

Eine signifikante Steigerung der Luziferase-Genexpression um das 100-fache wurde bei Kotransfektion von TAT-Dimer und INF7-Peptid gegenüber dem Copolymer beobachtet (Abb. 3.14), wohingegen beide Peptide einzeln lediglich zu einer 3-fachen Steigerung führten (INF 7 2,7 und TAT 2,8). Die physikochemischen Eigenschaften der Polyplexe unterschieden sich dabei kaum. Abhängig von der Plasmidgröße ergaben sich Partikelgrößen im optimalen Größenbereich (<200 nm) bei enger Partikelgrößenverteilung ($PI \leq 0,25$) und unverändertem Zeta-Potential, wobei Polyplexe basierend auf br-PEI mit 80-90 nm die kleinsten Partikel bei geringfügig höherem Zeta-Potential gegenüber den P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Copolymeren darstellten ($33,4 \pm 1,0$ mV *versus* $22,1 \pm 1,7$ mV).

Betrachtet man nun verschiedene Lungenzelllinien im Vergleich, wie in Abbildung 3.15 gegenübergestellt, so wird deutlich, dass die Kombination beider Peptide unabhängig von der verwendeten Zelllinie (alveolar *versus* bronchial) und Spezies (human *versus* murin) zu einer Steigerung der Gentransfereffizienz führte. Allerdings nahm diese in folgender Reihenfolge analog zum unmodifizierten Copolymer drastisch ab: BEAS-2B (115-fach) \gg

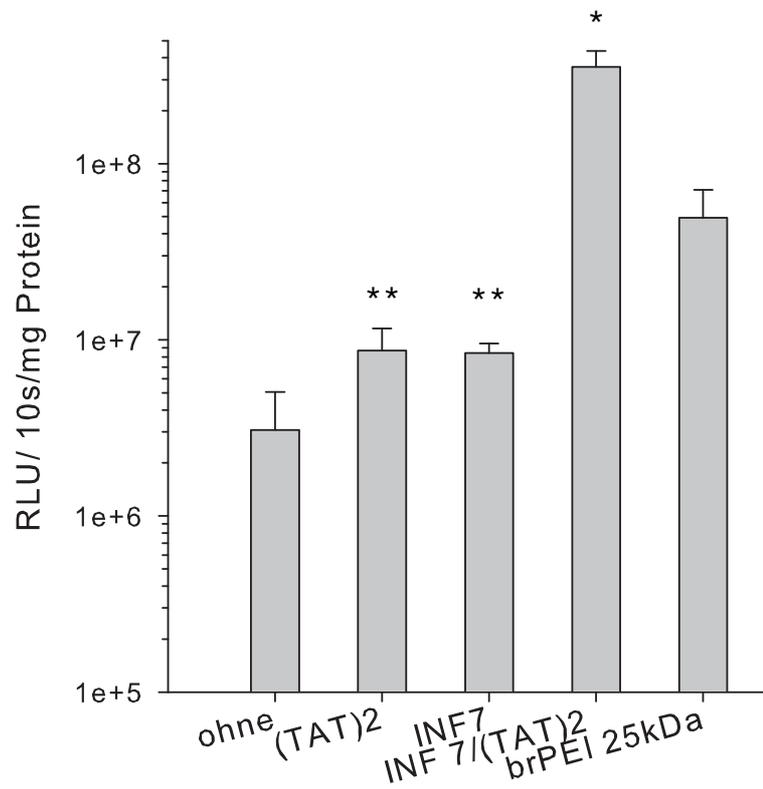


Abbildung 3.14: Einführung funktioneller Peptide in den Gentransferkomplex: Gentransfereffizienz von elektrostatisch gebundenem INF7-Peptid und TAT-Dimer auf humanen Bronchialepithelzellen (BEAS-2B). Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=3$) angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet ($P<0,05$ (*), $P<0,01$ (**)).

MLE-12 (31-fach) > A549 (8-fach). Erklärbar sind diese Ergebnisse durch zellspezifische Unterschiede wie beispielsweise die Dichte an Proteoglykanen. Diese wurden bereits als wichtige Rezeptoren für endozytotische Aufnahmemechanismen, so auch für die Aufnahme von TAT-Peptiden, beschrieben (Tyagi et al., 2001).

Beim Vergleich mit br-PEI fällt auf, dass dem br-PEI vergleichbare Gentransfereffizienzen lediglich auf humanen Bronchialepithelzellen erreicht werden konnten. Ähnliches wurde bereits von Kleemann und Kollegen mit kovalent gekoppelten TAT-PEI-Konjugaten beobachtet (Kleemann et al., 2005). In dieser Studie wurde eine Verbesserung der Gentransfereffizienz lediglich nach intratrachealer Applikation in Bronchialepithelzellen und Alveolarepithelzellen der Maus beobachtet, nicht aber *in vitro* auf humanen Alveolarepithelzellen (A549).

3.5 Plasmid-DNA und mRNA im Vergleich

Die im Vergleich zu viralen Systemen geringe Gentransfereffizienz nicht-viraler Transportvehikel ist einer der größten Nachteile der nicht-viralen Gentherapie. Neben den verwendeten Transportvehikeln trägt die Nukleinsäure entscheidend zum Erfolg des Gentransfers bei. Bei Verwendung von Plasmid-DNA führt die geringe Mobilität dieser im Zytoplasma (Ivics and Izsvák, 2006) sowie der ineffiziente Transport in den Zellkern dazu (Szczepek et al., 2007), dass lediglich 0,01-0,1 % der im Zytoplasma verfügbaren pDNA am Wirkort, dem Zellkern, ankommt (Dauty and Verkman, 2005). Alternativ dazu bietet sich die Verwendung von mRNA an, die als Zwischenstufenprodukt lediglich ins Zytoplasma transportiert werden muss und aufgrund ihres Wirkmechanismus eine geringe Genotoxizität aufweist (Munkonge et al., 2003; Yamamoto et al., 2009).

Der Einsatz von mRNA ist aufgrund der geringen Wirkdauer heutzutage hauptsächlich auf die Anwendung in der Tumorstabilisierung begrenzt. Ferner gibt es bis heute kein effizientes, applizierbares Transfersystem. Momentan stellt die Elektroporation die am häufigsten eingesetzte Technologie dar, die allerdings aufgrund der Toxizität hauptsächlich für die *ex vivo* Anwendung geeignet und *in vivo* nur limitiert einsetzbar ist (Van Driessche et al., 2009). Einige Firmen arbeiten allerdings mittlerweile an einem Injektionssystem für die intramuskuläre und intradermale Applikation von siRNA und shRNA (?). Darüber hinaus gibt es Ansätze mit kationischen Polymeren als Transfersysteme (Bettinger et al., 2001). Im Folgenden sollte die Verwendung

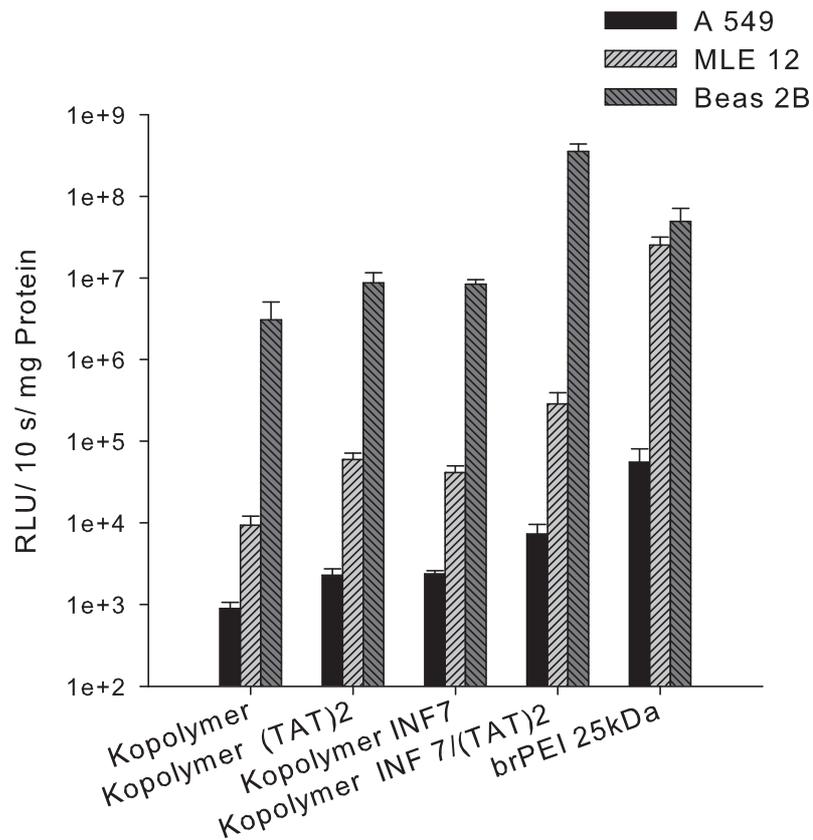


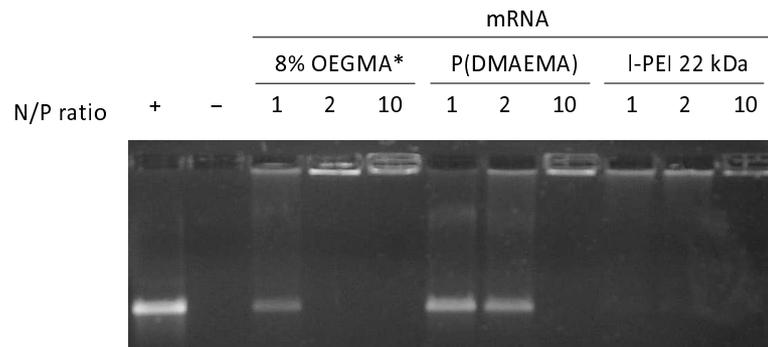
Abbildung 3.15: *In vitro* Gentransfereffizienz von $P(\text{DMAEMA-co-OEGMA})/\text{pDNA}$ Polyplexen mit elektrostatisch gebundenem INF7-Peptid und TAT-Dimer auf unterschiedlichen Zelllinien: humane (BEAS-2B) und murine (MLE12) Bronchialepithelzellen, humane Alveolarepithelzellen (A549). Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=3$) angegeben.

von P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Copolymeren für den Gentransfer von mRNA im direkten Vergleich mit linearem Polyethylenimin untersucht werden. L-PEI wurde bereits erfolgreich für die Transfektion linearer Oligonukleotide wie beispielsweise siRNA verwendet (Read et al., 2005). Ferner galt es, ein optimales Transfersystem zugeschnitten auf die jeweilige Nukleinsäure herauszuarbeiten. Im Fokus der Untersuchungen standen dabei Komplexbildungseigenschaften, Partikelcharakterisierungen wie Partikelgröße und Zeta-Potential sowie *in vitro* Gentransfereffizienzen der mRNA Polyplexe.

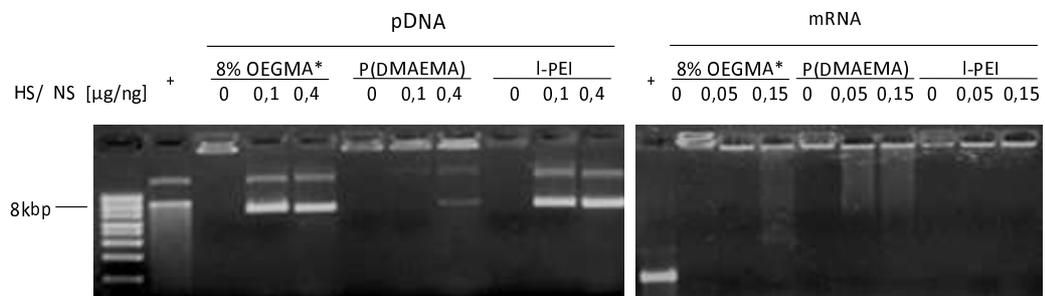
Versuche zur Komplexierung der unterschiedlichen Nukleinsäuren zeigten einen deutlichen Einfluss der Nukleinsäurestruktur auf die Kondensierung zu nanoskaligen Gentransfervehikeln (Abb. 3.16). Die guten Komplexierungseigenschaften von l-PEI für kurzkettige Nukleinsäuren wie mRNA wurden bereits ab einem N/P -Verhältnis von 1 deutlich, wohingegen im Falle von P(DMAEMA) erst ab einem N/P -Verhältnis >2 keine mRNA mehr im Gel zu erkennen war (Abb. 3.16 (a)). Überraschenderweise konnten die Komplexierungseigenschaften der Polymere auf Methacrylat-Basis durch PEGylierung verbesserten werden. Bereits zuvor wurde beobachtet, dass die Einführung von OEG-Einheiten sich nachteilig auf die Komplexierung von pDNA auswirkte (siehe Kapitel 3.2.1). Diskutiert wurde in diesem Zusammenhang eine schlechtere Zugänglichkeit der kationischen Ladung im Polymer durch abschirmende OEG-Einheiten, die mit einer ungünstigen Entropieänderung des Systems verbunden war.

In einem Titrationsversuch mit Heparansulfat (HS) wurden die Bindungsstärken zwischen den unterschiedlichen Polymeren und der verwendeten Nukleinsäure (NS) weiter untersucht (Abb. 3.16 (b)). Heparansulfat verdrängte als negativ geladenes Biopolymer die Nukleinsäure aus dem Polyplex, wobei je nach Stärke der Bindung dazu unterschiedliche Mengen notwendig waren. Analog zu Kapitel 3.2.1 zeigte sich eine starke Komplexbindung zwischen pDNA und P(DMAEMA) Polymer, die auch bei hohen HS/NS-Verhältnissen zu nur sehr geringen Mengen an freier pDNA im Gel führte, wohingegen eine deutlich geringere Bindungsstärke für P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Copolymere und l-PEI beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu nahm die Bindungsstärke im Falle von mRNA in umgekehrter Reihenfolge von l-PEI über P(DMAEMA-*co*-OEGMA) zu P(DMAEMA) hin ab.

Bisherige Studien hatten gezeigt, dass sowohl die Struktur des verwendeten Polymers als auch die Art der Nukleinsäure einen starken Einfluss auf die Bindungsstärke der gebildeten Polyplexe haben. Zu erwarten ist, dass sich diese Einflüsse in der Partikelgröße, dem Zeta-Potential sowie der Partikel-



(a) mRNA-Komplexe



(b) Plasmid-DNA- und mRNA-Komplexe im Vergleich

Abbildung 3.16: Bindungsstärken unterschiedlicher Polymer/mRNA Polyplexe: (a) mRNA-Polyplexe wurden bei unterschiedlichen N/P-Verhältnissen in HBS hergestellt und untersucht. (b) Polyplexe mit einem N/P-Verhältnis von 10 wurden in HBS generiert und mit zunehmendem Heparansulfat (HS)/ Nukleinsäure (NS) Verhältnis elektrophoretisch aufgetrennt. Unkomplexierte Plasmid-DNA (pCMVLuc) und mRNA (EGFPLuc) dienen als Referenz (+), HBS als Negativkontrolle (-).

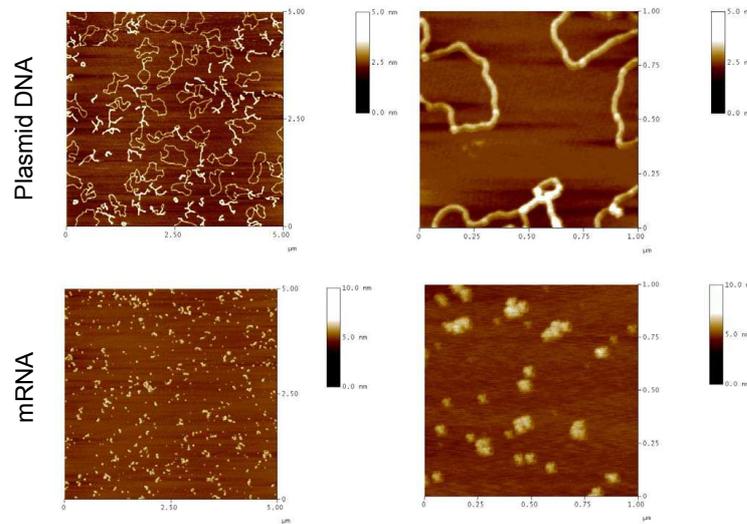


Abbildung 3.17: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen unkomplexierter mRNA und pDNA im Vergleich

morphologie der Polyplexe widerspiegeln. Hierzu wurden rasterkraftmikroskopische Aufnahmen und Zeta-Potentialmessung durchgeführt.

Abbildung 3.17 zeigt die strukturellen Unterschiede von pDNA und mRNA im Vergleich. Wie auf den Bildern zu erkennen, lag „nackte“ Plasmid-DNA zum größten Teil in superhelikaler Form und als offen zirkuläres Makromolekül mit einem Durchmesser von circa $1\ \mu\text{m}$ und einer Höhe von 4-5 nm vor. Da die Plasmid-DNA ein sehr starres Makromolekül darstellt, kann diese gut mittels Rasterkraftmikroskopie dargestellt werden (Hansma, 2001; Severin et al., 2006). Im Gegensatz dazu wiesen mRNA Moleküle eine ausgeprägte Sekundär- und Tertiärstruktur auf und waren im rasterkraftmikroskopischen Bild als sphärische, clusterartige Strukturen mit einem Durchmesser von 5-20 nm und einer Höhe von 6-10 nm erkennbar.

Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen der Polyplexe sind in Abbildung 3.18 dargestellt, die Ergebnisse der Zeta-Potentialmessung sowie der Größenbestimmung aus den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Die Aufnahmen bestätigten die Komplexierung von mRNA beziehungsweise pDNA zu nanoskaligen Partikeln für alle getesteten Polymere. Plasmid-DNA Polyplexe waren als irregulär ellipsoid geformte Partikel unterschiedlicher Größe erkennbar (Abb. 3.18), wobei P(DMAEMA) und P(DMAEMA-co-OEGMA) Polymere Polyplexe vergleichbarer Größe ($107\pm 39\ \text{nm}$ beziehungsweise 107 ± 85) und Höhe ($4\pm 2\ \text{nm}$) formten. L-PEI

hingegen führte zu geringfügig größeren und höheren Partikel (130 ± 72 nm und 7 ± 3 nm). Polyplexe basierend auf mRNA waren unabhängig vom Polymertyp wesentlich kleiner im Vergleich zu Plasmid-DNA Polyplexen und zeigten einen mittleren Durchmesser von ≈ 40 nm mit einer Höhe abhängig vom PEGylierungsgrad (Tab. 3.2). Sowohl das Homopolymer P(DMAEMA) als auch das Copolymer P(DMAEMA-*co*-OEGMA) kondensierten mRNA zu nanoskaligen Partikeln mit kompakter sphärischer Form, wobei im Falle des Homopolymers Agglomeratbildung zu beobachten war. Im Vergleich dazu waren mRNA/l-PEI Polyplexe als ellipsoide bis schlauchförmige Partikel erkennbar, die einzeln oder in Clustern auftraten.

Zeta-Potentialmessungen ergaben für l-PEI und P(DMAEMA) positiv geladene Polymer/pDNA Polyplexe von $+38$ mV und $+32$ mV, wohingegen für die korrespondierenden mRNA Polyplexe eine geringfügig reduzierte Oberflächenladung von $+32$ mV und $+28$ mV gemessen wurden. Eine Abschirmung der Oberflächenladung konnte für das pegylierte Copolymer sowohl für mRNA als auch für pDNA beobachtet werden ($19,0 \pm 1,9$ mV für mRNA und $20,8 \pm 0,8$ mV für pDNA).

Zusammenfassend ergaben die Untersuchungen einen deutlichen Einfluss der verwendeten Nukleinsäure auf die Größe und Höhe der Partikel, wohingegen die Oberflächenladung der gebildeten Polyplexe im Wesentlichen durch das verwendete Polymer bestimmt wurde. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Komplexbindungsstärke und biophysikalischen Eigenschaften der Polyplexe konnte nicht gezeigt werden. Inwiefern sich diese auf die Transfektionseffizienz *in vitro* auswirken, wurde auf humanen Bronchialepithelzellen untersucht (Abb. 3.19).

Betrachtet man zunächst die Transfektionseffizienz der mRNA Polyplexe unterschiedlicher Polymere im Vergleich (Abb. 3.19 (a)), so konnte mit zunehmender Komplexbindungsstärke eine höhere Genexpressionsrate beobachtet werden. Die Genexpression nahm dabei von l-PEI über P(DMAEMA-*co*-OEGMA) zu P(DMAEMA) hin ab. Interessanterweise führte die PEGylierung des P(DMAEMA) Polymers zu einer Erhöhung der Genexpression um das 3-fache bei Verwendung von mRNA als Nukleinsäure, wohingegen im Vorfeld bei Verwendung von pDNA eine Reduktion um das 100-fache beobachtet wurde (siehe Kapitel 3.3.1), die hauptsächlich auf eine unvollständige Freisetzung aus dem Endosomen zurückgeführt werden konnte (siehe Kapitel 3.3.2). Im Vergleich zu l-PEI zeigte P(DMAEMA) eine 8-fache, das pegylierten Copolymer lediglich eine 3-fache Reduktion der Genexpression. Ferner wurde für mRNA/l-PEI Polyplexe eine signifikante ($P < 0,05$) Steigerung

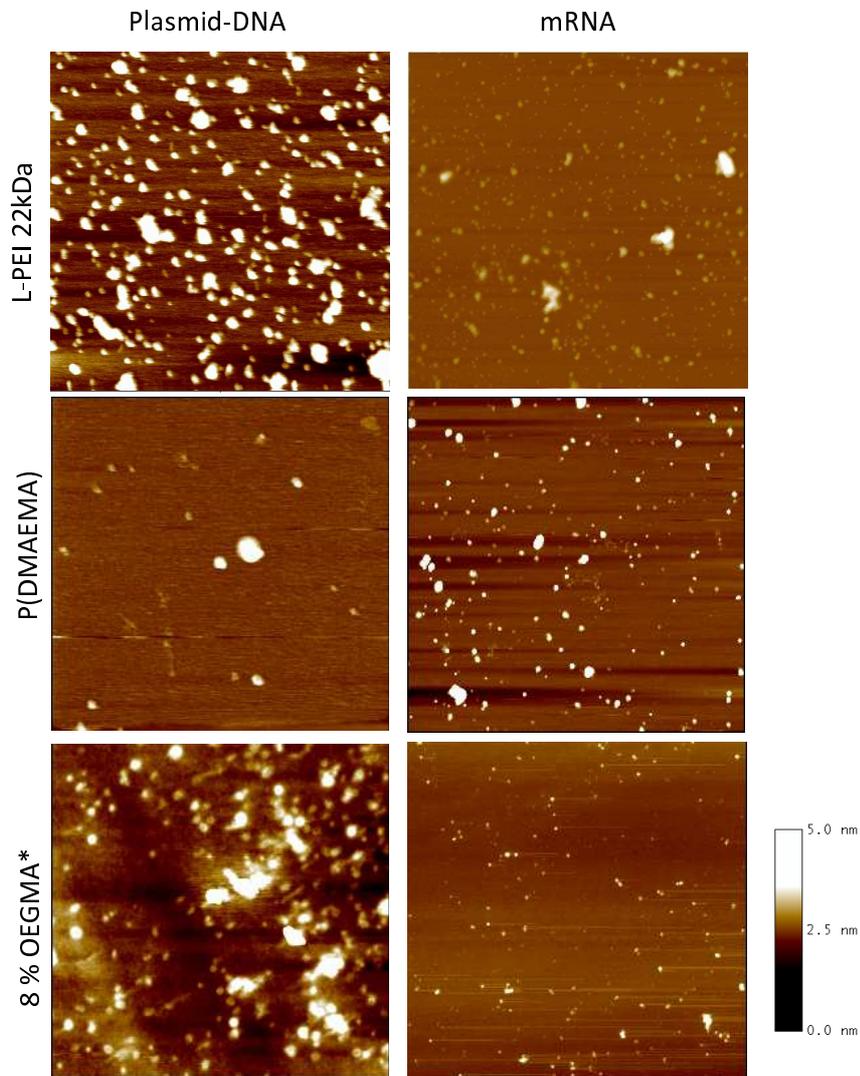


Abbildung 3.18: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von mRNA und pDNA Polyplexen im Vergleich. Plasmid-DNA Polyplexe wurden in HBS, mRNA Polyplexe in Wasser für Injektionszwecke bei einem N/P -Verhältnis von 10 für l-PEI und einem N/P -Verhältnis von 40 für P(DMAEMA) Homopolymer und P(DMAEMA-co-OEGMA) Copolymer hergestellt.

Parameter	l-PEI	P(DMAEMA)	8 % F_{OEGMA}
<i>mRNA</i>			
<i>Zeta-Potential (mV)</i>	31,7±2,2	27,7±0,6	19,0±1,9
<i>Partikelgröße (nm)</i>	39,8±18,8	39,8±20,4	36,7±14,7
<i>Höhe (nm)</i>	3,37±1,64	1,51±0,62	3,82±1,75
<i>Plasmid-DNA</i>			
<i>Zeta-Potential (mV)</i>	37,5±0,3	31,6±0,1	20,8±0,8
<i>Partikelgröße (nm)</i>	129,5±71,7	106,6±38,5	106,6±57,9
<i>Höhe (nm)</i>	7,22±2,90	3,76±2,28	3,76±2,56

Tabelle 3.2: Charakterisierung von mRNA und pDNA Polyplexen im Vergleich. Die Polyplexe wurden bezüglich Größe, Struktur und Oberflächenladung charakterisiert. Dargestellt sind die Zeta-Potentiale (mV) der Polyplexe (N/P -Verhältnis von 20) in HBS als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=3$). Die Größe und Höhe der Partikel wurden aus den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen bestimmt. Plasmid-DNA Polyplexe wurden in HBS, mRNA Polyplexe in Wasser für Injektionszwecke, bei einem N/P -Verhältnis von 10 für l-PEI beziehungsweise einem N/P -Verhältnis von 40 für P(DMAEMA) und P(DMAEMA-co-OEGMA) Copolymere hergestellt.

um das 2,3-fache gegenüber pDNA/1-PEI Polyplexen bei Verwendung der gleichen Anzahl an Genkopien beobachtet, wohingegen für P(DMAEMA-*co*-OEGMA)/mRNA Polyplexe ein Abfall der Expressionsrate auf ein Zehntel gegenüber pDNA Polyplexen detektiert wurde (Abb. 3.19 (b)).

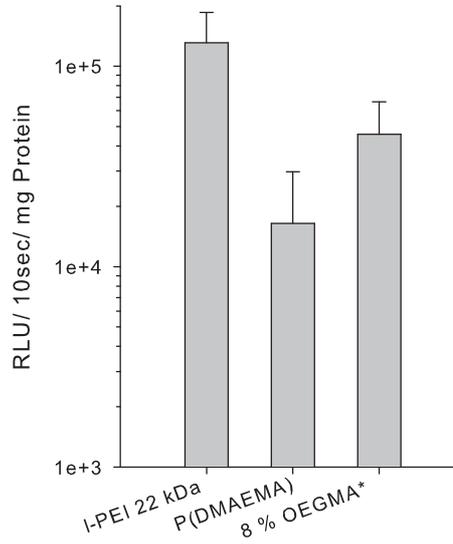
3.6 *In vivo* Applikation

Die *in vivo* Applikation der Copolymere erfolgte lokal in die Lunge mittels MicroSprayer[®] Aerosolizer über die intratracheale Route. Bereits im Vorfeld konnte gezeigt werden, dass der MicroSprayer[®] Aerosolizer eine einfache, gut verträgliche Methode zur Applikation nanoskaliger Partikel in die Lunge darstellt (Bivas-Benita et al., 2005). Hierzu wurden zwei Gruppen (n=5) an weiblichen Balb/c Mäusen mit P(DMAEMA-*co*-OEGMA)/pDNA ($F_{OEGMA} = 33,3\%$, 9 EG-Einheiten) beziehungsweise br-PEI/pDNA Polyplexen behandelt. Eine Partikelgrößenmessung erfolgte vor Applikation und ergab einen hydrodynamischen Durchmesser von 202 ± 2 nm für br-PEI, wohingegen die P(DMAEMA-*co*-OEGMA)/pDNA Polyplexe mit 106 ± 2 nm eine ideale Größe für den intrazellulären Transfer aufwiesen.

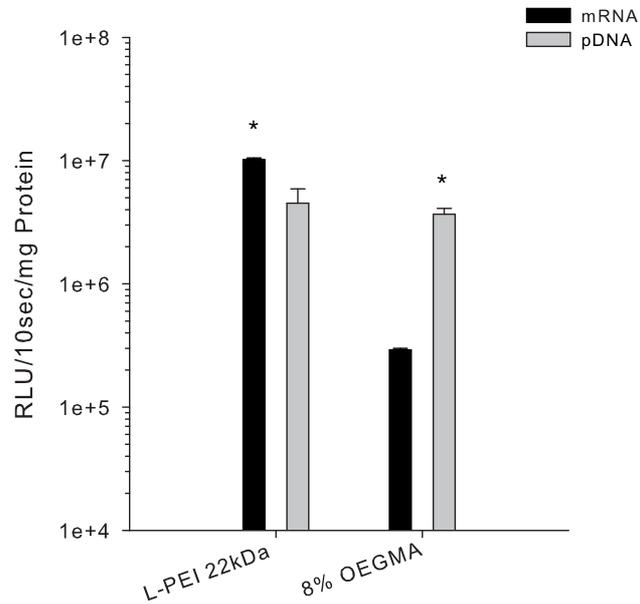
Die Genexpression wurde 24 h nach der Applikation mittels nicht-invasiver Biolumineszenzmessung analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.20 zusammengefasst. In der Tat konnte 24 h nach der Applikation eine 6-fach höhere Genexpression mittels P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Copolymer im Vergleich zum Goldstandard br-PEI gemessen werden (Abb. 3.20). Erklärbar ist die erhöhte Genexpressionsrate in der Lunge nach Applikation des pegylierten Polymers durch eine gute kolloidale Stabilität bei hohen pDNA-Konzentrationen in physiologisch verträglichem Medium, wie sie für *in vivo* Anwendungen benötigt werden. Da die *in vitro* Untersuchungen in Abwesenheit von Serum und mit geringeren pDNA-Konzentrationen durchgeführt wurden, wurde der Einfluss der PEGylierung auf die kolloidale Stabilität erst in der *in vivo* Applikation deutlich, so dass geringere PEGylierungsgrade, die *in vitro* erfolgreich eingesetzt wurden, aufgrund starker Agglomeration keine Genexpression zeigten (nicht dargestellt).

3.7 Diskussion

In diesem Abschnitt der Arbeit wurden maßgeschneiderte chimäre Polymer-Peptid Konjugate als Gentransfervehikel für den nicht-viralen Gentransfer entwickelt. Hierzu wurde eine Serie von Methacrylat-Copolymeren mit va-

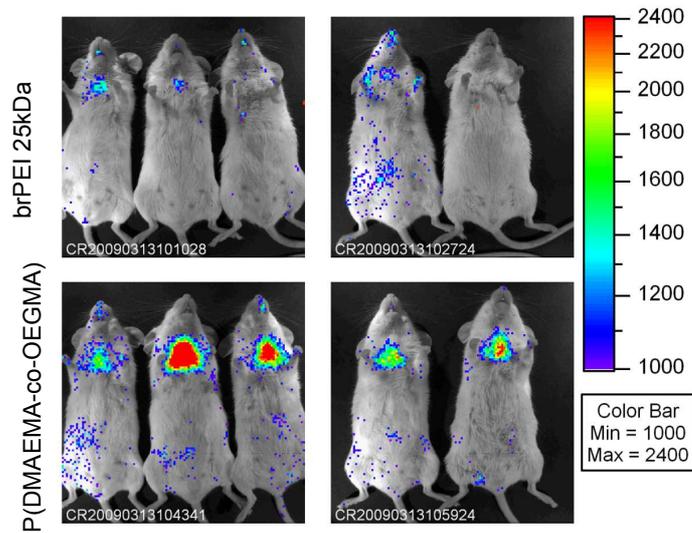


(a) mRNA Polyplexe im Vergleich

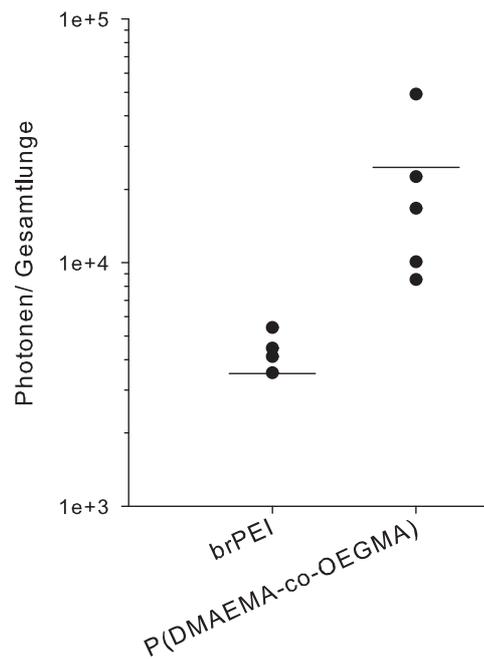


(b) pDNA und mRNA Polyplexe im Vergleich

Abbildung 3.19: Transfektionseffizienz von pDNA oder mRNA Polyplexen auf humanen Bronchialepithelzellen im Vergleich. Polyplexe wurden mit einem N/P-Verhältnis von 10 für l-PEI und von 40 für P(DMAEMA) und P(DMAEMA-co-OEGMA) in HBS generiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=3$) dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet ($P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**)).



(a) Biolumineszenz Imaging



(b) Quantitative Auswertung

Abbildung 3.20: Intratracheale Applikation von P(DMAEMA-co-OEGMA)/pDNA Polyplexen mittels MicroSprayer[®] Aerosolizer. Zum Vergleich wurden brPEI/pDNA Polyplexe untersucht. 24 h nach der Applikation der Polyplexe wurde die Gentransfereffizienz über die Lumineszenz nach Luziferin-Gabe über einen Zeitraum von 10 min bestimmt. (a) Biolumineszenz-Bilder wurden mittels IVIS[®] Imaging System aufgenommen und (b) mittels Living[®] Image Software vermessen.

riablen PEGylierungsgrad mittels ATRP synthetisiert und als Gentransfervehikel charakterisiert. Der PEGylierungsgrad konnte i) durch den OEGMA-Anteil im Copolymer (F_{OEGMA}) und ii) den Oligomerisierungsgrad im OEGMA-Monomer (EG-Einheiten) variiert und an die Anforderungen der verwendeten Nukleinsäure und des Wirkortes angepasst werden.

Bindungsstudien ergaben, dass mit steigender PEGylierung der P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Copolymere die Bindungsaffinität zur Plasmid-DNA stark reduziert wurde. Bereits in früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Polymere mit hohem PEGylierungsgrad (>22 %) nicht mehr in der Lage sind, Plasmid-DNA effizient zu kondensieren (Verbaan et al., 2004). Erklärt werden kann diese Beobachtung durch eine abnehmende Dichte des kationischen Strukturanteils im Copolymer ($F_{P(DMAEMA)}$) sowie durch eine Abschirmung der positiv geladenen Amingruppen durch OEG-Struktureinheiten (sterische Hinderung). Folglich ist die Wechselwirkung mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Plasmid-DNA erschwert. Interessanterweise begünstigte die Einführung von OEG-Einheiten die Bildung monodisperser Nanopartikel basierend auf mRNA. Allerdings ist davon auszugehen, dass nicht die elektrostatische Bindung *per se*, sondern vielmehr die Stabilität der Polyplexe in physiologisch relevantem Medium verbessert wurde.

Die spontane Komplexierung von Nukleinsäuren durch kationische Polymere beruht auf einem komplexen Zusammenspiel elektrostatischer, hydrophiler (Wasserstoffbrückenbindungen) sowie hydrophober Wechselwirkungen, die je nach Struktur der Nukleinsäure unterschiedlich ausgeprägt sein können. In der Folge kommt es zu unterschiedlichem Komplexierungsverhalten strukturell verschiedener Polymere mit verschiedenen Nukleinsäuretypen (Kurisawa et al., 2000; van de Wetering et al., 1998). Während Plasmid-DNA in den Studien vorwiegend als superhelikales und offen zirkuläres Makromolekül vorlag, wies mRNA in den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen eine ausgeprägte Sekundär- und Tertiärstruktur vergleichbar mit Aufnahmen von Chernov und Kollegen auf (Chernov et al., 2008). Strukturelle Unterschiede zwischen den Nukleinsäuretypen konnten auch nach Komplexierung beobachtet werden. Obwohl für beide Nukleinsäuretypen die Bildung nanoskaliger Partikel bestätigt werden konnte, wurden Unterschiede in Partikelgröße und Morphologie der Polyplexe deutlich. Plasmid-DNA Polyplexe basierend auf P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Copolymeren zeigten eine irregulär ellipsoide Form mit einem variablen Durchmesser von 100-200 nm, wohingegen jene Polymere mRNA zu nanoskaligen Partikeln mit kompakter sphärischer Form und einem Durchmesser von lediglich 40 nm komplexierten.

Untersuchungen zum Einfluss des PEGylierungsgrades auf die Partikelgröße von P(DMAEMA-*co*-OEGMA)/pDNA Polyplexen bestätigten Partikeldurchmesser von ungefähr 100 nm, was verglichen mit dem Homopolymer P(DMAEMA) eine deutliche Reduktion der Partikelgröße bedeutete. Allerdings kam es mit zunehmenden Oligomerisierungsgrad im OEGMA-Monomer zu einem erneuten Anstieg der Partikelgröße auf 200 nm. Erklären lässt sich diese Beobachtung durch schwächere Komplexierungseigenschaften mit steigendem OEG-Anteil im Copolymer und einem dadurch bedingten Verlust der kompakten sphärischen Form der Polyplexe. So lassen Zeta-Potentialmessungen bei niedrigen PEGylierungsgraden eine „Core-Shell-Corona“-ähnliche Partikelstruktur vermuten, die aus einem Kern aus pDNA und dem kationischen Polymeranteil P(DMAEMA) umhüllt von einer EG-Schale zusammengesetzt ist. Eine Abschirmung der Oberflächenladung durch PEGylierung konnte sowohl für pDNA als auch für mRNA Polyplexe beobachtet werden, wobei das Zeta-Potential im Wesentlichen durch das verwendete Polymer und dessen PEGylierungsgrad bestimmt wurde. Stieg die Anzahl der EG-Einheiten in der Seitenkette weiter, so führte die sterische Abschirmung zu einem Verlust der kompakten Form der Komplexe, so dass negativ geladene Phosphatgruppen der pDNA auf der Oberfläche der Partikel zugänglich wurden. Ferner kann die Zunahme der Partikelgröße durch die Hydrathülle der Polyplexe erklärt werden, wobei theoretisch 2 bis 3 Wassermoleküle pro EG-Einheit binden können und das Volumen der Partikel bei höheren PEGylierungsgraden dadurch um das 5 bis 10-fache erhöht erscheinen lassen.

Bildlich verdeutlichten elektronenmikroskopische Aufnahmen den Einfluss der PEGylierung auf die Morphologie der Polyplexe. Im Einklang mit den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen bildeten Copolymere auf Methacrylat-Basis mit geringem PEGylierungsgrad mit pDNA irregulär ellipsoid geformte Partikel kompakter Struktur mit einem geringen Überschuss unkomplexierter Nukleinsäure. Höhere PEGylierungsgrade führten jedoch über schlauchförmige Partikel zu unförmigen Strukturen, die eine unzureichende Kondensierung der pDNA vermuten lassen und eine Erklärung für eine negative Oberflächenladungen der Polyplexe liefern. Analog dazu nahm die Dicke der pDNA Fasern ebenfalls zu. Bereits im Vorfeld wurden für PEI/pDNA Polyplexe neben sphärischen auch schlauchförmige (toroidale) oder stabförmige Strukturen beschrieben (Vijayanathan et al., 2002).

Native Kryopräparate (Cryo-TEM) ermöglichen die Aufklärung der Ultrastruktur und Morphologie sensibler Proben mit hohem hydrophilen An-

teil, wobei dieser durch den speziellen Einfrierprozess erhalten bleibt (Echlin, 2001). DNA-Schichten weisen eine wesentlich höhere Material- und Elektrodendichte auf als andere hydrophile Materialien und erscheinen somit im elektronenmikroskopischen Bild dunkler, wodurch eine Abgrenzung zur PEG-Hülle möglich sein sollte. Eine „Core-Shell-Corona“-ähnliche Partikelstruktur war aufgrund des Kontrastes zum verwendeten Medium allerdings nur schwer zu erkennen (Kataoka et al., 2001).

Durch die Variabilität im OEG-Anteil war eine maßgeschneiderte Einstellung der Partikelcharakteristika auf die vorgegebenen Anforderungen des Transfersystems möglich. Darüber hinaus konnte eine ausreichende Stabilität der Polyplexe im wässrigen System unter physiologisch relevanten Bedingungen (pH-Wert, Salzkonzentration) gezeigt werden, ein entscheidender Parameter im Hinblick auf eine spätere *in vivo* Anwendung. Im Gegensatz zu den unpegylierten Homopolymeren br-PEI und P(DMAEMA) wiesen P(DMAEMA-*co*-OEGMA)/pDNA Polyplexe eine gute kolloidale Stabilität in physiologischem Puffer unabhängig vom EG-Gehalt auf. Selbst bei extrem hohen pDNA-Konzentrationen von 1 mg/ml konnten bei ausreichender PEGylierung stabile Komplexe generiert werden. Zuvor war dies lediglich durch Erniedrigung des pH-Wertes oder durch Verwendung von Schutzkolloiden möglich (Cherng et al., 1999a; Rungsardthong et al., 2003). Ähnliches galt für die potentielle Zytotoxizität der getesteten Polymere. Im Vergleich zu br-PEI und P(DMAEMA) konnte selbst bei hohen Polymerkonzentrationen (bis 500 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und niedrigem PEGylierungsgrad kein zytotoxischer Effekt der Copolymere festgestellt werden. Zurückzuführen sind beide Effekte auf eine sterische Stabilisierung und Abschirmung der positiven Ladungsdichte der Polymere durch die Einführung ungeladener hydrophiler OEGMA-Segmente (Merdan et al., 2002a). Ferner können überschüssige kationische Strukturelemente, die nicht für die Bindung der pDNA benötigt wurden, durch elektrostatische Abstoßung zur Stabilisierung des Systems beitragen (Jones et al., 2004; Rungsardthong et al., 2003).

In vitro Untersuchungen zur Gentransfereffizienz zeigten eine deutliche Reduktion der Genexpression für P(DMAEMA-*co*-OEGMA)/pDNA Polyplexe mit zunehmendem PEGylierungsgrad ($F_{DMAEMA} > 25\%$, EG-Einheiten > 9) unabhängig von der verwendeten Zelllinie. Weiterhin wurde beobachtet, dass im Einklang mit den Bindungsstudien hohe *N/P*-Verhältnisse nötig waren (≥ 20), um zufriedenstellende Gentransferraten zu erreichen. Unter Verwendung von Copolymeren mit geringem EG-Anteil ($F_{OEGMA} < 33,3\%$ und 9 EG-Einheiten) konnten dennoch Transfektionsraten vergleichbar mit dem unmodifizierten Homopolymer P(DMAEMA) und um den Fak-

tor 10 geringer als im Falle von br-PEI erzielt werden. Eine absolute Steigerung der Genexpression durch die Verwendung von mRNA bei gleicher Anzahl an Genkopien konnte 24 h nach der Applikation nicht erzielt werden. Allerdings ist davon auszugehen, dass die Genexpression mittels mRNA wesentlich schneller an- und abflutet als es für pDNA der Fall ist (Rudolph et al., 2003; Zou et al., 2010). Nichtsdestotrotz begünstigte die Einführung von OEG-Einheiten die Komplexierung von mRNA zu nanoskaligen Partikeln und führte in der Folge zu einer gesteigerten Genexpression (2,8-fach) verglichen mit dem Homopolymer.

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass abfallende Gentransferraten durch Erhöhung des PEGylierungsgrades die Folge i) einer unvollständigen Komplexierung der Plasmid-DNA verbunden mit einem Verlust der kompakten sphärischen Form, ii) einer reduzierten Zellbindung und iii) einer unzureichenden endosomalen Freisetzung waren. Ersteres kann extrazellulär zur Dissoziation der Plasmid-DNA aus den Polyplexen führen. Eine reduzierte Aufnahme in die Zelle und ein gesteigerter extrazellulärer Abbau sind die Folge. Da die Bindung nicht-viraler Gentransfervehikel im Wesentlichen über Wechselwirkungen mit negativ geladenen Glykoproteinen an der Zelloberfläche erfolgt und leicht positiv geladene Partikel die Anlagerung begünstigen (Tang et al., 2003; Verbaan et al., 2004; Zuidam et al., 2000), lässt die Abschirmung der positiven Oberflächenladung eine reduzierte Zellbindung gegenüber dem unpegylierten Homopolymer vermuten. In früheren Studien wurde bereits über den Einfluss des PEGylierungsgrades auf Zellbindung und Internalisierung berichtet. Je nach Polymerstruktur wurde eine Reduktion beider Parameter beziehungsweise eine Reduktion der Zellbindung, aber eine Erhöhung der zellulären Aufnahme beobachtet (Choi et al., 1998; Lemieux et al., 2000; Petersen et al., 2002a). Für die P(DMAEMA-*co*-OEGMA)-Serie konnte eine Reduktion der zellulären Bindung lediglich bei höherem OEGMA-Anteil oder steigender Oligomerisierung in der OEGMA-Seitenkette beobachtet werden, während der Einfluss auf die Internalisierung bereits gebundener Polyplexe für alle PEGylierungsgrade vernachlässigbar klein ausfiel. Die Komplexierungseigenschaften der Copolymere sowie die anschließende intrazelluläre Aufnahme der pDNA Polyplexe konnten durch eine Anpassung des PEGylierungsgrades derartig optimiert werden, so dass P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Polyplexe mit einem optimiertem EG-Anteil ($F_{OEGMA} < 41\%$, EG-Einheiten < 23) eine kompakte nanoskalige Struktur und eine dem br-PEI vergleichbare Zellbindungs- und Internalisierungsrate aufwiesen. Dennoch wurde eine Reduktion der Gentransfereffizienz um den Faktor 10 gegenüber br-PEI gemessen.

Nach endozytotischer Aufnahme der Polyplexe in die Zelle trägt eine schnelle Freisetzung aus dem Endosom ins Zytoplasma entscheidend zu einem erfolgreichen Gentransfer bei. So kann die hohe Gentransferrate von Polyplexen basierend auf br-PEI unter anderem durch eine effiziente Freisetzung aus dem Endosom erklärt werden. Br-PEI fungiert dabei durch seine gute Pufferkapazität im pH-Bereich von 5,0-7,4 als eine Art Protonenschwamm, was letztendlich zum Platzen des Endosoms führt (siehe Kapitel 1.4.3). Im Gegensatz dazu besteht das Homopolymer P(DMAEMA) lediglich aus tertiären Aminen, die zu einer geringeren Pufferkapazität in einem engeren pH-Bereich von pH 5,5-7,4 führen, als es für br-PEI der Fall ist (Rungsardthong et al., 2001; van de Wetering et al., 1997). Zusätzlich werden weitere Freisetzungsmechanismen für P(DMAEMA) wie eine Veränderung der Endosomenmorphologie und die Bildung Nuklease-resistenter Komplexe diskutiert (Jones et al., 2004). Die Pufferkapazität der P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Copolymeren war gegenüber P(DMAEMA) lediglich bei hohem Oligomerisierungsgrad beeinträchtigt. *In vitro* Studien zeigten ferner, dass eine funktionelle Protonenpumpe essentiell für die Freisetzung von br-PEI und P(DMAEMA) Polyplexen aus dem Endosom war, wohingegen die Freisetzung von P(DMAEMA-*co*-OEGMA)/pDNA Polyplexen aus dem Endosom unvollständig und unter Umgehung der Protonenpumpe verlief, so dass die Anwesenheit eines Protonenpumpeninhibitors keinen Einfluss auf die Transfektionseffizienz hatte. Im Gegensatz dazu steigerte der Einsatz von Chloroquin, einer endosomolytisch aktiven Substanz, die Transfektionseffizienz um das 16-fache. Auch die Veränderung im Polymerdesign durch Verwendung eines Gradientencopolymers, das gegenüber dem Standardcopolymer bei gleicher Zusammensetzung einen konzentrierten Bereich an kationischer Ladungsdichte und in der Folge eine erhöhte Pufferkapazität aufwies, führte zu einer 6-fachen Erhöhung der Gentransfereffizienz. Allerdings wird im Vergleich zum Einsatz von Chloroquin deutlich, dass eine Erhöhung der Pufferkapazität nicht alleine zu einer guten Gentransfereffizienz beiträgt (Dubruel et al., 2000).

Alternativ zu den Veränderungen im Polymerdesign lässt sich die Gentransfereffizienz über den Einsatz funktioneller Peptide (siehe 1.3) steigern. Abgeleitet von viralen Systemen wurde der Einsatz der Hämagglutinin-Untereinheit HA des Influenzavirus, kurz Influenzapeptid (INF-Peptid), in Kombination mit kationischen Peptiden beschrieben (Plank et al., 1994; Wagner et al., 1992). Die Sekundärstruktur des INF-Peptids ist pH-sensitiv, so dass es bei einem pH-Abfall zur Ausbildung einer α -Helix kommt, die eine Einlagerung in die Endosomenmembran ermöglicht. Die Membran verliert dadurch ihre Integrität und wird durchlässig. Untersucht wurde der Einsatz einer Variante des Influenzapeptids, das INF7-Peptid (Plank et al., 1994),

i) nach kovalenter Kopplung an das P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Copolymer und ii) elektrostatischer Bindung in den Polyplex (tertiärer Komplex). Interessanterweise führten beide Ansätze zu vergleichbaren Genexpressionsraten bei unveränderten Partikelgrößen. Ferner konnte gezeigt werden, dass in Kombination mit dem Gradientencopolymer additive Effekte erzielt werden könnten, so dass die Freisetzung aus dem Endosom als kritischer Schritt im Gentransfer mittels P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Copolymeren angesehen werden kann. Zusammenfassend war die erzielte Effizienzsteigerung im Falle der P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Copolymere weitaus stärker ausgeprägt, als aufgrund der ähnlichen Pufferkapazität im Vergleich zu P(DMAEMA) vermutet wurde. So führte die kovalente Bindung des INF7-Peptids an P(DMAEMA) lediglich zu einer 1,5-fachen Steigerung der Genexpression (Funhoff et al., 2005), wohingegen für die tertiären Komplexe eine 4-fache Steigerung beschrieben wurde (Zuidam et al., 2000). Je nach Menge an eingesetztem Peptid konnte mit einem optimierten P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Copolymer in Kombination mit dem INF7-Peptid eine Steigerung um den Faktor 20 und mehr durch elektrostatische Kopplung erreicht werden.

Eine weitere Effizienzsteigerung um den Faktor 100 gegenüber dem unmodifizierten Copolymer konnte durch Kotransfektion des INF7-Peptids mit dem TAT-Peptid erreicht werden. Das TAT-Peptid stammt aus dem HI-Virus und besitzt neben einer zellpenetrierenden Funktion eine Kernlokalisierungssequenz, um den Transport der pDNA in den Zellkern zu steigern. Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus des TAT-Peptids hatten gezeigt, dass die Aufnahme des Peptids durch eine Überlagerung endozytotischer Prozesse erfolgt (siehe 1.4.4). Da das verwendete Copolymer allerdings eine geringe endosomolytische Freisetzungsrates aufwies, kam der TAT-Effekt erst bei Kotransfektion mit dem endosomolytisch aktiven INF7-Peptid zum tragen. Ähnliches wurde bei Verwendung eines Fusionsproteins bestehend aus einer TAT- und einer INF-Domäne beobachtet (Wadia et al., 2004). Die Effizienzsteigerung ist dabei vergleichbar mit Studien, in denen endosomolytisch aktive Polymere wie das br-PEI verwendet wurden (Rudolph et al., 2003, 2004).

Die intratracheale Applikation der P(DMAEMA-*co*-OEGMA)/pDNA Polyplexe zeigte eine im Vergleich zu br-PEI 10-fach gesteigerte Expressionsrate in der Lunge. Entscheidend für die verbesserte Transfektionsrate war in diesem Zusammenhang die kolloidale Stabilität der Polyplexe in physiologisch relevantem Medium. Anders als in den *in vitro* Versuchen zuvor waren jedoch höhere PEGylierungsgrade nötig, um die Partikel für die *in vivo* Applikation zu stabilisieren und einen effizienten Gentransfer zu erzielen. Bereits in

früheren Studien konnte gezeigt werden, dass br-PEI zu einer hohen Genexpression nach lokaler Applikation in die Lunge führte, allerdings unter Verwendung von Wasser für Injektionszwecke. Es wird vermutet, dass dieser Effekt auf eine verstärkte zelluläre Aufnahme der Partikel durch hypoosmotischen Schock zurückzuführen ist, der jedoch weder als physiologisch noch toxikologisch unbedenklich anzusehen ist (Rudolph et al., 2000). Bei dieser Applikation wurde unter Verwendung biokompatibler Polymere und unter Umgehung des hypoosmotischen Schocks eine zufriedenstellende Expression erzielt.

Kapitel 4

Lokaler Gentransfer mittels *in situ* gebildeter Filme

4.1 Theoretischer Hintergrund und experimenteller Versuchsaufbau

In situ geformte Depotarzneiformen zeichnen sich dadurch aus, dass sie vor Applikation flüssig und leicht applizierbar sind, in diesem Zustand mit dem gewünschten Arzneistoff beladen werden können und nach Applikation an der Injektionsstelle *in situ* eine bioabbaubare Matrix ausbilden, die den Arzneistoff mit einer definierten Kinetik freisetzt. Daher werden diese Systeme auch als injizierbare Implantate bezeichnet. Implantate, die durch Präzipitation des Polymers an der Applikationsstelle entstehen, stellen eine Untergruppe der *in situ* geformten Depotarzneiformen dar. Diese bestehen zumeist aus einem wasserunlöslichen bioabbaubaren Polymer gelöst in einem organischen Lösungsmittel, in dem der Arzneistoff gelöst oder suspendiert vorliegt. Nach Applikation diffundiert das Lösungsmittel aus der Polymermatrix heraus, während am Applikationsort vorhandene Gewebsflüssigkeit in die Matrix hinein diffundiert und nach und nach das Lösungsmittel ersetzt. Infolgedessen kommt es *in situ* zur Präzipitation des Polymers und zur Ausbildung einer Matrix mit wassergefüllten Poren, in die der Arzneistoffe eingebettet ist.

In diesem Abschnitt der Arbeit sollte ein *in situ* gebildeter Film, der durch Präzipitation des Polymers an der Applikationsstelle entsteht, für die kontrollierte Freisetzung von Nukleinsäuren entwickelt werden. Die Entwicklung erfolgte auf Basis eines Applikationssystems der Firma Baxter, das bereits für die Applikation eines Fibrinklebers (Tissucol Duo Quick, Baxter) in der Klinik eingesetzt wird. Dieses System ist in Abbildung 4.1 schema-

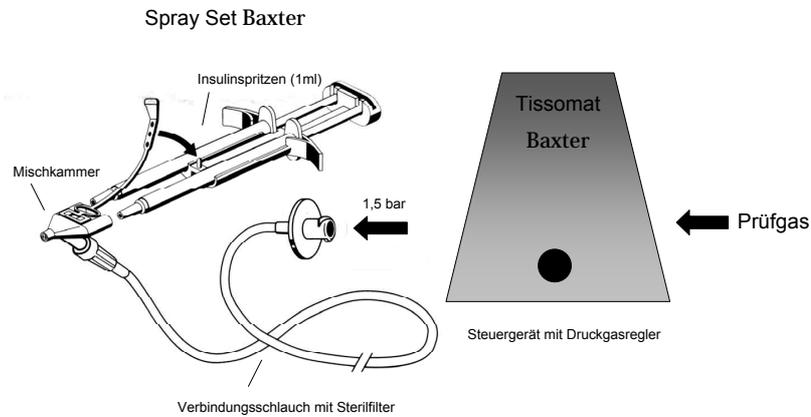


Abbildung 4.1: Versuchsaufbau zur Herstellung *in situ* gebildeter Filme

tisch dargestellt und besteht aus i) einem Steuergerät mit angeschlossener Druckgasflasche (Tissomat, Baxter AG), ii) einem Verbindungsschlauch mit Sterilfilter und iii) einer Doppelspritzenhalterung mit Mischkammer (Duploject Spray Set, Baxter AG). In dem verwendeten Zweispritzensystem erfolgte die *in situ* Präzipitation bereits kurz nach der Mischkammer, indem jeweils eine Spritze mit der lipophilen Komponente (Polymer und Lösungsmittel) und eine mit der wässrigen Komponente (Wasser für Injektionszwecke) beladen wurde. Mittels Druckluftzufuhr konnte ein feiner Film erzeugt und ein Verkleben der Düse verhindert werden. Dadurch sollte eine möglichst schnelle und vollständige Filmbildung unabhängig von der vorhandenen Menge an Gewebsflüssigkeit am Applikationsort erzielt und in der Folge der Verlust an Arzneistoff reduziert werden.

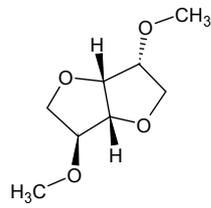
4.2 Auswahl geeigneter Lösungsmittel

Entscheidend für die Auswahl eines geeigneten Lösungsmittels waren i) die pharmazeutische Anwendbarkeit, ii) eine gute Gewebeerträglichkeit, iii) die Wassermischbarkeit und iv) die Löslichkeit des Polymers im Lösungsmittel. Auf Basis dieser Parameter wurden einige Lösungsmittel für ein weiteres Screening ausgewählt, deren Struktur in Abbildung 4.2 dargestellt und technologisch relevante Eigenschaften in Tabelle 4.1 zusammengefasst sind. Einige Lösungsmittel sind bereits mit einer GRAS-Nummer (engl. *Generally recognized as safe*) versehen, da sie von der FDA als generell unbedenklich eingestuft wurden.

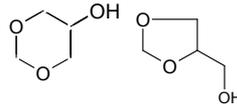
Ein weit verbreitetes Lösungsmittel für die Anwendung injizierbarer Depotsysteme ist Tetraglykol (Tetrahydrofurfurylalkohol-Polyethylenglykol), auch als Glykofurol bezeichnet (Chern and Zingerman, 2004; Eliaz and Kost, 2000). Tetraglykol wird bereits seit den 60er Jahren als Lösungsmittel für Parenteralia (i.v., i.m.) in Konzentrationen bis 50 % (v/v) verwendet und zeigt in dieser Verdünnung eine relativ geringe Toxizität (Mottu et al., 2000).

Glycerolformal ist ein geruchloses Lösungsmittel mit ebenfalls geringer Toxizität, das aus einer Mischung aus 1,3-Dioxane-5-ol und 1,3-Dioxolane-4-methanol besteht (Mottu et al., 2000) und ein ausgezeichnetes Lösungsmittel für zahlreiche Pharmazeutika und Kosmetika darstellt. Heutzutage wird es vor allem in der Veterinärmedizin als Lösungsmittel für Injektionen verwendet. So ist Ivomec STM 0,27 % zur s.c. Applikation in Schweinen zugelassen und wird mit 0,1 ml/kg eingesetzt (Lifschitz et al., 1999).

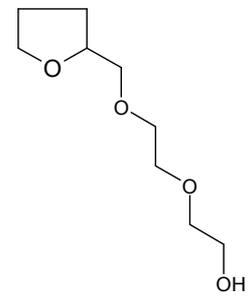
Für Dimethylisobutylid (DMI) und Ethyl-lactat gibt es kaum Untersuchungen zur Verträglichkeit der Lösungsmittel. Ethyl-lactat wird als parenteral applizierbares Vehikel für Steroidformulierungen verwendend und gilt trotz GRAS-Nummer als relativ toxisch mit narkotischer und leicht hämolytischer Aktivität. DMI wird vorwiegend als Penetrationsverstärker topisch angewendet, wobei ebenfalls eine geringe hämolytische Aktivität beobachtet wurde (Mottu et al., 2000, 2001). Ferner konnte in einer Studie von Matschke und Kollegen gezeigt werden, dass Glycerolester bei guter Verträglichkeit geeignete Lösungsmittel für PLGA/PLA Polymere darstellen (Matschke et al., 2002). Getestet wurde in diesem Zusammenhang Triacetin, ein kurzkettiges Triglycerid mit geringer Toxizität (Jain, 2000; Jain et al., 2000), das bereits zuvor als Alternative zu NMP and DMSO für *in situ* gebildete Depotarzneiformen beschrieben wurde (Bleiberg et al., 1993; Chandrashekar and Udupa, 1996; Chern and Zingerman, 2004; Singh and Udupa, 1997).



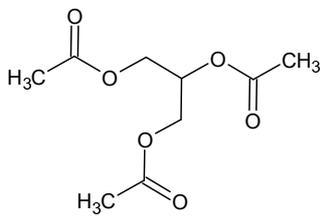
(a) Dimethylisorbid



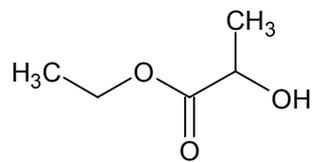
(b) Glycerolformal



(c) Tetraglykol



(d) Triacetin



(e) Ethyl-lactat

Abbildung 4.2: Strukturen verwendeter Lösungsmittel

Bezeichnung	η [mPas]*	XlogP3**	PLGA Löslichkeit***	Anwendung	GRAS	FAM
Glycerolformal	14,4	-0,8	33 %	parenteral	nein	Ivomec [®] , Peteha [®]
Tetraglykol	16,6	-0,3	k. A.	parenteral	nein	Phenhydantol [®] , Eusaprim
Dimethylsorbitol	8,16	-0,6	41 %	topisch	nein	Mykosert [®] , Ibutop Gel [®]
Triacetin	18,75	0,2	35 %	parenteral	ja	k. A.
Ethyl-lactat	2,74	0,2	46 %	k. A.	ja	k. A.

Tabelle 4.1: Überblick über die getesteten Lösungsmittel. (*) Die kinematische Viskosität η wurde an einem Rotationsviskosimeter (MRC 100, Paar Physics) bei 25°C bestimmt, (**) XlogP3 Daten sind errechnete Werte (Cheng et al., 2007), (***) Löslichkeitsdaten wurden einer Publikation von Matschke et al., 2002 entnommen.

4.2.1 Bestimmung der Filmgüte in Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel

Die entscheidende Voraussetzung für die Ausbildung eines *in situ* gebildeten Depotsystems ist die Löslichkeit des Polymers im Lösungsmittel. In der Literatur werden für *in situ* gebildete Systeme auf PLGA-Basis Löslichkeiten von mindestens 10 % (m/v) vorausgesetzt (Dunn et al., 1994). Löslichkeitsdaten in klassischen Lösungsmitteln wie NMP und DMSO, aber auch in Ethyl-lactat wurden bereits für unterschiedliche PLGA Polymere erhoben (Shively et al., 1995). In diesen Studien zeigte sich, dass die Löslichkeit der Polymere mit steigender Molekülmasse abnahm. Ferner korrelierte die für eine *in situ* Präzipitation notwendige Wassermenge mit der Löslichkeit des Polymers im verwendeten Lösungsmittel. Je besser die Löslichkeit des Polymers im verwendeten Lösungsmittel war, desto mehr Wasser wurde für die Ausbildung der Depotmatrix benötigt. Im Gegensatz dazu nahm die notwendige Wassermenge mit steigendem Polymeranteil ab.

Erste Formulierungs- und Löslichkeitsversuche wurden unter Verwendung des Modellpolymers Rhesomer[®]RG 503 H durchgeführt. Zur besseren Visualisierung wurde die Wasserphase mit dem blauen Farbstoff Brillantblau angefärbt. Für alle getesteten Lösungsmittel lies sich eine 10 %ige (m/v) Polymerlösung herstellen, allerdings zeigten die Filme bereits visuell deutliche Unterschiede bezüglich Festigkeit, Homogenität und Einbau der wässrigen Phase in die Matrix. So konnte unter Verwendung von Triacetin als Lösungsmittel kein homogener Film erzielt werden, sondern es bildete sich eine W/O Emulsion aus, die in Abbildung 4.3 (a) deutlich erkennbar ist. Alle anderen Lösungsmittel führten zur Ausbildung eines Films, wobei der Einbau der wässrigen Phase deutlich variierte. Anhand der Einfärbung der Matrix nahm der Einbau der wässrigen Phase in folgender Reihenfolge ab: Triacetin \leq Ethyl-lactat $<<$ Tetraglykol $<$ Glycerolfomal \approx DMI.

In Tabelle 4.1 ist der Verteilungskoeffizient P, ein wichtiges Maß für die Hydrophilie beziehungsweise Lipophilie eines Lösungsmittels, für alle getesteten Lösungsmittel angegeben. Dieser beschreibt die Verteilung eines Stoffes zwischen einer Octanol- und einer Wasser-Phase und wird üblicherweise als $\log P$ angegeben. Mittlerweile existieren Programme, die den Verteilungskoeffizient sehr genau vorhersagen können. Ein angewendeter Algorithmus hierfür ist der XLogP3 (Cheng et al., 2007), der für lipophile Substanzen positiv und für hydrophile Substanzen negative Werte liefert. Für Ethyl-lactat wurde der P-Wert von Milchsäure der Berechnung zu Grunde gelegt, da das Lösungsmittel leicht in seine Edukte Ethanol und Milchsäure zerfällt. Ver-

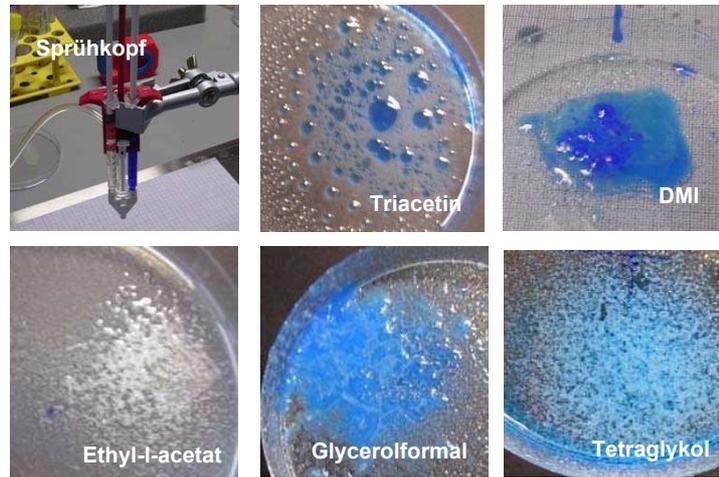
gleichet man nun den Einbau der wässrigen Phase in die Polymermatrix mit den LogP-Werten der einzelnen Lösungsmittel, so wird eine Abhängigkeit der Filmgüte, die durch einen geringen Verlust an Polymer im Überstand charakterisiert ist, von der Wasserlöslichkeit der verwendeten Lösungsmittel deutlich. Es ist davon auszugehen, dass Triacetin und Ethyl-lactat als lipophile Lösungsmittel ($X_{\log P} > 0$) eine geringere Wassermischbarkeit als die anderen Lösungsmittel aufweisen und dadurch die schlechte Filmgüte der Matrix erklärt werden kann. Während unter Verwendung von Triacetin kein Sprühfilm erzeugt werden konnte, führte Ethyl-lactat zu einer sehr inhomogenen, löchrigen Filmstruktur, in die nur sehr wenig Farbstoff eingebaut werden konnte. Im Gegensatz dazu bildeten sich bei Verwendung von Glycerolfomal, DMI oder Tetraglykol *in situ* Filme aus.

Um die Filmgüte besser beurteilen zu können, wurde in Sprühversuchen die Menge an Polymer im Überstand (Verlust) und im Präzipitat (Implantat) durch Rückwaage der getrockneten Matrix quantifiziert. Trägt man nun den Verteilungskoeffizient P der Lösungsmittel gegen die Matrixgüte auf, wie in Abbildung 4.3 (b) dargestellt, so ergibt sich eine lineare Abhängigkeit der Filmgüte von der Wassermischbarkeit des Lösungsmittels. Die Graphik zeigt deutlich, dass die Matrixbildung mit steigender Wassermischbarkeit der Lösungsmittel verbessert werden konnte, wobei mit einem P -Wert $< 0,25$ circa 80 % der eingesetzten Polymermenge in die Matrix eingebaut wurde.

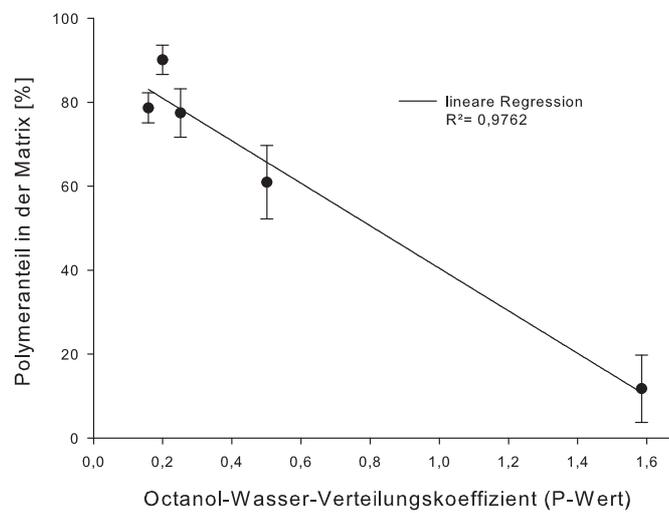
Für das weitere Vorgehen sollten nun unterschiedliche Polymere in Kombination mit den Lösungsmitteln Glycerolfomal, DMI und Tetraglykol getestet werden. Triacetin wurde aufgrund der schlechten Filmbildung nicht weiter verfolgt. Ethyl-lactat scheint trotz Einbaus erheblicher Polymeranteile aufgrund von Instabilitäten und einer löchrigen, inhomogenen Filmstruktur ebenfalls für die weitere Entwicklung ungeeignet. Ferner wurde eine starke hämolytische Aktivität für dieses Lösungsmittel beschrieben (Mottu et al., 2001).

4.2.2 Gewebeverträglichkeit der Lösungsmittel

Untersucht wurde in diesem Abschnitt der Einfluss des Lösungsmittels auf die metabolische Zellviabilität über einen Zeitraum von 11 Stunden. Diese wird über den ATP-Wert der Zellen, ein Maß für die Viabilität, bestimmt. Bei akuter Toxizität von Substanzen sinkt der Wert rapide und ermöglicht somit eine Abschätzung der Gewebeverträglichkeit der Lösungsmittel. In Abbildung 4.4 sind die aus den Versuchen berechneten LD₅₀-Werte für alle getesteten Lösungsmittel in Abhängigkeit von der Inkubationszeit dargestellt.



(a) *In situ* gebildete Filme unter Verwendung von Rhesomer[®] RG 503 H



(b) Filmgüte gegen den Verteilungskoeffizienten P aufgetragen. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung aus $n=4$ Ansätzen dargestellt.

Abbildung 4.3: Filmgüte der getesteten Lösungsmittel

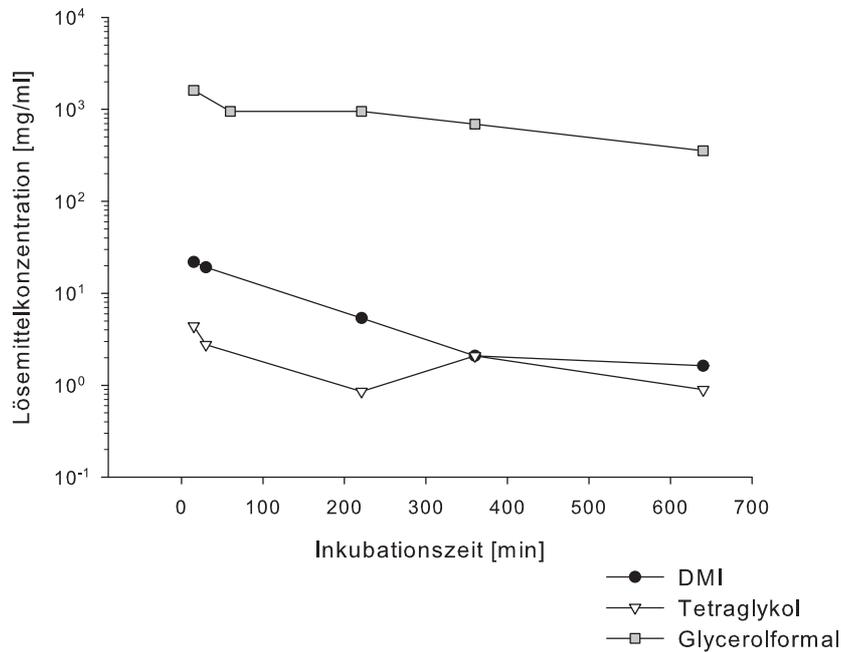


Abbildung 4.4: LD 50 der getesteten Lösungsmittel in Abhängigkeit von der Inkubationszeit auf Mesothelzellen. Bestimmt wurde jeweils die metabolische Zellviabilität mittels ATPlite Assay.

Die Verträglichkeit der Lösungsmittel nahm dabei in folgender Reihenfolge ab: Glycerolformal >> DMI > Tetraglykol. Glycerolformal wies mit einem LD50-Wert von circa 1 g/ml bei einer Inkubationszeit unter 6 h von den getesteten Lösungsmitteln die geringste Toxizität auf. Im Vergleich zu DMI und Tetraglykol bedeutete dies eine 220-fach beziehungsweise 400-fach bessere Verträglichkeit nach Versuchsende.

4.3 Auswahl geeigneter Biomaterialien

Für die Auswahl der Biomaterialien waren folgende Faktoren ausschlaggebend. Die verwendeten Materialien sollten i) biokompatibel, ii) bioabbaubar, iii) parenteral applizierbar, iv) sterilisierbar sein und v) eine kontrollierte Freisetzung über einen Zeitraum von 2-3 Wochen ermöglichen. Dieses kritische Zeitfenster war für den späteren therapeutischen Einsatz entscheidend (siehe 4.5.1). Als Biomaterialien wurden bioabbaubare Copolymere aus Milchsäure und Glykolsäure, Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Polymere, der Firma Boehringer Ingelheim ausgewählt (Handelsname Rhesomer RG[®]), die

von der FDA bereits zur parenteralen Applikation zugelassen sind. Seit 1989 gibt es ferner ein *in situ* geformtes Implantat auf PLGA-Basis zur s.c. Applikation auf dem Markt (siehe Kapitel 1.4.1). In Tabelle 4.2 sind einige relevante physikochemische Eigenschaften einer Auswahl an PLGA Polymeren zusammengefasst. Diese unterscheiden sich vorwiegend in den jeweiligen Abbauzeiten.

Der Abbau der Polymermatrix erfolgt über Esterhydrolyse zu den biokompatiblen Monomeren Milchsäure und Glykolsäure, die anschließend über den Krebszyklus zu CO_2 und Wasser metabolisiert werden. Das Abbauverhalten der PLGA Implantate beruht auf einer Bulkerosion, die dadurch charakterisiert ist, dass Wasser schneller in die Polymermatrix hinein diffundiert als der Abbau des Polymers erfolgt. Dementsprechend kommt es zu einem homogenen Massenverlust über den gesamten Querschnitt der Polymermatrix. Der Abbauprozess lässt sich generell in drei Abschnitte unterteilen:

- 1.) Hydratation: Das Polymer nimmt Wasser auf und quillt, wobei bereits ein geringer Anteil an Esterbindungen gespalten wird. Es findet allerdings noch kein Massenverlust statt.
- 2.) Abbau: Die mittlere Molmasse nimmt stark ab. Die bei der Spaltung der Esterbindungen entstehenden Carbonsäuregruppen führen zu einem pH-Abfall innerhalb der Matrix und infolgedessen zur Autokatalyse der Esterspaltung. Das Polymer verliert an mechanischer Stärke.
- 3.) Lösung: Zum Ende des Abbaus lösen sich niedermolekulare Fragmente und Oligomere im umliegenden Medium, wobei die gelösten Polymerfragmente wiederum zu freien Carbonsäuren hydrolysiert werden.

Die Abbauzeiten sind für die Freisetzung verkapselter Makromoleküle und nanoskaliger Trägermaterialien entscheidend, da diese aufgrund Ihrer Größe vorwiegend durch Matrixerosion freigesetzt werden und somit über die Abbauraten eine gezielte Einstellung der Freisetzungsraten ermöglicht wird. Die Abbauzeiten der PLGA Polymere lassen sich durch die Zusammensetzung (Anteil PLA:PGA) und die Molekülmasse der Polymere steuern, wobei die in Tabelle 4.2 angegebenen inhärenten Viskositäten ein Maß für die Molekülmasse darstellt.

Im Gegensatz zu den jeweiligen Homopolymeren PLA oder PGA besitzt das Copolymer schnellere Abbauraten unter zwei Monaten, wobei die kürzesten Abbauzeiten bei einer Zusammensetzung von 50 % PGA und 50 % PLA erreicht werden können. Eine Erhöhung des PLA-Anteils erschwert aufgrund der zusätzlichen Methylgruppe im Milchsäure-Monomer die Hydrolyse

Bezeichnung	PLA/PGA	i.v.* [dl/g]	Säuregruppe** [mg KOH/g]	Mw _{GPC} *** [kDa]	Freisetzung**** [Tagen]
502 H	50/50	0,22	9	k.A.	20
503 H	50/50	0,32	5	34	15
504 H	50/50	0,51	3	48	70
752 S	75/25	0,21	0	12	k.A.
755 S	75/25	0,63	0	63	30

Tabelle 4.2: Eigenschaften der verwendeten Rhesomer[®]RG Polymere. (*) Die inhärente Viskosität (i.v.; 0,1 % Lösung in Chloroform bei 25°C) und (**) die Anzahl der Säuregruppen (potentiometrischen Titration) sind den Herstellerdaten entnommen. (***) Die Molekülmasse, gemessen via GPC, und (****) die Freisetzungsdaten stammen aus Publikation von Eliaz und Kollegen (Eliaz and Kost, 2000; Eliaz and Szoka, 2002). Die Freisetzungsdaten beziehen sich für Rhesomer[®]RG 755 S und 503 H auf die Freisetzung von Albumin aus Rinderserum (Eliaz and Kost, 2000) und für Rhesomer[®]RG 502 H und 504 H auf die Freisetzung von Thymus-DNA (Eliaz and Szoka, 2002) aus einem injizierbaren Implantat (10 % bis 20 % PLGA (m/v) in Tetraglykol).

des Polymers und erhöht gleichzeitig die Hydrophobizität, wodurch die Abbaueiten steigen. Auch eine Steigerung des PGA-Anteils im Polymer oder die Verwendung des reinen Stereoisomers L-Milchsäure gegenüber dem Monomer D-/L-Milchsäure verlängern durch Erhöhung der Kristallinität des Polymers die Abbaueiten der Polymere, da Wasser leichter in amorphe Bereiche diffundiert und folglich diese Bereiche schneller abgebaut werden als kristalline. Somit steigt während des Abbaus die Kristallinität des Polymers stetig. Nicht zuletzt lassen sich die Abbauraten durch kürzere Polymerketten und freie Endgruppen (H-Serie) beschleunigen. Freie Endgruppen (Hydroxy- und Carboxy-Gruppen) erhöhen die Hydrophilie des Polymers, wodurch die Diffusionsgeschwindigkeit des Wassers und dessen Anteil in der Polymermatrix gesteigert werden. Freie Carboxylgruppen katalysieren darüber hinaus durch Senkung des pH-Wertes im inneren der Matrix die Hydrolyse der Polymere (Autokatalyse).

4.3.1 Matrixgüte in Abhängigkeit vom ausgewählten Polymer

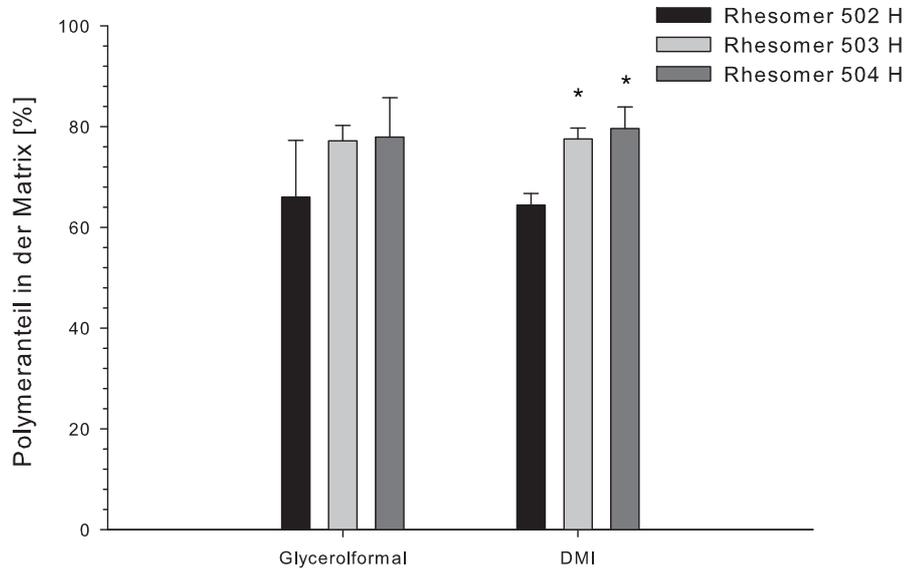
Es konnte bereits in Kapitel 4.2.1 gezeigt werden, dass der prozentuale Polymeranteil, der in den Film eingebaut werden kann, in Abhängigkeit der Wasserlöslichkeit des verwendeten Lösungsmittels variierte. Analog dazu sollte

die Matrixgüte unter Verwendung verschiedener Polymere näher betrachtet werden. Da sich Tetraglykol für die getesteten Polymere nicht eindampfen lässt, liegen für dieses Lösungsmittel keine Daten vor. Abbildung 4.5 zeigt die Ergebnisse für Polymere mit einer Zusammensetzung von (a) PLA/PGA 50:50 mit freien Säuregruppen (H-Serie) und (b) PLA/PGA 75:25 mit veresterten Endgruppen (S-Serie). Letztere sind aufgrund des höheren Anteils an Milchsäure und den veresterten Endgruppen lipophiler als die H-Serie.

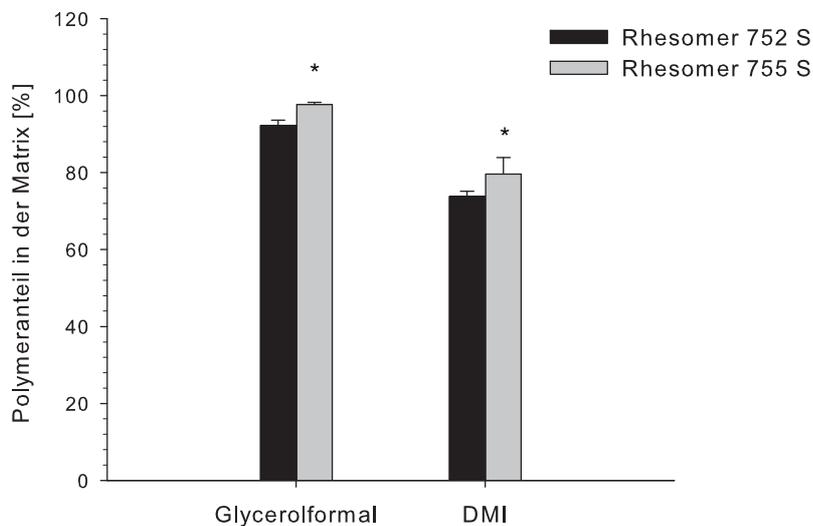
Die Graphiken verdeutlichen, dass mit höherer Molekülmasse der Polymere in beiden Serien eine größere Menge an Polymer in die Matrix eingebaut werden konnte. Dieser Effekt war signifikant für DMI in der H-Serie und für beide Lösungsmittel in der S-Serie, wobei unter Verwendung von Glycerolformal und Rhesomer[®] RG 755 S nahezu 100 % der eingesetzten Polymermenge die Matrix ausbildete ($97,6 \pm 0,6$ %). Vergleicht man die Polymererien in Kombination mit den getesteten Lösungsmitteln miteinander, so zeigte Glycerolformal in Kombination mit der S-Serie einen um 20 % geringeren Verlust an eingesetzter Polymermenge verglichen mit der H-Serie und verglichen mit DMI in beiden Polymererien. Erklärbar sind diese Ergebnisse erneut durch die unterschiedliche Wassermischbarkeit der beiden Lösungsmittel, die zu einer unterschiedlichen Löslichkeit der Polymere im Lösungsmittel führte und die Kinetik der Filmbildung maßgeblich beeinflusste. Während sich beide Serien sehr gut in DMI lösen ließen, konnte die S-Serie im Vergleich zur H-Serie nur schwer in Glycerolformal in Lösung gebracht werden. Letztere zeigte starkes Quellverhalten. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei der S-Serie in Glycerolformal um ein System nahe der Löslichkeitsgrenze handelte. Kombiniert mit der guten Wassermischbarkeit von Glycerolformal war eine schnelle und vollständige Filmbildung die Folge.

4.3.2 Viskoelastische Eigenschaften *in situ* gebildeter Filme

In einem dynamischen Scherexperiment wurden die viskoelastischen Eigenschaften der Filme untersucht. Hierzu wurde eine oszillierende Scherspannung mit einer definierten Amplitude und Frequenz an die Probe angelegt und die resultierende Scherverformung ermittelt, die ebenfalls durch Amplitude und Frequenz, auch Phasenverschiebung genannt, charakterisiert ist. Diese beiden Antwortgrößen können anschließend mathematisch in das Speichermodul G' und das Verlustmodul G'' umgeformt werden, wobei das Speichermodul den gespeicherten und somit wiederverwertbaren Anteil der eingebrachten Bewegungs- beziehungsweise Verformungsenergie kennzeichnet



(a) PLGA 50:50, H-Serie



(b) PLGA 75:25, S-Serie

Abbildung 4.5: Filmgüte ausgewählter Rhesomer[®] RG Polymere im Vergleich. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an eingesetztem Polymer, der den Sprühfilm ausbildet, wohingegen der Rest als löslicher Anteil im Überstand verloren geht. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=4$) angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet ($P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**)).

(elastischer Anteil) und das Verlustmodul ein Maß für die pro Schwingung in Wärme abgegebene Energie und somit den verlorenen Anteil darstellt (viskoser Anteil). In Abbildung 4.6 sind beide Module bei einer Anregungsfrequenz von 1 Hz für unterschiedliche Filme der H-Serie dargestellt.

Vergleicht man den elastischen und den viskosen Anteil beider Filme miteinander, so erkennt man eine unterschiedliche Sensitivität der viskoelastischen Eigenschaften gegenüber den verschiedenen Lösungsmitteln. Während sich im Falle der 502 H-Filme die viskoelastischen Eigenschaften durch die Wahl des geeigneten Lösungsmittels recht breit einstellen ließen (maximaler Faktor: 29 (G') beziehungsweise 22 (G'')), zeigten 504 H-Filme ein vom verwendeten Lösungsmittel unabhängiges rheologisches Verhalten. Letztere wiesen dabei mit 2-4 kPa eine mechanische Festigkeit vergleichbar mit Muskelfasern (8 -17 kPa) auf (Engler et al., 2006) und waren mit einem Verlustfaktor (G'/G'') >1 vorwiegend elastisch dominiert, so dass sich diese Filme im Versuch ähnlich einem Festkörper verhielten. Einzige Ausnahme stellte DMI dar, dessen *in situ* Filme mit einem Verlustfaktor von 0,85 viskos dominiert waren. Mit einer Dicke von $> 500 \mu\text{m}$ waren diese Filme im Vergleich zu den Rhesomer[®] RG 502 H-Filmen relativ dick (DMI: $500 \mu\text{m}$, Glycerolfomal: $600 \mu\text{m}$, Tetraglykol: $800 \mu\text{m}$). Letztere spreiteten auf der Platte des Rheometers und zeigten eine Dicke von lediglich $300 \mu\text{m}$ unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel.

Alle auf Rhesomer[®] RG 502 H basierenden Filme verhielten sich mit einem Verlustfaktor <1 gelartig, wobei deutliche Unterschiede in der Festigkeit zwischen den Lösungsmitteln zu erkennen waren. Lediglich bei Verwendung von Tetraglykol konnte eine dem Rhesomer[®] RG 504 H vergleichbare Festigkeit der Filme bei einem Verlustfaktor von 0,79 erzielt werden. DMI und Glycerolfomal waren mit einer Festigkeit von 130 beziehungsweise 900 Pa nicht annähernd vergleichbar und zeigten stark viskos dominiertes Verhalten (Verlustfaktor $>0,5$).

4.4 Formulierung *in situ* gebildeter Filme

Basierend auf den Erfahrungen aus den bereits durchgeführten Sprühversuchen wurde eine Formulierung bestehend aus i) PLGA Polymer, gelöst in einem der drei bereits verwendeten Lösungsmitteln, ii) wässriger Phase und iii) Plasmid-DNA als Modellwirkstoff entwickelt. Theoretisch konnte die Plasmid DNA sowohl in „nackter“ als auch in komplexierter Form in die Matrix eingebaut werden. Da „nackte“ Plasmid-DNA Zellen allerdings nur sehr inef-

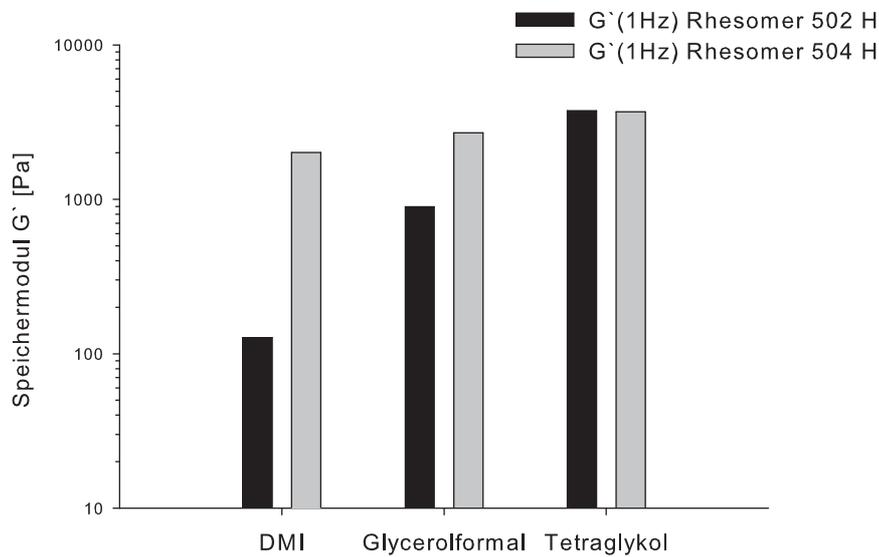
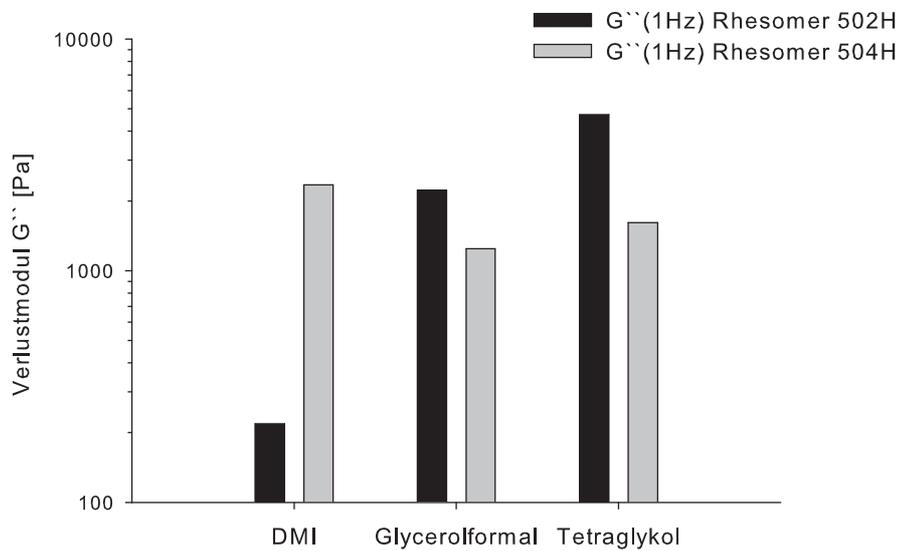
(a) Speichermodul G' der Biomaterialien in Abhängigkeit vom Lösungsmittel(b) Verlustmodul G'' der Biomaterialien in Abhängigkeit vom Lösungsmittel

Abbildung 4.6: Viskoelastische Untersuchungen der Filme: (a) Speichermodul (G') und (b) Verlustmodul (G'') der Rhesomer[®] RG H-Serie mit unterschiedlichen Lösungsmitteln im Vergleich bei einer Frequenz von 1Hz.

fizient transfiziert, wurde die Plasmid-DNA vor der Einbettung in den Film mit l-PEI komplexiert (N/P -Verhältnis 10) und in nanoskalige Polyplexe in die Matrix eingebaut. Dadurch konnte die pDNA zusätzlich vor einem pH-Abfall innerhalb der Matrix geschützt werden, der während des Abbaus der Polymerstruktur durch die Freisetzung von Polymer-Monomeren innerhalb der Matrix entsteht und generell ein Problem für empfindliche Makromoleküle darstellt (Capan et al., 1999).

Der Einbau der Polyplexe in die Matrix konnte gelöst in der wässrigen Phase (Eliaz and Szoka, 2002) oder dispergiert in der PLGA-Lösung (Eliaz and Kost, 2000; Eliaz et al., 2000) erfolgen. Allerdings hatte sich in Vorversuchen am Beispiel von PLGA/Tetraglykol-Systemen gezeigt, dass bereits eine direkte Zugabe kleiner Wassermengen ($\leq 5\%$) eine Präzipitation des Polymers verursachte. Daher waren hohe Beladungen des Sprühfilms nur durch den Einsatz hochkonzentrierter Plasmid-DNA Lösungen denkbar, die allerdings eine geringe Stabilität aufweisen und zur Aggregatbildung neigen. Daher sollten die Polyplexe als Lyophilisat analog zu Proteinformulierungen (Eliaz and Kost, 2000; Eliaz et al., 2000) in der PLGA-Lösung dispergiert oder vor Gebrauch in der wässrigen Phase resuspendiert werden. Grundsätzlich waren die Formulierungen wie folgt aufgebaut:

- 1.) Lipophile Phase (1 ml): 10 % (m/ V) PLGA Polymer in Glycerolformal, Tetraglykol oder DMI (Rhesomer[®] RG 502 H, 504 H)
- 2.) Hydrophile Phase (1 ml): Wasser für Injektionszwecke
- 3.) Wirkstoffkomponente: lyophilisierte Polyplexe resuspendiert in der lipophilen oder hydrophilen Phase

4.4.1 Herstellung pulverförmiger Polyplexe

Die Gefriertrocknung ist in der Pharmaindustrie eines der Standardverfahren zur Stabilisierung von Formulierungen während der Lagerung. Durch Einschluss der Moleküle in eine Hilfsstoffmatrix können Formulierungen dabei während der Trocknung stabilisiert werden, wobei je nach Trocknungsphase unterschiedliche Protektoren verwendet werden können. So verhindern Kryoprotektoren das Auskristallisieren der Lösung während des Einfrierens. Das System erstarrt als unterkühlte Schmelze ohne vollständige Phasentrennung (erstarrte Flüssigkeit, Glas). Im Gegensatz dazu bieten Lyoprotektoren Schutz im weiteren Verlauf der Trocknung, indem Sie unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken die Bindungen des Wirkstoffes zum Wasser ersetzen.

Polyplexe lassen sich unter Zusatz von Kryoprotektoren und/oder Lyoprotektoren ebenfalls lyophilisieren, so dass eine Aggregatbildung nach der Resuspendierung verhindert werden kann (Cherng et al., 1999b; Talsma et al., 1997). Als Lyophilisat können Polyplexe besser gelagert (Talsma et al., 1997) und eine Aufkonzentrierung der Lösung bis zu einer pDNA-Konzentration von 1 mg/ml ermöglicht werden (Anchordoquy et al., 2005). Zucker wie beispielsweise Saccharose oder Trehalose fungieren als Lyo- und Kryoprotektoren und haben sich zur Stabilisierung von Polyplexen als geeignet erwiesen (Cherng et al., 1999b; Talsma et al., 1997). Wasserlösliche Substanzen wie diese können ferner die Freisetzung makromolekularer Wirkstoffe aus *in situ* geformten PLGA basierten Filmen beschleunigen. Während der Matrixbildung bilden sich durch Auflösung dieser Substanzen wassergefüllte Poren aus, durch die der Wirkstoff anschließend aus der Matrix diffundieren kann. Ein ähnlicher Effekt wurde für eine hohe Beladung der Matrix beschrieben (Csaba et al., 2005; Matschke et al., 2002).

Getestet wurden in dieser Arbeit verschiedene Zucker in standardmäßig eingesetzten Konzentrationen (Cherng et al., 1999b; Talsma et al., 1997). Die Polyplexe, basierend auf l-PEI, wurden nach der Gefriertrocknung ohne vorherige Homogenisierung in Wasser für Injektionszwecke resuspendiert und deren Transfektionseffizienz auf humanen Bronchialepithelzellen getestet. Gute Transfektionsraten lieferte in den eingesetzten Konzentrationen lediglich das Disaccharid Saccharose mit einer 10-fachen Effizienzsteigerung gegenüber nativen Polyplexen (Abb. 4.7 (a)). Vergleichbare Werte wurden bereits von Talsma und Kollegen beschrieben (Talsma et al., 1997), wobei osmotische Effekt, die zu einer gesteigerten Aufnahme der Partikel in die Zelle führen könnten, erst ab einer 2-fachen Aufkonzentrierung zu erwarten sind (Anchordoquy et al., 2005). Partikelgrößenmessungen ergaben allerdings, dass es nach der Gefriertrocknung zu einer leichten Zunahme der Partikelgröße kam. Native Partikel wiesen eine Partikelgröße von ≤ 100 nm auf, wohingegen je nach verwendetem Dispergiermedium die Partikel nach der Gefriertrocknung bei einem $PI < 0,2$ auf 200-300 nm anwuchsen.

Um die pulverförmigen Polyplexe dosieren und in die Formulierung einarbeiten zu können, sollten diese nach der Lyophilisation im Mörser homogenisiert und mittels Ultra-Turrax[®] (UT) oder Glashomogenisator (H) in der PLGA-Lösung dispergiert werden. Die Stabilität der Polyplexe nach Homogenisierung und anschließender Resuspendierung in Wasser für Injektionszwecke wurde mittels Transfektionsversuche und Agarosegelelektrophorese untersucht. Die Ergebnisse der Versuche auf Lungenzelllinien zeigten keine Veränderungen in der Transfektionseffizienz durch Homogenisierung (Abb.

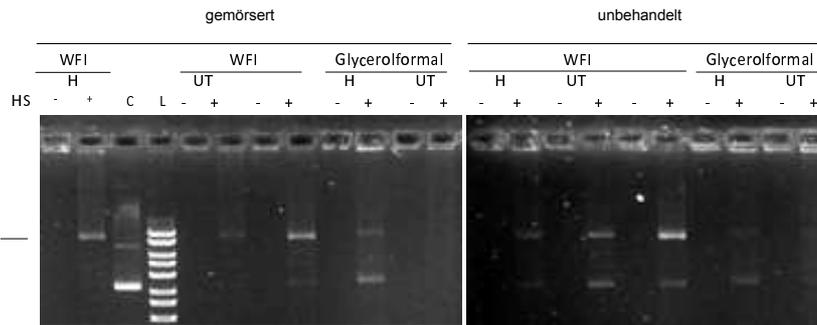
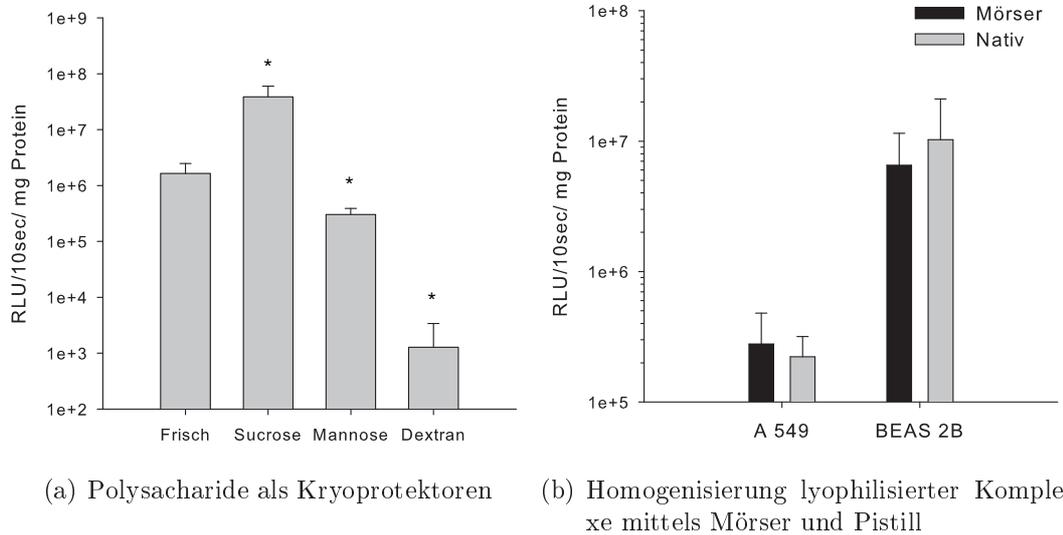


Abbildung 4.7: Herstellung pulverförmiger Polyplexe: Transfektionseffizienz lyophilisierter l-PEI/pDNA Polyplexe auf Lungenzelllinien unter (a) Verwendung unterschiedlicher Kryoprotektoren (10% (m/v) Saccharose oder Mannose, 4% (m/v) Dextran 5000) und (b) nach Homogenisierung lyophilisierter Polyplexe unter Verwendung von 10% (m/v) Saccharose als Kryoprotektor. Die Polyplexe wurden hierzu in Wasser für Injektionszwecke (WFI) resuspendiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung ((a) $n=7$, (b) $n=4$) dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet ($P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**)). (c) DNA Topologie lyophilisierter pDNA/l-PEI Polyplexe aufgetrennt mittels Agarosegelelektrophorese unter Zusatz von Heparansulfat (HS): pCMV-Luc Kontrolle (C), Größenmarker (L), Wasser für Injektionszwecke (WFI), Ultra-Turrax[®] (UT), Homogenisator (H).

4.7 (b)). Eine Kontrolle der Topologie der Plasmid-DNA unter Zusatz von Heparansulfat ergab ebenfalls keinen Unterschied zwischen den lyophilisierten Polyplexen in Wasser für Injektionszwecke (Abb.4.7 (c)). Sowohl die in Wasser für Injektionszwecke resuspendierten Proben (unbehandelt) als auch jene Polyplexe, die vor der Resuspendierung vorhomogenisiert wurden (gemörsert), zeigten vergleichbare Bandenmuster für alle drei Dispergierungsmethoden (UT, Homogenisator, gelöst). Im Vergleich zur Kontrolle, unkomplexierter Plasmid-DNA, wurde in allen Fällen eine leichte Zunahme der relaxierten Form beobachtet. Ein Abbau der Plasmid-DNA war für Wasser für Injektionszwecke nicht zu erkennen.

Beispielhaft für die Lösungsmittel ist Glycerolformal dargestellt. Es ergaben sich keine Unterschiede im Bandenmuster zwischen unbehandelten oder vorhomogenisierten Proben sowie gegenüber der Wasserkontrolle. Unter Verwendung des Homogenisators als Dispergierungsmethode konnte ebenfalls keine Veränderung beobachtet werden. Im Falle des Ultra-Turrax[®] verblieb die pDNA vorwiegend komplexiert in den Taschen des Gels, wobei für unbehandelte Proben zwei sehr schwache Banden vergleichbar mit den anderen Proben erkennbar waren. Allerdings ist anzumerken, dass bei Einsatz gleicher Mengen an Heparansulfat generell unter dem Einfluss von Glycerolformal größere Mengen an pDNA komplexiert in den Taschen verblieb. Für die homogenisierten UT-Proben war ein leichter Schmier im Gel zu erkennen, eine Zerstörung der Plasmid-DNA in Form von Fragmenten konnte allerdings auch hier nicht beobachtet werden.

4.4.2 Bestimmung der Freisetzungskinetik formulierter Plasmid-DNA Polyplexe

Die Wirkstofffreisetzung aus Implantaten kann prinzipiell durch i) Diffusion des Wirkstoffes aus der Polymermatrix (diffusionskontrolliert) oder ii) durch Erosion der Matrix (erosionskontrolliert) erfolgen (Fan and Singh, 1989; Goepferich, 1997). Für die Freigabe von Wirkstoffen aus bulkerodierenden Polymermatrixen wie im Falle von PLGA-Systemen (siehe Abb. 4.3) werden in Abhängigkeit der Wirkstoffbeladung, der Molekülmasse des verwendeten Polymers, sowie der Polymerkonzentration ein- oder zweiphasige Freigabeprofile beschrieben (Goepferich et al., 1995; Ramchandani and Robinson, 1998). Zusätzlich kann es initial bis zur vollständigen Präzipitation des Polymers zu einer Freisetzung des Wirkstoffes kommen. Die Freisetzungskinetik *in situ* gebildeter Filme wurde in Abhängigkeit der Molekülmasse des Polymers, des

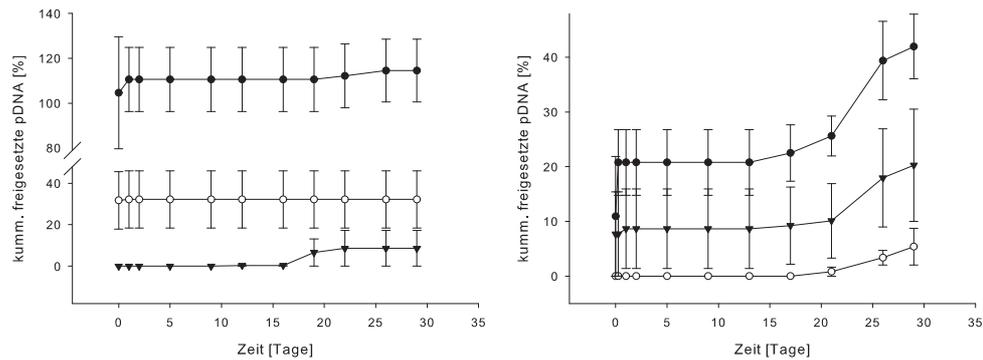
verwendeten Lösungsmittels und der Einbettungsvariante untersucht. Folgende Kombinationen wurden getestet:

- 1.) Lipophile Phase (1ml): Rhesomer[®] RG 502 H oder 504 H 10 %ig (m/v) gelöst in Glycerolformal, Tetraglykol oder DMI
- 2.) Hydrophile Phase (1ml): Wasser für Injektionszwecke
- 3.) Wirkstoffkomponente: lyophilisierte Polyplexe (l-PEI/pDNA) in homogener Form

Die Polyplexe wurden nach der Lyophilisation im Mörser homogenisiert und entweder in der hydrophilen Phase resuspendiert (Einbettungsvariante A) oder mittels Homogenisator in der lipophilen PLGA-Lösung dispergiert (Einbettungsvariante B). Die Freisetzungsprofile sind für Rhesomer[®] RG 502 H und 504 H unter Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel für beide Einbettungsvarianten in Abbildung 4.8 dargestellt.

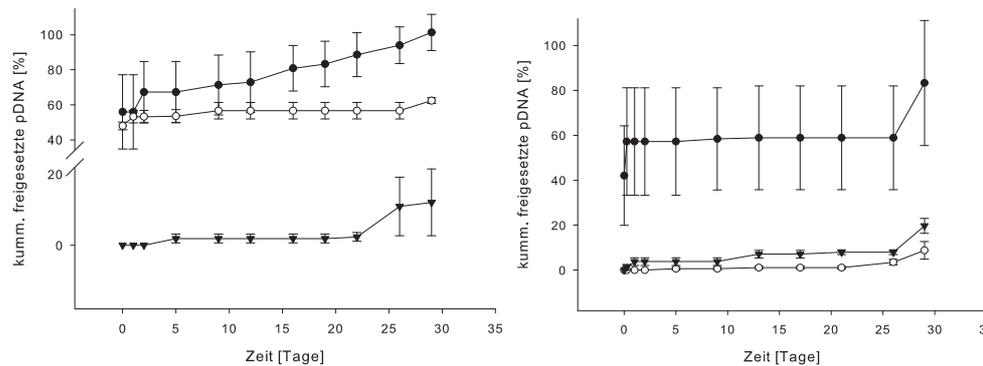
Betrachtet man zunächst den Einbau der Polyplexe in den Film durch Lösung in der hydrophilen Phase, so zeigt sich ein deutlicher Einfluss der Molekülmassen der eingesetzten Polymere und der verwendeten Lösungsmittel auf die Freisetzungskinetik (Abb. 4.8 (a), (c)). Ein Einbau der Wirkstoffkomponente war unter Verwendung von DMI als Lösungsmittel in Kombination mit dem kurzkettigen Polymer Rhesomer[®] RG 502 H nicht möglich (Abb. 4.8 (a)). Während der Präzipitation des Polymers wurden bereits 100 % der Polyplexe freigesetzt. Unter Verwendung des längerkettigen Polymers, dem Rhesomer[®] RG 504 H, erreichte man hingegen einen typischen zweiphasigen Freisetzungsverlauf. Dieser war aus einer zunächst diffusionskontrollierten Freisetzung (Phase 1, konkaves Freisetzungsprofil) gefolgt von einer erosionskontrollierten Freisetzung (Phase 2, lineare Kinetik) zusammengesetzt (Abb. 4.8 (c)). Auffällig war in diesem Zusammenhang, dass unter Verwendung von DMI in allen Fällen die höchste initiale Freisetzung erreicht wurde, die je nach Einbettungsvariante und Kettenlänge des Polymers von 10 % bis 100 % variierte.

Im Gegensatz dazu zeigte Glycerolformal eine geringe initiale Freisetzung gefolgt von einer langsamen diffusionskontrollierten Freisetzung. Erst mit beginnender Erosion der Matrixerosion wurde eine beschleunigte Freisetzung der Polyplexe beobachtet, die in Abhängigkeit der Kettenlänge der verwendeten Polymere nach 15 beziehungsweise 26 Tagen einsetzte. Filme auf Basis von Tetraglykol zeigten hingegen nach moderater initialer Freisetzung von 32 % (Rhesomer[®] RG 502 H) beziehungsweise 50 % (Rhesomer[®] RG 504 H) eine



(a) Rhesomer[®] RG 502 H, Polyplexe in hydrophiler Phase

(b) Rhesomer[®] RG 502 H, Polyplexe in lipophiler Phase



(c) Rhesomer[®] RG 504 H, Polyplexe in hydrophiler Phase

(d) Rhesomer[®] RG 504 H, Polyplexe in lipophiler Phase

Abbildung 4.8: Freisetzungskinetik unterschiedlicher Formulierungen *in situ* gebildeter Filme: Lyophilisierte Polyplexe wurden unter Verwendung unterschiedlicher Polymerlösungen (DMI (●), Tetraglykol (○) und Glycerolfomal (▲)) in die Filme eingebaut und die Freisetzung der pDNA über 30 Tage analysiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes ($n=3$) angegeben.

moderate bis keine Freisetzung im beobachteten Zeitrahmen. Lediglich im Falle des längerkettigen Polymers kam es bedingt durch die Erosion der Matrix zu einer geringen Freisetzung nach 26 Tagen (Abb. 4.8 (c)).

Wurden die Polyplexe hingegen in der lipophilen PLGA-Lösung dispergiert (Einbettungsvariante B), waren die initialen Freisetzungsraten der Polyplexe, sowie die Diffusion aus der Matrix für alle Polymer/Lösungsmittel Kombinationen reduziert und die Freisetzung verlief hauptsächlich erosionskontrolliert (Abb. 4.8 (b), (d)). Die getesteten Lösungsmittel zeigten dabei ähnliche Freisetzungskurven mit unterschiedlich starker Retardierung, wobei die Freisetzungsraten in folgender Reihenfolge zunahm: Tetraglykol \ll Glycerolformal $<$ DMI. Während im Freisetzungsprofil für DMI und Glycerolformal deutlich kürzere Erosionsraten für das kurzkettige 502H-Polymer gegenüber dem langkettigen 504H-Polymer erkennbar waren (Tag 17 *versus* Tag 29), konnte im Falle von Tetraglykol aufgrund der starken Retardierung der Matrix kein Unterschied zwischen den Polymeren (5,4 % *versus* 8,8 % kumulative Freisetzung nach 30 Tagen) beobachtet werden.

Zusammenfassend zeigte DMI für alle Kombinationen aus lang- oder kurzkettigem Polymer und verschiedenen Einbettungsvarianten die schnellste Freisetzung. Eine kontinuierliche Freisetzung bis zu 100 % Wirkstofffreisetzung konnte mit Rhesomer[®] RG 504H durch Einbau der Wirkstoffkomponente in die hydrophile Phase erzielt werden. Polyplexe, die in Filmen auf Tetraglykol-Basis eingebaut wurden, zeigten keine diffusionskontrollierte Freisetzung. Über den beobachteten Zeitraum konnte nach initialer Freisetzung zusätzlich maximal 14 % der pDNA Menge freigesetzt werden, wobei die initiale Freisetzung zwischen 0 und 48 % variierte. Diese war bei im Falle von Einbettungsvariante A relativ hoch, wohingegen bei Dispergierung der Polyplexe in der lipophilen Phase keine initiale Freisetzung beobachtet wurde. Filme auf Basis von Glycerolformal wiesen unabhängig vom Einbettungsverfahren eine geringe initiale Freisetzung auf, allerdings konnten die Polyplexe auch bei Einsatz dieser Filme erst nach 23 Tagen durch Erosion der Matrix freigesetzt werden.

4.5 Therapeutischer Einsatz *in situ* geformter PLGA-Filme

Ein mögliches therapeutisches Einsatzgebiet für *in situ* gebildete Filme stellen postoperativen Adhäsionen dar, bei denen es nach einer Operation im

Bauchraum in einem Zeitfenster von 2 Wochen zu permanenten Verwachsungen kommt. Neben der kontrollierten Freisetzung pharmakologisch wirksamer Komponenten stellt der Film zusätzlich eine antiadhäsive Barriere für die Ausbildung von Verwachsungen dar und ist für den Einsatz in der minimal-invasiven Chirurgie geeignet.

4.5.1 Verwachsungen des Peritoneums und therapeutische Ansatzpunkte

Verwachsungen des Bauchfells (Peritoneum) stellen eine häufige Komplikation chirurgischer Eingriffe dar. Nach laparotomisch (unter Eröffnung des Bauchraumes) Eingriffen entwickeln bis zu 94 % der Patienten primäre postoperative Adhäsionen (Hellebrekers et al., 2000; Menzies, 1992). Die häufigste Ursache hierfür sind Mikrotraumen des Peritoneums, Ischämien und Fremdkörperreaktionen (DeCherney and diZerega, 1997). Die Häufigkeit postoperativer intraabdominaler Adhäsionen ist vor allem nach gynäkologischen Eingriffen sehr hoch und reicht von 50-95 %. Etwa ein Drittel der Patienten werden nach abdominalen Operationen innerhalb von 10 Jahren erneut aufgrund von Symptomen, die direkt oder indirekt auf Verwachsungen zurückzuführen sind, in die Klinik eingewiesen (Ellis et al., 1999; Parker et al., 2001). Die Folge sind chronische Schmerzen, nicht selten Infertilität bei Frauen und ein noch nach Jahrzehnten auftretender lebensbedrohlicher Darmverschluss. Die Suche nach einer effektiven Adhäsionsprophylaxe ist heute aktueller denn je, da durch steigende Lebenserwartung vor allem in den Industrieländern ein deutlicher Anstieg an adhäsionsbedingten Symptomen und Erkrankungen zu beobachten ist. Noch immer gilt, dass kaum ein Gebiet der abdominalen Chirurgie in diagnostischer und therapeutischer Hinsicht so viele Probleme verursacht, wie es bei peritonealen Verwachsungen der Fall ist. Die sozioökonomischen Folgelasten sind immens (Holmdahl and Risberg, 1997).

Das Peritoneum kleidet als seröse Haut die Bauchhöhle aus und besteht aus einem viszeralem und einem parietalem Blatt mit einem serösen Spaltraum, der mit 5-20 ml Flüssigkeit gefüllt ist und ein freies Gleiten der Organe ermöglicht. Histologisch betrachtet besteht das Peritoneum aus einem einschichtigen Plattenepithel, auch Mesothelschicht genannt, und einer schmalen Schicht an subserösem Bindegewebe. Eine Verletzung der Mesothelschicht führt innerhalb weniger Tage nach dem Eingriff zur Ausbildung fester Verwachsungen zwischen den beiden Blättern und dem umliegenden Gewebe. Neben Verletzungen durch den chirurgischen Eingriff kann die Mesothelschicht auch bereits durch den Einsatz von Tupfern, das Austrocknen

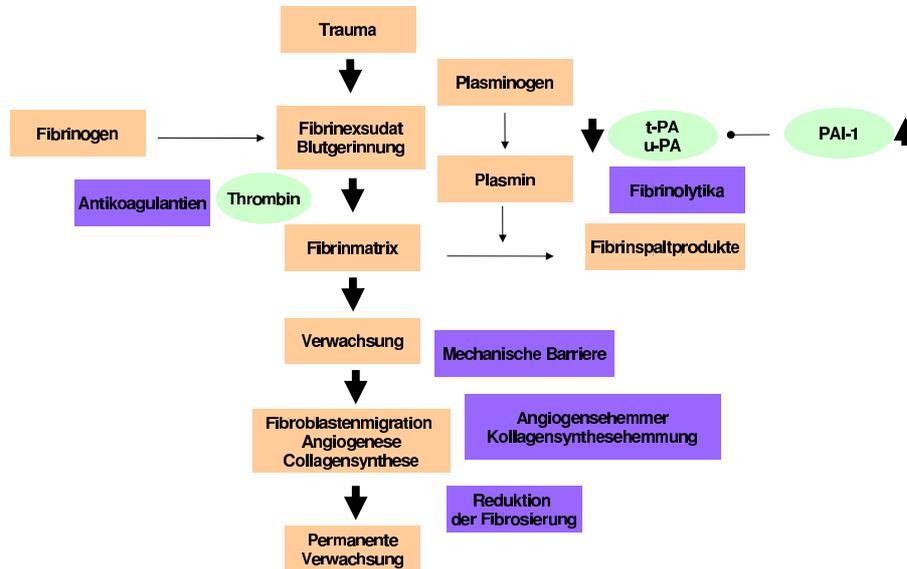


Abbildung 4.9: Pathogenese peritonealer Verwachsungen und mögliche Ansatzpunkte

der Oberfläche während der Operation oder durch den Kontakt mit Talkum gepuderten Handschuhen geschädigt werden. Der Aktivierungsprozess wird dabei allein durch den Einsatz minimal-invasiver Chirurgie wie der Labroskopie nicht erfolgreich verhindert (Brokelman et al., 2009).

Obwohl schon über ein Jahrhundert an der Pathophysiologie peritonealer Adhäsionen geforscht wurde, sind die Erkenntnisse bis heute noch unvollständig. In Abbildung 4.9 ist die Pathogenese peritonealer Adhäsionen mit therapeutischen Ansatzmöglichkeiten zusammenfassend dargestellt. Man nimmt an, dass es durch Traumatisierung des peritonealen Gewebes zu einer Entzündungsreaktion mit Exsudation von inflammatorischen Zellen und löslichen Fibrinmonomeren kommt. Innerhalb von 3 Stunden bilden sich daraus erste fibröse Strukturen, die bei ausreichender fibrinolytischer Aktivität durch die Serinprotease Plasmin innerhalb der ersten Tage aufgelöst werden können. Geschieht dies nicht, kommt es in der Folge zur Bildung von kollagenreichem Bindegewebe, der permanenten Adhäsion.

Während in den ersten zwei Tagen vor allem neutrophile Leukozyten am Entzündungsprozess beteiligt sind, spielen Makrophagen und Mesothelzellen eine entscheidende Rolle für die Entstehung der permanenten Adhäsion.

on. Beide Zelltypen sind in der Lage Plasminogen, eine Vorstufe des Plasmins, in die Blutbahn auszuschütten. In den Blutkapillaren wird Plasminogen durch die Serinprotease Plasminogenaktivator (engl. *Tissue/Urokinase Plasminogen Activator*, tPA/uPA) in Plasmin umgewandelt. Diese Proteasen werden ebenfalls von der Mesothelschicht sezerniert. Ausgelöst durch eine erhöhte Konzentration an inflammatorischen Zytokinen wie dem Tumornekrosefaktor (engl. *Tumor Necrosis Factor*, TNF), dem transformierenden Wachstumsfaktor (engl. *Transforming Growth Factor*, TGF β) oder Interleukinen kommt es in der posttraumatischen Phase zu einem Abfall der aktiven tPA-Konzentration. Infolgedessen ist die fibrinolytische Aktivität in der Abdominalhöhle deutlich reduziert, was zu einem Ungleichgewicht zwischen Fibrinolyse und Fibrinbildung führt und letztendlich die Ausbildung permanenter Adhäsionen bewirkt. Der Abfall der aktiven tPA-Konzentration im Gewebe wiederum ist die Folge einer reduzierten tPA Produktion in den Mesothelzellen und einer zeitgleich erfolgenden Überexprimierung an Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 (engl. *Tissue Plasminogen Activator Inhibitor 1*, PAI-1), dem wichtigsten Inhibitor des Gewebeplasminogenaktivators. Vergleichbar dem primären Wundverschluss, bei dem Thrombozyten vermehrt PAI-1 sezernieren, um dadurch eine vorzeitige Lyse des Fibrins zu verhindern und somit den primären Wundverschluss einzuleiten, kommt es in der posttraumatischen Phase zu einer vermehrten Bildung des Plasminogenaktivator-Inhibitors durch Mesothelzellen und Endothelzellen submesothelialer Blutgefäße (Cheong et al., 2001; Ivarsson et al., 1998). Das tPA/PAI-1 Gleichgewicht ist daher bis heute die Schlüsselstelle für die Ausbildung peritonealer Adhäsionen (Hellebrekers et al., 2000; Rout et al., 2005; Treutner and Schumpelick, 2000).

Die Therapie der permanenten Adhäsion lässt sich in 5 wesentliche Ansatzpunkte unterteilen: i) Primärprophylaxe durch Vermeidung von Verletzungen und Entzündungen, ii) Verhinderung der Gerinnung von serumhaltigem Exsudat durch Antikoagulantien, iii) Auflösung der Fibrinstrukturen durch Fibrinolytika, iv) Einsatz mechanischer Barrieren bis zur Regeneration der Mesothelschicht durch Separation und v) Verhinderung der Fibrinosierung (Hellebrekers et al., 2000). Neben dem Einsatz von Fibrinolytika sind physikalische Barrieren die erfolgversprechendsten Ansätze, obwohl sich bis heute beiden Ansätze der beiden als Standard in der Klinik durchgesetzt hat. Eine unzureichende antiadhäsive Wirksamkeit, sowie kurze Plasmahalbwertszeiten der Fibrinolytika und starke Nebenwirkungen sind Gründe hierfür. Einige Marktprodukte sind in Tabelle 4.3 zusammengestellt.

In der Klasse der Fibrinolytika spielen vor allem Plasminaktivatoren wie

Streptokinase, Urokinase, sowie das rekombinant hergestellte tPA Protein Alteplase (Actilyse[®]) und dessen modifizierte Form Reteplase (Rapilysin[®]) eine wichtige Rolle. Allerdings besitzt Alteplase eine Plasmahalbwertszeit von lediglich 3-6 Minuten, die in der modifizierten Form, der Reteplase, auf 13-16 min gesteigert werden konnte (Sitter et al., 1999). Mehrfachapplikationen und Infusionspumpen wurden eingesetzt, um kontinuierliche Wirkspiegel zu erzielen.

Im Bereich der Barriersysteme konnte eine Reduktion der Adhäsionen bereits erfolgreich gezeigt werden. Ein positiver Einfluss auf postoperative Komplikationen wie das Auftreten von Schmerzen, Infertilität, Darmverschluss, sowie die Rehospitalisierung steht noch aus (Ahmad et al., 2008; Kumar et al., 2009). Allerdings sind diese Systeme auf das lokale Applikationsfeld begrenzt. Anwendung finden vor allem resorbierbare Gewebe oxidierte Zellulosefasern oder eine Kombination aus Hyaluronsäure und Carboxymethylcellulose (Kumar et al., 2009).

Vielversprechend erscheint der Ansatz, beide Strategien zu kombinieren (Hill-West et al., 1995; Yagmurlu et al., 2003; Yeo et al., 2007). So führte die Applikation einer bioabbaubaren Matrix, in die Streptokinase als Wirkstoff verkapselt wurde, im Rattenmodell zu einer Reduktion postoperativer Verwachsungen in 90 % der Tiere. Erklärbar ist dieser Erfolg durch den anti-adhäsiven Effekt der Matrix in Kombination mit einem kontinuierlichen Wirkspiegel an Streptokinase, wodurch ein niedriger pharmakologisch wirksamer Wirkspiegel über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten werden konnte (Yagmurlu et al., 2003). Ein ähnlicher Ansatzpunkt wurde durch den Einbau von rekombinatem tPA in ein *in situ* geformtes Gel auf Hyaluron-Basis verfolgt. Die Häufigkeit wiederkehrender Adhäsionen konnte durch Einsatz dieses Gels um 54 %, die betroffene Fläche um den Faktor 120 bis 150 gegenüber den Kontrollen (unbehandelt, mit isotonischer Salzlösung behandelt) reduziert werden (Yeo et al., 2007). Interessant ist in diesem Zusammenhang auch der Einsatz von *in situ* geformten Filmen auf PEG-Basis (SprayShield[®]) (Ferland et al., 2001). Das *in situ* polymerisierende Gel ist dabei durch Verwendung einer speziellen Technologie (CoSeal[™], Surgical Sealant, Confluent Surgical) auch labraskopisch applizierbar.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte in dieser Arbeit ein neuer Ansatz zur Verhinderung peritonealer Adhäsionen entwickelt werden, der pharmakologisch in die Entstehung der permanenten Adhäsion eingreift und darüber hinaus mechanisch eine anitadhäsiver Barriere darstellt. Dieser war aus folgenden Komponenten zusammengesetzt:

Wirkstoff	Marktprodukt	Referenz
<i>Fibrinolytika</i>		
Urokinase	rheotromb [®]	(Hellebrekers et al., 2000)
Streptokinase	Streptase [®] , Varidase [®] N	(Hellebrekers et al., 2000)
rekombinates tPA	Actilyse [®] , Rapilysin [®]	(Hellebrekers et al., 2000) (Sitter et al., 1999) (Binda et al., 2009)
<i>resorbierbares Gewebe</i>		
Zellulosefaser (oxidiert)	Interceed [®]	(Farquhar et al., 2000)
Hyaluronsäure/Carboxymethylcellulose	Seprafilm [®] , Sepracoat [™]	(Diamond, 1998) (Gago et al., 2003)
PEG	SprayGel [™]	(Mettler et al., 2003) (Dunn et al., 2001) (Fazio et al., 2006)
<i>nicht resorbierbares Gewebe</i>		
PTFE	Gore-Tex [®]	(Farquhar et al., 2000)

Tabelle 4.3: Pharmaka und Barriersysteme für die Prävention peritonealer Adhäsionen

- 1.) Wirkstoffkomponente 1 zur Erhöhung der tPA-Konzentration: Eine ausreichende Menge tPA im Peritoneum sollte durch ein für tPA kodierendes Plasmid sichergestellt werden (pCMV-tPA-IRES-Luc siehe 2.5.1).
- 2.) Wirkstoffkomponente 2 zur Reduktion der PAI-1-Konzentration: Eine siRNA gegen PAI-1 wurde zur Reduktion des Inhibitors eingesetzt. Durch den Kotransport von Wirkkomponente 1 und 2 sollte das Verhältnis zwischen tPA und PAI-1 auf die Seite des Aktivators verschoben werden.
- 3.) Formulierung: Beide Wirkstoffkomponenten sollten in einen bioabbaubaren, *in situ* gebildeten Film auf PLGA-Basis eingebaut werden, um eine kontrollierte Freisetzung der Wirkstoffkomponenten im Zeitfenster von 2-3 Wochen zu garantieren und zusätzlich als Adhäsionsbarriere zu fungieren. Durch die *in situ* Ausbildung des Films wäre eine labraskopische Anwendung denkbar.

4.5.2 Untersuchung der Transfektionseffizienz *in vitro*

Erste *in vitro* Freisetzungsprofile wurden bereits in Kapitel 4.4.2 mit Hilfe des Reportergens Luziferase bestimmt. Basierend auf diesen Daten und den Anforderungen an die Arzneiform wurde das Polymer Rhesomer[®] RG 504 H in Kombination mit DMI als Lösungsmittel für den Film ausgewählt. Beide Wirkkomponenten sollten in lyophilisierter Form in die hydrophile Phase der Matrix eingebaut werden, wobei aus den Vorversuchen mit einer initialen Wirkstofffreisetzung von 55 % zu rechnen war. Diese erscheint für den Einsatz im Bereich der postoperativen Adhäsionen durchaus sinnvoll, um die akute Phase nach der Operation (Tag 2-5) abzudecken (diZerega and Campeau, 2001; Harris et al., 1995; Menzies and Ellis, 1991), wobei eine unphysiologische Erhöhung der tPA-Konzentration aufgrund einer erhöhten Blutungsneigung im Peritoneum vermieden werden sollte. Alternativ wurde ein Film ohne initiale Freisetzung, aufgebaut aus Rhesomer[®] 504 H und Glycerolfomal, getestet. Auch hier wurden die Polyplexe in der hydrophilen Phase gelöst. Die Formulierungen wurden zunächst *in vitro* unter Verwendung der Wirkkomponente 1, die mit l-PEI komplexiert und unter Zusatz von 10 % Saccharose lyophilisiert wurde, untersucht. Als Kontrolle wurde in einer 1:1 Mischung zusätzlich das pMetLuc Plasmid, das für ein von der Zelle sezerniertes Luziferaseenzym kodiert, eingesetzt.

Für die *in vitro* Testung im Zellsay wurden Mesothelzellen (Met5A) auf Inserts angezchtet und der Polymerfilm anschließend auf die Zellschicht aufgesprüht. Die Verwendung der Inserts ermöglichte die Aufteilung der Wells in

ein Zweikammernsystem mit äußerem und innerem Kompartiment vergleichbar mit der Anatomie vor Ort im Peritoneum, zwischen denen ein ständiger Stoffaustausch möglich war und die Zellen somit von der apikalen und basolateralen Seite mit Medium versorgt werden konnten. Eine optische Kontrolle der Zellmorphologie erfolgte über Lichtmikroskopie, war allerdings durch den aufgespritzten Film erschwert. Die Expression des Reportergens Luziferase konnte durch Verwendung der Inserts in beiden Kompartimenten über einen Zeitraum von 30 Tagen untersucht werden.

Dargestellt ist in Abbildung 4.10 das obere Kompartiment. Im Vergleich zur Bolusgabe, bei der die gesamte Plasmid-DNA Dosis ohne Freisetzungssystem in Wasser für Injektionszwecke gegeben wurde, zeigten die *in situ* gebildeten Filme einen um den Faktor 10^3 bis 10^4 geringeren Spiegel an Luziferase. Der Verlauf der Genexpression erfolgte analog Kapitel 4.4.2. In diesen Studien zur Freisetzungskinetik hatten Filme auf DMI-Basis eine initiale Freisetzung von 56 % der eingesetzten pDNA Menge und im weiteren Verlauf eine Freisetzung von weiteren 38 % bis Tag 26 gezeigt. Diesem Freisetzungsprofil folgend wurde für den Film auf DMI-Basis eine erhöhte Genexpression bereits nach 2 Tagen beobachtet, die nach weiteren 7 Tagen auf Basalwerte abfiel und bis zum Tag 23 erneut auf moderate Werte anstieg. Im Gegensatz dazu verlief die Genexpression bei Verwendung von Glycerolformal als Lösungsmittel zweiphasig ohne initiale Freisetzung der Polyplexe analog Kapitel 4.4.2. Nach einem ersten moderaten Anstieg der Expressionsrate innerhalb der ersten 10 Tage konnte ein weiteres Maximum mit einer 2-fach gesteigerten Genexpression nach 23 Tagen detektiert werden. Niedermolekulare Fragmente im Zellkulturmedium deuteten auf eine beginnende Erosion hin.

Die tPA-Expression aus einer Matrix bestehend aus Glycerolformal und Rhesomer[®] RG 504 H ist im Vergleich zur Einmalgabe und dem Film ohne eingebetteter Wirkstoffkomponente (inaktiver Film) in Abbildung 4.11 dargestellt. Für die Einmalgabe ergaben sich über den Zeitraum von 29 Tagen analog zur Luziferaseexpression sehr hohe Proteinspiegel, wobei eine 100 bis 40-fache Zunahme der tPA-Konzentration gegenüber den Basalwerten erzielt werden konnte. Ähnliche Konzentration wurden nach i.p. Gabe von rekombinantem tPA-Protein (Alteplase) im Plasma erreicht (Hellebrekers et al., 2009). Die Werte, die mit Hilfe der Matrixformulierung erzielt werden konnten, erscheinen daher weit näher an den physiologischen Bedingungen. Für Plasma und Peritonealflüssigkeit sind freie tPA-Antigen-Konzentrationen von 4 bis 6 ng/ml beschrieben (Hellebrekers et al., 2009; Ince et al., 2002; Wiman, 1998), wobei zusätzlich im Durchschnitt 1,3 ng/ml tPA an PAI-1 gebunden vorliegen (Wiman, 1998). Erstaunlich ist, dass schon durch des inaktiven

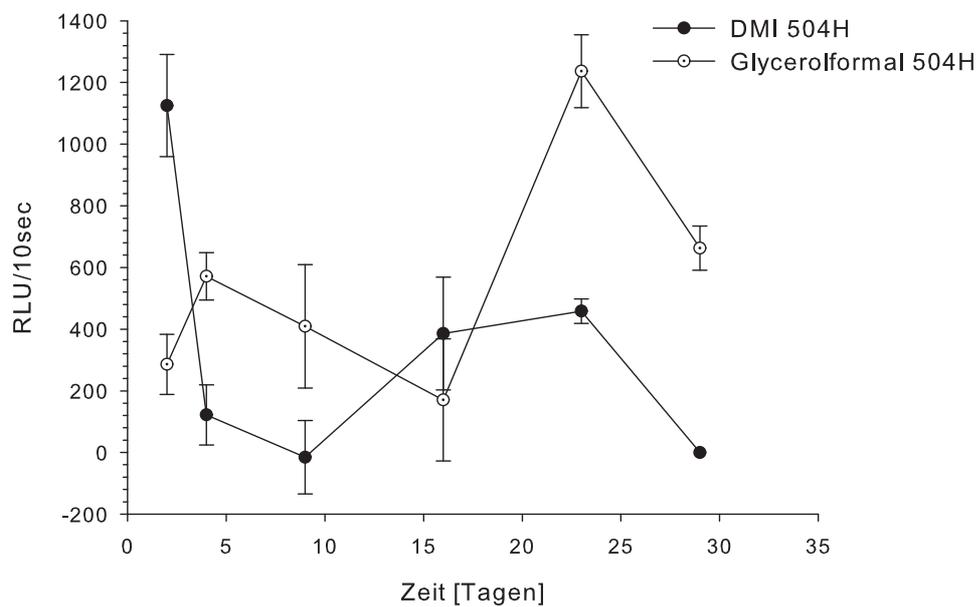
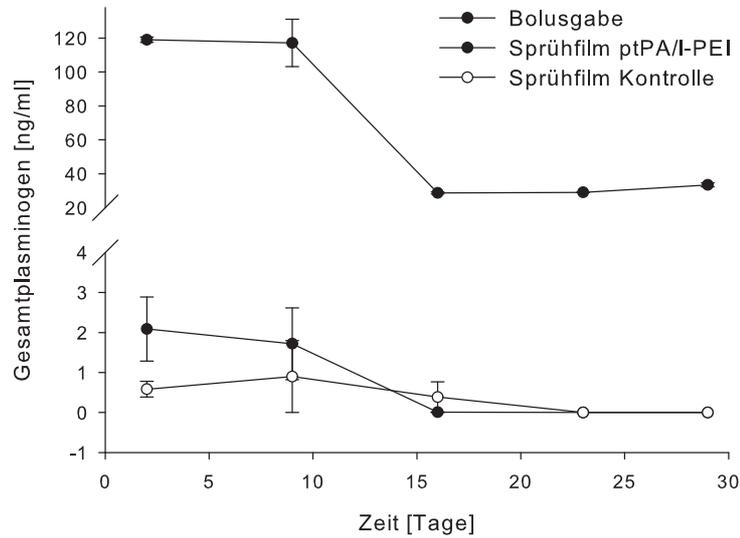
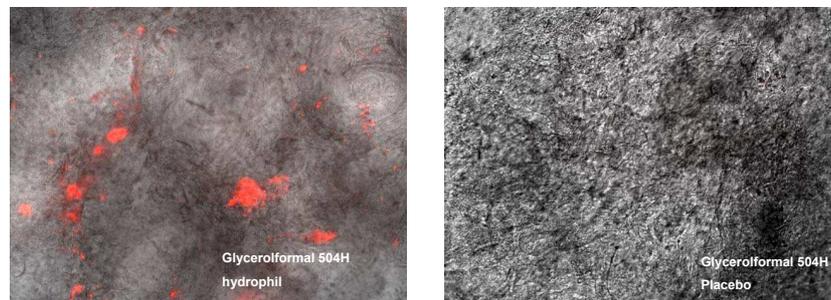


Abbildung 4.10: *In vitro* Applikation der Filme auf Mesothelzellen: Luziferase Genexpression nach Applikation Rhesomer[®] RG 504 H basierter Filme auf Mesothelzellen. Plasmid DNA /l-PEI Polyplexe wurden in die hydrophile Phase eingebaut und die Expression über einen Zeitraum von 29 Tagen mittels Luziferaseassay untersucht. Gemessen wurden die emittierten Photonen RLU über 10 s nach Hintergrundkorrektur. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM ($n=3$) angegeben.

Films die Werte leicht zunahmen, wobei zu Beginn der Freisetzung eine 4-fache Steigerung durch den aktiven Film (mit eingebetteter Wirkstoffkomponente) im Vergleich zum inaktiven erzielt werden konnte. Der Effekt nivellierte sich bis zum Tag 16 und die tPA-Spiegel sanken mit 2 ng/ml auf Basalwerte ab. Dies ist vermutlich dadurch bedingt, dass bis zum Tag 15 kaum mehr Polyplexe aus der Matrix freigesetzt werden konnten (siehe Kapitel 4.4.2). Zu Versuchende war diese nicht komplett erodiert, so dass eingebettete Polyplexe im Sprühfilm nachgewiesen werden konnten (Abb. 4.11 (c)).

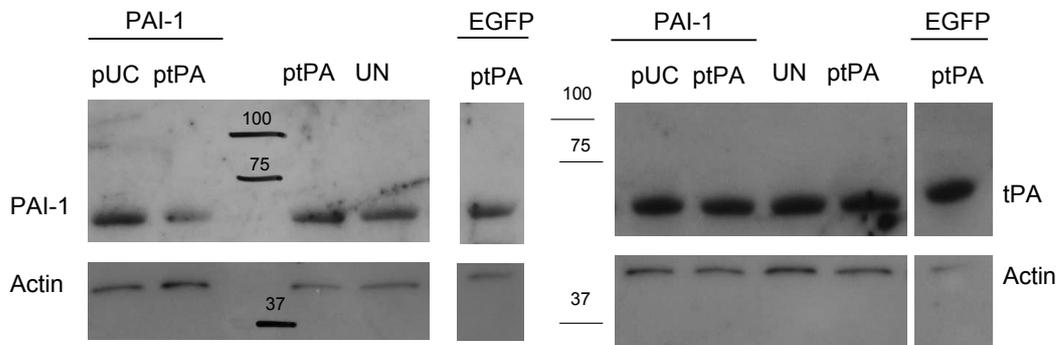
4.5.3 Erhöhung der Gewebeplasminogen-Konzentration durch Koapplikation von siRNA und pDNA

Die Steigerung der extrazellulären tPA-Konzentration durch Applikation eines für tPA kodierenden Plasmids konnte in Kapitel 4.5.2 auf Mesothelzellen erfolgreich gezeigt werden. Inwiefern eine Zunahme des tPA/PAI-1-Verhältnisses durch gleichzeitige Applikation einer siRNA gegen PAI-1 erzielt werden kann, sollte im Folgenden untersucht werden. Frühere Studien hatten gezeigt, dass l-PEI vor allem für die *in vivo* Applikation von siRNA und Plasmid-DNA gut geeignet ist (Bonnet et al., 2008). Daher wurden pDNA/siRNA/l-PEI Polyplexe bei einem *N/P*-Verhältnis von 10 (bezogen auf die pDNA-Konzentration) in HBS hergestellt und unterschiedliche siRNA Sequenzen gegen PAI-1 (siehe Kapitel 2.5.2) getestet. Das tPA/PAI-1-Verhältnis bei Applikation unterschiedlicher pDNA/siRNA Kombinationen ist in Abbildung 4.12 dargestellt. Verwendet wurde die siRNA Sequenz, welche die PAI-1 Expression in Vorversuchen am effizientesten inhibierte (PAI-1 A), bei einer optimierten Konzentration von $0,12 \mu\text{M}$. 48h nach der Transfektion stieg das tPA/PAI-1-Verhältnis bei Koapplikation gegenüber unbehandelten Zellen auf das 8-fache an, wobei durch Applikation von pDNA alleine oder in Kombination mit einer nicht funktionellen siRNA (EGFP siRNA) lediglich eine Steigerung um das 4- beziehungsweise 5-fache erzielt werden konnte. Unter Verwendung eines Platzhalter-Plasmids (pUC) zeigte sich, dass die siRNA eine Erhöhung des tPA/PAI-1-Verhältnisses um den Faktor 2 bewirkte.

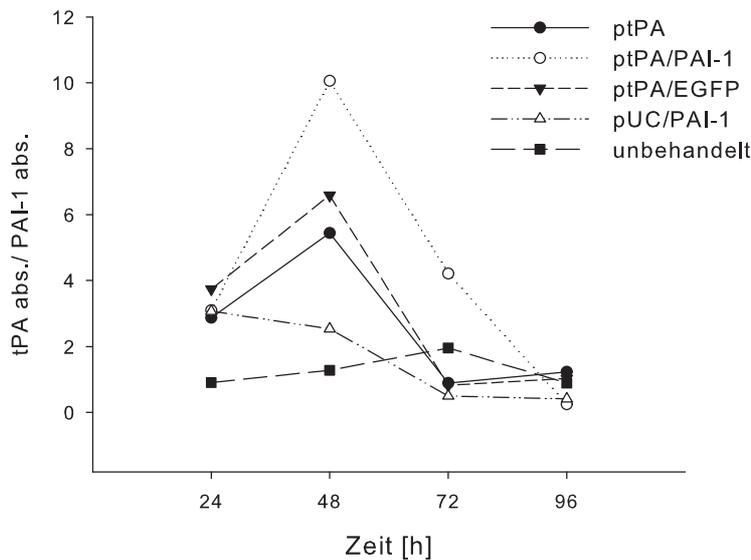
(a) Matrixfreisetzung aus *in situ* gebildeten Filmen

(b) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Anfärbung mit Propidiumiodid

Abbildung 4.11: *In vitro* Applikation der Filme auf Mesothelzellen. (a) Matrixfreisetzung aus Rhesomer[®] RG 504H basierenden Filmen und (b) Fluoreszenzaufnahme der eingebetteten Plasmid-DNA. pCMV-tPA-IRES-Luc/l-PEI Polyplexe wurden in der hydrophilen Phase gelöst, der Sprühfilm auf Mesothelzellen aufgesprüht und der tPA-Spiegel über einen Zeitraum von 29 Tagen mittel ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM ($n=3$) angegeben.



(a) PAI-1 und tPA Detektion im Western Blot nach 48 h



(b) tPA/PAI-1-Verhältnis in Abhängigkeit der Zeit

Abbildung 4.12: Kotretransfektion von Plasmid-DNA/siRNA auf Mesothelzellen. Die Polyplexe bestehend aus pCMV-tPA-IRES-Luc (ptPA) oder einem Platzhalter-Plasmid (pUC) und verschiedenen siRNAs (PAI-1, EGFP) wurden mit L-PEI bei einem N/P-Verhältnis von 10 (bezogen auf die pDNA Menge) in HBS hergestellt. Zum Vergleich ist die Expression unbehandelter Zellen (UN) dargestellt. Die Bestimmung der tPA- und PAI-1-Spiegel erfolgte mittels Western Blot im Überstand zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

4.6 Diskussion

Die Entwicklung eines *in situ* gebildeten Films zur kontrollierten Freisetzung von Polyplexen erfolgte auf Basis eines Applikationssystems der Firma Baxter. Das Zweispritzensystem wurde dazu mit einer lipophilen Komponente (Spritze 1), bestehend aus einem bioabbaubaren Polymer gelöst in einem organischen Lösungsmittel, und einer wässrigen Komponente (Spritze 2), Wasser für Injektionszwecke, beladen. Als Wirkstoffkomponente wurden lyophilisierte pDNA/l-PEI Polyplexe eingesetzt. Diese konnten anschließend in der lipophilen Phase dispergiert oder in der hydrophilen Phase gelöst werden. Beide Einbettungsvarianten wurden im Hinblick auf die Freisetzungskinetik untersucht.

Für die Auswahl des geeigneten Lösungsmittels waren die i) pharmazeutische Anwendbarkeit, ii) eine gute Gewebeverträglichkeit, iii) die Wassermischbarkeit und iv) die Löslichkeit des Polymers im Lösungsmittel entscheidend. Die Löslichkeit der Polymere im eingesetzten Lösungsmittel sollte für *in situ* geformte Implantate mindestens 10-20 % (m/v) betragen, um eine ausreichende Implantatbildung zu erzielen (Matschke et al., 2002). Dies war für alle getesteten Polymere der Fall. Erste Formulierungs- und Löslichkeitsversuche mit dem Modellpolymer Rhesomer[®] RG 503 H zeigten allerdings in Abhängigkeit von der Wassermischbarkeit des Lösungsmittels enorme Unterschiede hinsichtlich der Homogenität, der Matrixgüte (Einbau der Polymere in die Matrix) und dem Einbau der wässrigen Phase in die Matrix. Mit steigender Wasserlöslichkeit nahmen dabei die Festigkeit der Matrix, die Matrixgüte, sowie der Einbau der wässrigen Phase ab. Unter Verwendung von Lösungsmitteln mit einem P-Wert $\leq 0,25$ konnte circa 80 % der eingesetzten Polymermenge in die Matrix eingebaut werden. Zu diesen Lösungsmitteln zählten Tetraglykol, Glycerolformal und DMI, die für die Anwendung weiter charakterisiert wurden.

Glycerolformal zeigte im Zellviabilitätstest die beste Verträglichkeit auf Mesothelzellen, wobei 200 beziehungsweise 400-fach höhere LD₅₀-Werte gegenüber DMI und Tetraglykol gemessen wurden. Diese lagen unter 6 h Inkubationszeit bei circa 1 g/ml, das heißt bei einer Applikation von circa 780 μ l reinem Glycerolformal sterben 50 % der Mesothelzellen ab. Literaturdaten geben nach i.v. Gabe in Nagern für DMI und Glycerolformal vergleichbare LD₅₀-Werte an, wohingegen Tetraglykol um den Faktor 2-3 toxischer ist. Den Herstellerangaben zu Ivomec[®], einem Tierarzneimittel gegen Parasiten, ist eine LD₅₀ von 4-4,8 g/kg Körpergewicht (Maus) bei i.v. Applikation einer 50 %igen Glycerolformal-Lösung zu entnehmen. Ähnliches

beschreibt die EMA in einem Abschlussbericht des Komitees für Veterinärprodukte (Committee for veterinary medicinal products, 1996). Die akute Toxizität nach i.v. Gabe von DMI unterscheidet sich von Glycerolformal nur kaum. Mit einer LD50 von 5,4 g/kg Körpergewicht (Ratte) bei Applikation von 40 % DMI in isotonischer Kochsalzlösung (v/v) und einer LD50 von 6,9 g/kg Körpergewicht (Maus) bei Applikation einer 20 %igen Lösung scheint DMI nach i.v. Gabe noch besser verträglich. Tetraglykol wird als Lösungsmittel für Parenteralia (i.v., i.m.) bereits seit den 60er Jahren in Konzentrationen bis 50 % (v/v) verwendet und ist in dieser Verdünnung als nicht reizend eingestuft. Die LD50 nach i.v. Gabe ohne Verdünnung liegt mit 3,8 g/kg Körpergewicht (Maus) niedriger als für die beiden anderen Lösungsmittel beschrieben (Spiegel and Noseworthy, 1963).

An die eingesetzten Biomaterialien wurden ebenfalls große Anforderungen gestellt. Neben einer guten parenteralen Verträglichkeit (biokompatibel und bioabbaubar) mussten diese sterilisierbar und eine kontrollierte Freisetzung in einem Zeitraum von 2-3 Wochen ermöglichen. Als Matrixbildner wurden Copolymere bestehend aus Milchsäure und Glykolsäure, PLGA Polymere, verwendet. Diese sind bereits für die parenterale Applikation zugelassen und ermöglichen eine Einstellung der Abbaurate über die Polymerzusammensetzung und die verwendete Molekülmasse. Allerdings spielt hier das verwendete Lösungsmittel und die Technologie eine ebenfalls entscheidende Rolle.

Getestet wurden Polymere mit einer Zusammensetzung PLA/PGA von 50:50 (freie Säuregruppen, H-Serie) und von 75:25 (veresterte Endgruppen, S-Serie). Es konnte unabhängig von der verwendeten Serie gezeigt werden, dass je größer die Molekülmasse des eingesetzten Polymers war, desto effizienter fand der Einbau der Polymere in der Matrix statt und desto besser fiel die Matrixgüte aus. Ferner waren die Einbauraten stark von der Löslichkeit der Polymere im verwendeten Lösungsmittel abhängig, so dass durch eine geringere Löslichkeit der Polymere im Lösungsmittel kombiniert mit einer guten Wassermischbarkeit des Lösungsmittels eine bessere Matrixgüte erzielt werden konnte. Ein Grund hierfür war eine schnellere Phasen-Separation während der Präzipitation. So zeigten längerkettige Polymere sowie Polymere mit veresterten Endgruppen generell eine verbesserte Matrixgüte. Ein 100 %iger Einbau der eingesetzten Polymermenge wurde unter Verwendung von Glycerolformal, dem hydrophileren der getesteten Lösungsmittel, in Kombination mit Rhesomer RG[®] 755 S (PLA:PGA 50:50, veresterte Endgruppe) erreicht.

Studien zum viskoelastischen Verhalten zeigten deutliche Unterschiede zwischen den Polymeren innerhalb der H-Serie, wobei das Verhalten von der

Kettenlänge des Polymers und dem verwendeten Lösungsmittel beeinflusst wurde. Während das längerkettige Polymer, Rhesomer[®] RG 504 H, unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel Filme mit einer mechanischen Festigkeit vergleichbar einer Muskelfaser lieferte und sich rheologisch wie ein Festkörper verhielt, lies sich die Festigkeit der auf Rhesomer[®] RG 502 H, dem kurzkettigen Polymer, basierenden Filmen durch die Wahl des Lösungsmittels einstellen und variierte zwischen 130 Pa und 3,7 kPa. Alle Filme auf Basis des kurzkettigen Polymers waren hingegen viskos dominiert, wobei eine dem längerkettigen Polymer vergleichbare Festigkeiten lediglich unter Einsatz von Tetraglykol erreicht werden konnte. Eine Erklärung für das unterschiedliche rheologische Verhalten beider Polymere lieferte die Kettenlängen. Die Polymerketten des 504 H-Polymers sind aufgrund der Kettenlänge nicht in der Lage, in der ausgebildeten Matrix aneinander vorbei zu gleiten. Dementsprechend bilden sie ein sehr dichtes Netzwerk aus (engl. *Non Entangled Network*), in dem Lösungsmittelleffekte keine Rolle spielen. Anders sieht es im Falle des kurzkettigen Rhesomer[®] RG 502 H aus. Die Filme sind wesentlich dünner und die Polymerketten sind nach der Filmbildung so beweglich, dass Lösungsmittelleffekte bei Krafteinwirkung zum Tragen kommen.

Die weitere Formulierungsentwicklung erfolgte unter Einsatz der Rhesomer[®] RG H-Serie, da mit den freien Säuregruppen kürzere Abbauzeiten zu erwarten waren, wobei das kurzkettige 502 H-Polymer und das langkettige 504 H-Polymer im Vergleich untersucht wurden. Die lipophile Komponente bestand aus einer 10 %igen (m/v) PLGA-Lösung in Glycerolfomal, Tetraglykol oder DMI, als hydrophile Komponente wurde Wasser für Injektionszwecke verwendet. Die Wirkstoffkomponente, pDNA/l-PEI Polyplexe, wurde als Lyophilisat in der hydrophilen Phase gelöst (Einbettungsvariante A) oder mittels Homogenisator in der lipophilen PLGA-Lösung dispergiert (Einbettungsvariante B). Für die Herstellung der lyophilisierten Polyplexe erwies sich Saccharose mit einer Konzentration von 10 % (m/v) als geeigneter Kryoprotektor. Eine anschließende Homogenisierung der Polyplexe mittels Mörser und Pistill hatte keine Auswirkung auf die DNA-Integrität und die Gentransfereffizienz, obwohl eine Verdopplung der Partikelgröße beobachtet werden konnte. Wurden die pulverförmigen Komplexe in der PLGA-Lösung dispergiert, so erwies sich der Homogenisator als schonendste Dispergierungsmethode. Die Freisetzungskinetik aus der gebildeten Matrix wurde anschließend *in vitro* zuerst in Petrischalen, später im Zellassay untersucht.

Für die Freisetzung von Wirkstoffen aus bulkerodierenden Polymermatrices wie den PLGA-Systemen werden in Abhängigkeit der Wirkstoffbeladung, der Molekülmasse des verwendeten Polymers sowie der Polymerkonzentration

on ein- oder zweiphasige Freigabepprofile beschrieben (Goepferich et al., 1995; Ramchandani and Robinson, 1998). Nach einer initialen Freisetzung bis zur vollständigen Präzipitation des Polymers erfolgt die Freisetzung diffusionskontrolliert durch wassergefüllte Poren innerhalb der Matrix (konkaves Freisetzungsprofil, Phase 1), wobei je nach Porosität der Matrix und Molekülmasse des Wirkstoffes die Freisetzung in dieser Phase verlangsamt sein kann. Diese wird dabei im Wesentlichen durch die Wassermischbarkeit des eingesetzten Lösungsmittel beeinflusst, da das Lösungsmittel während der Präzipitation des Polymers aus der Matrix diffundiert und es durch Eindringen von Wasser in die Matrix zur Ausbildung wassergefüllter Poren kommt. In diesem Zusammenhang kann durch eine gute Wassermischbarkeit des eingesetzten Lösungsmittels eine schnelle Phasen-Separation erzielt werden, was eine Matrix mit hoher Porosität und geringer initialer Freisetzung des Wirkstoffes aus der Matrix („Burst-Effekt“) zur Folge hat. Allerdings führt die hohe Porosität der Matrix gleichzeitig zu einer beschleunigten Wirkstofffreisetzung, die mit einsetzender Erosion der Matrix durch sich ausbildenden Porenvolumina weiter beschleunigt wird und einer Kinetik 0. Ordnung folgt (Brodbeck et al., 1999; Graham et al., 1999; Lambert and Peck, 1995). Die Kinetik der Freisetzung wird ferner durch die Einbettung des Wirkstoffes in die Matrix beeinflusst, der sowohl gelöst als auch suspendiert in der Matrix vorliegen kann (Leuneberger, 2002).

In situ geformte PLGA-Filme auf Tetraglykol-Basis (10 % (m/m) PLGA-Lösung) wurden bereits von Eliaz und Kollegen für die Freisetzung von Proteinen (Eliaz and Kost, 2000; Eliaz et al., 2000) und Nukleinsäuren untersucht (Eliaz and Szoka, 2002), wobei die Plasmid-DNA in „nackter“ Form ohne vorherige Komplexierung ins Implantat eingebaut wurde. Mit dem kürzerkettigen Polymerkonnte in diesen Studien eine einphasige Freisetzungskinetik über 20 Tage beobachtet werden, wohingegen mit dem längerkettigen Polymer ein zweistufiger Freisetzungsmechanismus über 60 Tage erzielt werden konnte, der in den ersten 25 Tagen diffusions-, später erosionskontrolliert erfolgte (Eliaz and Szoka, 2002). Die subkutane Applikation der Depotssysteme führte zu einem 10-fach höheren Plasmaspiegel verglichen mit der Einmalgabe „nackter“ Plasmid-DNA im selben Lösungsmittel über 14 Tage. Darüber hinaus wurden physiologisch sichtbare Effekte lokal erzielt. So kam es in einem Zeitraum von 14 bis 62 Tagen nach lokaler Applikation des Depot-systems durch den eingebetteten Wirkstoff bedingt zur Ausbildung kleiner Blutgefäßen im Umkreis des Implantates. Die Verträglichkeit war ebenfalls sehr gut, so dass lediglich eine moderate Fremdkörperreaktion beobachtet wurde (Eliaz and Szoka, 2002).

In den *in vitro* Sprühversuchen führte die Einbettungsvariante B, bei der die Polyplexe in der PLGA-Lösung dispergiert wurden, generell zu einer stärkeren Retardierung bei geringerem initialen Wirkstoffverlust, als es bei Einbettungsvariante A beobachtet wurde. Den größten Einfluss auf die Freisetzungskinetik hatten allerdings die eingesetzten Lösungsmittel. So nahmen die Freisetzungsraten für Einbettungsvariante B in der Reihenfolge Tetraglykol \ll Glycerolformal $<$ DMI zu, wobei die mechanische Festigkeit der Filme in gleicher Reihenfolge abnahm. So führten Filme auf Basis von DMI zu einer Freisetzung von mindestens 40 % der eingesetzten Polyplexe bei starkem Bursteffekt. Für die Kombination Rhesomer[®] RG 504 H mit DMI konnte ferner eine zweiphasige Freisetzungskinetik mit einer 100 %igen Freisetzung über 29 Tage erzielt werden. Filme auf Basis von Glycerolformal hingegen zeigten unabhängig vom Einbettungsverfahren eine geringe bis keine initiale Freisetzung, allerdings konnte mit diesem System nur maximal ein Fünftel des eingebetteten Wirkstoffes über den beobachteten Zeitraum freigesetzt werden. Auch in diesem Fall wurden zweiphasige Freisetzungsvläufe beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigten Filme auf Basis von Tetraglykol bei hoher initialer Freisetzung für Einbettungsvariante A ($> 30\%$) und ohne initialen Wirkstoffverlust (0 %) für Einbettungsvariante B eine extrem retardierte Freisetzung von $<10\%$ über 29 Tage, die erst nach 13 Tagen mit der beginnenden Erosion der Matrix einsetzte.

Erklärbar sind die unterschiedlichen Freisetzungskinetiken durch die Wassermischbarkeit der verwendeten Lösungsmittel in Kombination mit der Löslichkeit des Polymers im Lösungsmittel selbst. Beide Parameter bestimmen im Wesentlichen die Geschwindigkeit der Matrixbildung (Shively et al., 1995), die umso schneller erfolgt je besser die Wassermischbarkeit und je geringer die Löslichkeit der Polymere im Lösungsmittel ist. Eine hohe Matrixgüte ist die Folge. DMI zeigte eine relativ gute Löslichkeit der Polymere bei moderater Wassermischbarkeit. In Kombination mit dem kurzkettigen Polymer führte dies zu einer derartig langsamen Ausbildung des Films, dass die Polyplexe, die in der wässrigen Phase gelöst waren, nicht in die Matrix eingebettet werden konnten. Eine Erhöhung der Molekülmasse des Polymers und die Dispergierung der Polyplexe in der lipophilen Phase (Einbettungsvariante B) verbesserten infolgedessen die Wirkstoffeinbettung (Shively et al., 1995). Im Falle von Tetraglykol, dem lipophilsten der getesteten Lösungsmittel, erfolgte die Phasen-Separation derartig langsam, so dass es zu einem hohen initialen Wirkstoffverlust kam, wenn der Wirkstoff bereits in der wässrigen Phase gelöst vorlag. Wurde der Wirkstoff allerdings in der lipophilen Phase dispergiert, so konnte ein initialer Verlust des Wirkstoffes komplett vermieden werden. Darüber hinaus war die Porosität der Matrix derartig gering, dass die

Freisetzung ausschließlich erosionskontrolliert erfolgte und daher erst nach 17 Tagen einsetzte. Glycerolformal zeigte aufgrund guter Wasserlöslichkeit und schlechter Löslichkeit der Polymere eine schnelle Matrixbildung ohne initialen Verlust und langsamer Freisetzungskinetik.

Darüber hinaus spielt die Schichtdicke der Sprühfilme für die Diffusionsgeschwindigkeit des Wassers eine wesentliche Rolle. So konnte für PLGA-Systeme mit einer Schichtdicke von 150-300 μm , bei denen die Diffusionsgeschwindigkeit des Wassers eingeschränkt ist, zusätzlich eine Oberflächenerosion nachgewiesen werden. Unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel wurden für Filme auf Basis von Rhesomer[®] RG 502 H Schichtdicken von circa 300 μm während der viskoelastischen Untersuchungen gemessen. Im Gegensatz dazu nahm die Schichtdicke der Filme für das längerkettige Polymer analog zur beobachteten Freisetzungskinetik von DMI über Glycerolformal zu Tetraglykol hin zu.

Ein therapeutisches Einsatzgebiet für derartige Matrixsysteme stellen postoperative Adhäsionen dar, bei denen es nach Operationen im Bauchraum, ausgelöst durch ein Ungleichgewicht zwischen dem gewebespezifischen Plasminogenaktivator und dessen Inhibitor, zu permanenten Verwachsungen kommt (Hellebrekers et al., 2000; Rout et al., 2005; Treutner and Schumpeick, 2000). Kritisch ist dabei ein Zeitfenster von 2 Wochen, das eine akute Phase von 2-5 Tagen nach der Operation umfasst. Aufbauend auf der vorhergehenden Charakterisierung der Filme wurde der Einbau eines für tPA kodierenden Plasmids als Wirkkomponente in das Depotsystem untersucht. Neben der pharmakologischen Wirkkomponente sollte der Polymerfilm zusätzlich eine anitadhäsiver Barriere gegen Verwachsungen darstellen. Ähnliche Ansätze wurden bereits mit Streptokinase (Yagmurlu et al., 2003) und rekombinatem tPA Protein als Wirkkomponenten beschrieben (Hill-West et al., 1995; Yeo et al., 2007). Auf dem Gebiet der nicht-viralen Gentherapie wurde dieser Ansatz bisher nicht verfolgt.

In vitro Versuche auf Mesothelzellen ergaben Expressionsraten auf niedrigem Niveau, wobei die Matrix der getesteten Filme noch langsamer erodierte als im Vorversuch beobachtet, womöglich aufgrund des geringen Volumens an Akzeptormedium. Eine kontinuierliche Freisetzung bei geringem initialen Verlust konnte aus einer Matrix auf Basis von Glycerolformal mit Rhesomer[®] RG 504 H erzielt werden. Mit Hilfe des Depotsystems wurde ein tPA-Spiegel von 2 ng/ml über mindestens 10 Tage aufrecht erhalten, der am Tag 16 auf Basalwerte unter 1 ng/ml abfiel und einer 4-fachen Steigerung gegenüber dem unbeladenen Implantat entsprach. Die Bolusgabe führte hingegen zu unphy-

siologischen tPA-Spiegeln von 100 ng/ml, wobei Normalwerte im Peritoneum bei $5,7 \pm 2,6$ ng/g Gewebe liegen. Im entzündeten Gewebe sinkt die Konzentration auf $1,2 \pm 0,9$ ng/g Gewebe ab. Ähnliche Spiegel können im Plasma gemessen werden (Hellebrekers et al., 2009; Ince et al., 2002; Wiman, 1998). Daher ist davon auszugehen, dass derartig hohe Wirkspiegel, wie sie nach einer Bolusgabe erreicht wurden, zu schwerwiegenden Komplikationen wie einer erhöhten Blutungsneigung führen könnten und daher vermieden werden sollten.

Im Gegensatz zum tPA-Spiegel ist der PAI-1-Spiegel im entzündeten Gewebe mit $27,3 \pm 9,7$ ng/g Gewebe gegenüber dem Normalzustand von $1,6 \pm 0,2$ ng/g Gewebe deutlich erhöht (Hellebrekers et al., 2009; Ince et al., 2002; Wiman, 1998). Das Verhältnis von tPA/PAI-1 variiert damit von 3,5 im Normalzustand bis zu 0,4 im entzündeten Gewebe. Eine stärkere Beeinflussung des tPA/PAI-1-Gleichgewichts ist somit durch Beeinflussung beider Proteine zu erwarten. Die Kotransfektion eines für tPA kodierenden Plasmids und einer siRNA gegen PAI-1 zeigte nach 48 h eine 8,3-fache Steigerung gegenüber unbehandelten Zellen, wohingegen die Applikation der Plasmid-DNA alleine lediglich zu einer 4,5-fachen Steigerung führte. Inwiefern die Steigerung des tPA/PAI-1-Gleichgewichts therapeutische Relevanz hat, bleibt abzuwarten. Erste Hinweise hierfür werden sich aus der Anwendung im Tiermodell ergeben. Der Therapieansatz selbst ist neuartig und könnte in Kombination mit den Filmen zu einer deutlichen Reduktion postoperativer Adhäsionen beitragen.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Die Gentherapie birgt vielversprechendes Potential als Kausaltherapie für die Behandlung zahlreicher erworbener oder vererbter Krankheiten wie in der Therapie der Zystischen Fibrose, als gentherapeutische Impfstoffe oder in der Onkologie. Lange Zeit dominierten virale Systeme klinische Studien auf dem Gebiet der Gentherapie, da diese zu hohen Genexpressionsraten führten. Schwerwiegende Nebenwirkungen bewirkten einen leichten Rückgang viraler Systeme in den letzten Jahren und führten zu einer Zunahme nicht-viraler Systeme. Diese zeichnen sich durch eine i) große Variationsmöglichkeit im Vektordesign, ii) geringe Integrationsgefahr ins Genom, iii) hohe Verpackungsmöglichkeit und iv) geringe Immunogenität aus.

Die Herausforderungen an die Trägersysteme für den nicht-viralen Gentransfer sind groß. Trotz der Vielfalt an Technologien konnte in den letzten 15 Jahren kein Vehikel gefunden werden, das allen Anforderungen entspricht. Die größte Herausforderung für eine erfolgreiche therapeutische Anwendung ist der Transfer in die Zielzelle. Nukleinsäuren als neue Arzneistoffe sind sehr vielfältig einsetzbar, setzten allerdings einen erfolgreichen Transport zum Wirkort, den Zellkern oder das Zytoplasma, voraus. Trägersysteme auf Polymer-Basis wie das Polyethylenimin (PEI) oder Poly(dimethyl-aminoethylmethacrylate) (P(DMAEMA)) sind in der Lage Nukleinsäure zu nanoskaligen Vehikeln zu komplexieren und zeigten bislang gute *in vitro* Ergebnisse (Demeneix and Behr, 2005; Dubruel and Schacht, 2006; Lungwitz et al., 2005). *In vivo* Anwendungen sind aufgrund i) geringer Biokompatibilität, ii) niedriger kolloidaler Stabilität in physiologisch relevanten Medien, iii) schneller Clearance durch Interaktionen mit Blutbestandteilen nach systemischer Applikation und iv) geringer Transfektionseffizienz und Dauer allerdings noch limitiert. Hierbei ist die Lunge als lokal erreichbares Target und im Hinblick auf Krankheiten wie die Zystische Fibrose, Asthma oder Lungentumore, die

bis heute nicht effektiv behandelt werden können, ein wichtiges Zielorgan.

Gegenstand des ersten Teils dieser Arbeit war die Entwicklung eines effizienten polymeren Trägersystems für den nicht-viralen Gentransfer. Untersucht wurden chimäre bioabbaubare Polymer-Polypeptid Konjugate auf Methacrylat-Basis mit unterschiedlichem PEGylierungsgrad, sogenannte P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Copolymere. Eine zusammenfassende Beurteilung der Copolymere im Vergleich zu standardmäßig eingesetzten Polymeren wie dem br-PEI und P(DMAEMA) liefert Tabelle 5.1. Die Copolymere konnten mittels ATRP nach den Anforderungen des Anwenders synthetisiert werden, wobei der PEGylierungsgrad über i) den F_{OEGMA} -Anteil im Copolymer und ii) den Oligomerisierungsgrad im OEGMA-Monomer variabel eingestellt werden konnte. Eine maßgeschneiderte Anpassung des Trägersystems an den eingesetzten Nukleinsäuretyp und an die Partikelcharakteristika wurde dadurch ermöglicht.

	P(DMAEMA- <i>co</i> -OEGMA)	P(DMAEMA)	br-PEI/1-PEI
Synthese	++	+/-	+/-
Komplexierung	+/-	+	+
Nanoskalige Partikel	+	-	+/-
Kolloidale Stabilität	++	-	+/-
Toxizität	++	-	-
Transfektionseffizienz	+/-	+/-	+
Zellbindung	+/-	+	+
Internalisierung	+	+	+
Endosomale Freisetzung	-	+	+

Tabelle 5.1: Beurteilung der P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Copolymere als nicht-virale Gentransfervehikel im Vergleich zu den Standardpolymeren br-PEI und P(DMAEMA), ++ Herausragend, + Gut, +/- Durchschnittlich, - Problematisch

Die physikochemische Charakterisierung der Polyplexe mit unterschiedlichen Nukleinsäuren (pDNA, mRNA) zeigte, dass bereits mit geringen PEGylierungsgraden eine ausreichende Stabilität der Polyplexe in physiologisch relevanten Medien (pH-Wert, Salzkonzentration) bei geringer Zytotoxizität erreicht werden konnte. Beide Parameter sind eine entscheidende Voraussetzung im Hinblick auf die spätere *in vivo* Applikation. Zeta-Potentialmessungen verdeutlichten eine „Core-Shell-Corona“-ähnliche Partikelstruktur, bei der der Kern bestehend aus pDNA und kationischem Polymeranteil

von einer OEG-Schale umhüllt war (Kataoka et al., 2001). Durch die Einführung ungeladener hydrophiler OEG-Segmente kam es zur Abschirmung der positiven Ladungsdichte im Kern, die zur sterischen Stabilisierung des Systems und zur guten Biokompatibilität der Polymere beitrug (Merdan et al., 2002a). Ferner variierte die Bindungsstärke und Morphologie der Polyplexe in Abhängigkeit der verwendeten Nukleinsäure. Während die Bindungsaffinität der Copolymere zur pDNA mit steigender PEGylierung abnahm, wurde die Bildung monodisperser Nanopartikel mit mRNA durch die Einführung von OEG-Einheiten begünstigt. Unterschiede in Partikelgröße und Morphologie der Polyplexe in Abhängigkeit vom verwendeten Nukleinsäuretyp und PEGylierungsgrad des Trägersystems konnten im Rasterkraftmikroskop und in elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigt werden. So führten Polyplexe basierend auf Plasmid-DNA zu irregulär ellipsoid geformten Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 100 nm, mRNA-Polyplexe zeigten hingegen eine kompakte sphärische Form mit einem Durchmesser von lediglich 40 nm. Bei höheren PEGylierungsgraden führte die sterische Abschirmung der kationischen Ladung im Polymer zu einem Verlust der Komplexierungseigenschaften der Copolymere, so dass die kompakte Form der Polyplexe verloren ging und unkomplexierte Plasmid-DNA im elektronenmikroskopischen Bild erkennbar war. Analog dazu konnten negative Zeta-Potentiale gemessen werden.

Im Hinblick auf eine spätere pulmonale Anwendung erfolgte die Charakterisierung der Transfektionseffizienz *in vitro* auf Lungenzelllinien. Transfektionsstudien zeigten eine Reduktion der Gentransfereffizienz durch Einführung von OEG-Einheiten unabhängig von der verwendeten Zelllinie, die auf i) eine schlechte Komplexierung der Plasmid-DNA, ii) eine moderate Zellbindung sowie iii) eine ungenügende endosomale Freisetzung zurückgeführt werden konnte. Unter Einsatz von Copolymeren mit geringem OEG-Anteil ($F_{OEGMA} < 33,3\%$ und 9 EG-Einheiten) wurden jedoch Transfektionsraten vergleichbar mit dem unmodifizierten Homopolymer P(DMAEMA) und um den Faktor 10 geringer als mit br-PEI erzielt. Dieselben Copolymere führten nach Komplexierung von mRNA zu einer gesteigerten Genexpressionsrate im Vergleich zu P(DMAEMA). Eine Erhöhung der Pufferkapazität durch Veränderungen im Polymerdesign bewirkte eine 6-fache Erhöhung der Gentransfereffizienz, verdeutlichte letztendlich aber auch, dass die Pufferkapazität alleine nicht der limitierende Faktor des Gentransfers mit P(DMAEMA-co-OEGMA) Copolymeren ist (Dubruel et al., 2000). Trotz vergleichbarer Pufferkapazitäten zwischen Homo- und Copolymer führte der Einsatz funktioneller Peptide, wie dem endosomolytisch aktiven INF7-Peptid, über elektrostatische Wechselwirkungen im Polyplex gebunden oder bereits kovalent

an die Polymerstruktur gekoppelt, zu einer Steigerung um den Faktor 20 und mehr, wohingegen mit dem Homopolymer lediglich eine 1,5-fache Steigerung erzielt werden konnte. Bei Kotransfektion mit dem TAT-Dimer, ein zellpenetrierendes Peptid mit NLS-Funktion, war ferner eine 100-fache Steigerung der Gentransfereffizienz möglich.

Die intratracheale Applikation der P(DMAEMA-*co*-OEGMA)/pDNA Polyplexe führte bei optimiertem PEGylierungsgrad zu einer 7-fach gesteigerten Expressionrate in der Lunge im Vergleich zu br-PEI. Entscheidend für die guten Ergebnisse *in vivo* war die kolloidale Stabilität der Polyplexe in physiologisch relevantem Medium. Im Vergleich zu den *in vitro* Versuchen waren jedoch höhere PEGylierungsgrade nötig, um die Partikel für die *in vivo* Applikation zu stabilisieren. Nicht zuletzt aufgrund der guten kolloidalen Stabilität und der Biokompatibilität stellen P(DMAEMA-*co*-OEGMA) Kopolymere eine vielversprechende Alternative zu herkömmlichen Trägersystemen im nicht-viralen Gentransfer dar. Erfolgversprechend erscheinen auch die Ansätze in Kombination mit mRNA, die im Gegensatz zur pDNA bereits im Zytoplasma ihren Wirkort hat und nicht in den Zellkern transportiert werden muss. In diesem Bereich sind bis heute keine effektiven Transfersysteme bekannt.

Im weiteren Teil der Arbeit wurde eine Arzneiform zur kontrollierten Freisetzung nicht-viraler Genvektoren auf Basis eines Applikationssystems der Firma Baxter entwickelt. Das Applikationssystem war aus einem Zweikomponentensystem mit einer lipophilen Komponente, bestehend aus einer 10 %igen (m/v) PLGA-Lösung in einem biokompatiblen Lösungsmittel, und einer hydrophilen Komponente, Wasser für Injektionszwecke, aufgebaut. Hiermit konnten lyophilisierte pDNA/l-PEI Polyplexe als Modellwirkstoff in einen *in situ* gebildeten Film eingebaut und über einen Zeitraum von 4 Wochen freigesetzt werden, wobei die Polyplexe zuvor in der hydrophilen Phase (Einbettungsvariante A) gelöst oder in der lipophilen Phase (Einbettungsvariante B) dispergiert vorliegen konnten. Als Matrixbildner wurden PLGA-Polymere der Rhesomer[®]RG Serie unterschiedlicher Kettenlänge und Zusammensetzung (PLA/PGA-Verhältnis, freie *versus* veresterte Endgruppen) verwendet. Diese sind bereits für die parenterale Applikation zugelassen und ermöglichen die Einstellung unterschiedlicher Abbauraten der ausgebildeten Matrices.

Die mechanische Festigkeit der Matrix, die Matrixgüte (Einbau der Polymere in den Film) und die Freisetzungskinetik aus der Matrix wurden im Wesentlichen durch die Wahl des Lösungsmittels und der Molekülmas-

se des Polymers bestimmt. Untersucht wurden Lösungsmittel unterschiedlicher Wasserlöslichkeit, die bereits parenteral eingesetzt werden und deren Wasserlöslichkeit in folgender Reihenfolge abnahm: Glycerolfomal > DMI >> Tetraglykol. Glycerolfomal zeigte dabei von den untersuchten Lösungsmitteln die geringste akute Toxizität. Die Matrixgüte der Filme lies sich durch Einsatz längerkettiger PLGA-Polymere mit erhöhter Lipophilie (veresterte Endgruppen) in Kombination mit einer guten Wasserlöslichkeit des verwendeten Lösungsmittels verbessern. Darüber hinaus korrelierte die mechanische Festigkeit der Filme ebenfalls mit der Kettenlänge der PLGA-Polymere und nahm mit steigender Lipophilie der Lösungsmittel zu (DMI > Glycerolfomal >> Tetraglykol).

Für die Freisetzung wurden PLGA-Polymere mit freien Endgruppen der Rhesomer[®] RG H-Serie verwendet, da für diese schnellere Abbauraten beschrieben sind. Eine schnelle Ausbildung der Matrix mit hoher Güte trug dabei entscheidend zu einer linearen Freisetzungskinetik ohne initialen Wirkstoffverlust bei. Die Freisetzungskinetik konnte ferner durch die unterschiedlichen Einbettungsvarianten des Wirkstoffes in die Matrix beeinflusst werden, wobei die Freisetzung generell für Einbettungsvariante B langsamer verlief und dabei einen geringeren initialen Wirkstoffverlust aufwies. Eine schnelle Phasen-Separation konnte durch eine gute Wassermischbarkeit des Lösungsmittels bei möglichst geringer Löslichkeit der Polymere im Lösungsmittel erreicht werden und förderte eine schnelle Ausbildung der Matrix. Beispiele hierfür waren die Kombinationen Glycerolfomal oder DMI mit dem längerkettigen Polymer Rhesomer[®] RG 504 H, wobei DMI zu einer höheren initialen Freisetzung führte. In beiden Fällen konnte je nach Einbettungsvariante eine zweiphasige Freisetzungskinetik, zusammengesetzt aus diffusions- und später erosionskontrollierter Freisetzung, beobachtet werden. Tetraglykol als lipophileres Lösungsmittel hingegen führte zu einer hohen Festigkeit der Matrix mit rein erosionskontrollierter Freisetzung.

Ein mögliches therapeutisches Einsatzgebiet für *in situ* gebildete Filme sind postoperative Adhäsionen, bei denen es nach einer Operation im Bauchraum in einem Zeitfenster von 2-3 Wochen zu permanenten Verwachsungen kommt. Ausgelöst werden diese durch ein Ungleichgewicht zwischen dem gewebespezifischen Plasminogenaktivator (tPA) und dessen Inhibitor (PAI-1). Neben der kontrollierten Freisetzung pharmakologisch wirksamer Komponenten stellen *in situ* gebildete Filme zusätzlich eine anitadhäsive Barriere für die Ausbildung von Verwachsungen dar und sind für den Einsatz in der minimal-invasiven Chirurgie geeignet.

Der Einbau eines für tPA kodierenden Plasmids in einen Film basierend auf Glycerolformal mit Rhesomer[®] RG 504 H führte im Zellkulturversuch zu einem tPA-Spiegel von 2 ng/ml über einen Zeitraum von 16 Tagen. Durch das aktive Implantat konnte dadurch eine 4-fache Steigerung gegenüber der Kontrolle erzielt werden. Im Hinblick auf den Abfall der tPA-Konzentration auf ein Fünftel der Normwerte im entzündeten Gewebe sind das durchaus therapeutisch relevante Steigerungen. Im Gegensatz zum tPA Spiegel ist der Spiegel des Inhibitors im entzündeten Gewebe bis um das 17-fache erhöht. Dadurch kann das tPA/PAI-1-Verhältnis von 3,5 im Normalzustand bis zu 0,4 im entzündeten Gewebe variieren. Eine stärkere Beeinflussung des tPA/PAI-1-Gleichgewichts ist somit durch Kotransfektion einer siRNA gegen PAI-1 zu erwarten, das in einem *in vitro* Versuch bestätigt werden konnte. So führte die Kotransfektion einer für tPA kodierenden Plasmid-DNA und einer siRNA gegen PAI-1 zu einer 8,3-fachen Steigerung des tPA/PAI-1-Verhältnisses 48 h nach der Transfektion, wohingegen die Applikation des Plasmids alleine lediglich eine Steigerung um den Faktor 4,5-fach erbrachte. Inwiefern die Steigerung jedoch therapeutische Relevanz hat bleibt abzuwarten.

Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotika
AFM	Atom Force Microscopy
ATP	Adenosintriphosphat
ATRP	Atom Transfer Radikal Polymerisation
bp	Basenpaar
br-PEI	Branched Polyethylenimine
CMV	Cytomegalievirus
CPP	Cell Penetrating Peptide
Da	Dalton
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAEMA	2-Dimethylaminoethylmethacrylat
DMF	Dimethylformamid
DMI	Dimethylsorbitid
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DPTP	2,2'-Dithiodipyridin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EG	Ethylenglykol

ELISA	Enzyme Linked Immunofluoreszenz Polymerisation
ELS	Elektrophoretischer Lichtstreuung
EMA	European Medicines Agency
FAM	Fertigarzneimittel
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	Food and Drug Administration
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FSC	Forward Angle Light Scatter
GAM	Genaktivierte Biomaterialien
GMP	Good Manufacturing Practice
GRAS	Generally Recognized As Safe
HBS	Hepes Buffered Saline
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HOBt	Hydroxybenzotriazol
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Inhärente Viskosität
INF 7	Influenza Peptid 7
IRES	Internal Ribosomal Entry Site
k.A.	Keine Angabe
KG	Körpergewicht
l-PEI	Linear Polyethylenimine
LB	Lysogeny Broth
LD	Letale Dosis

LNA	Lock Nucleic Acids
LPS	Lipopolysaccharid
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mRNA	Messenger RNA
MWCO	Molecular Weight Cutoff
NLS	Nuclear Localization Signal
NMP	N-Methylpyrrolidon
OEG	Oligoethylenglykol
OEGMA	Oligo(ethylenglykol)methacrylat
P(DMAEMA)	Poly(2-N-(dimethylaminoethyl)methacrylat
P-Wert	Verteilungskoeffizient
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
pDNA	Plasmid-DNA
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
PEO	Polyethylenoxid
PET	Polyethylene terephthalate
PI	Polydispersitätsindex
PLA	Poly-l-lactat
PLGA	Poly [D,L-lactic-co-glycolic acid]
PLGA	Poly-l-lactat-co-glykolid
PLL	Poly-L-lysin
PVDF	Polyvinylidendifluorid

RES	Retikuloendotheliales System
RISC	RNA Induced Silencing Complex
RLC	RISC Loading Complex
RLU	Relative Light Units
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SABER	Saccharose-acetate-iso-butyrat Extended Release
SCID	Severe Combined Immundeficiency
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEC	Size Exclusion Chromatography
siRNA	Short Interfering RNA
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis
SSC	Side Angle Light Scatter
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TFA	Trifluoressigsäure
tPA	Tissue Plasminogen Activator
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
uPA	Urokinase Plasmiogen Aktivator
Wfi	Wasser für Injektionszwecke

Abbildungsverzeichnis

1.1	Mechanismus der RNA-Interferenz	11
1.2	Herausforderungen einer erfolgreichen nicht-viralen Gentherapie	14
1.3	Hilfsstoffe zur Herstellung von Polyplexen	19
1.4	Design chimärer Polymer-Peptid-Konjugate	34
2.1	Verwendete Plasmide	47
2.2	Verwendete mRNA	49
2.3	Topologie von Polymerstrukturen	50
2.4	Strukturtypen von Copolymeren	51
2.5	L-PEI Synthese	53
2.6	Allgemeiner Mechanismus der kontrollierten radikalischen Polymerisation	54
2.7	Statistische Pfcopopolymere auf Methacrylat-Basis	56
2.8	Modifikation von Copolymeren mittels Cu(I)-katalysierter 1,3-Cycloaddition	57
2.9	Schematischer Ablauf der Peptid-Festphasensynthese	60
2.10	Erythrozyten-Lyseassay INF 7	63
2.11	Massenspektrometrum TAT-Dimer	65
2.12	Mechanismus der <i>Photinus</i> -Luziferase Reaktion	71
2.13	Methoden zur Diskriminierung zwischen extrazellulär gebundenen und internalisierten Polyplexen	74
2.14	Verdünnungsreihe von l-PEI/pDNA Polyplexen in PBS	79
2.15	Standardkurve des humanen tPA-Antigenassays	81
3.1	Pfcopopolymere auf Methacrylat-Basis	84
3.2	Elektrophoretische Mobilität von P(DMAEMA- <i>co</i> -OEGMA) pDNA Polyplexen	86
3.3	Physikalische Eigenschaften der Polyplexe	89
3.4	Kolloidale Stabilität der Polyplexen	90
3.5	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Polyplexen	92

3.6	Einfluss der P(DMAEMA- <i>co</i> -OEGMA) Copolymere auf die metabolische Zellviabilität	94
3.7	Transfektionseffizienzen von P(DMAEMA- <i>co</i> -OEGMA)/pDNA Polyplexen in Abhängigkeit vom <i>N/P</i> -Verhältnis	96
3.8	Einfluss des PEGylierungsgrades auf die Genexpression	97
3.9	Einfluss des PEGylierungsgrades auf die Zellbindung und Internalisierung der Polyplexe	99
3.10	Endosomolytische Aktivität der P(DMAEMA- <i>co</i> -OEGMA) Copolymere	102
3.11	Steigerung der Gentransfereffizienz durch Erhöhung der Pufferkapazität des Copolymers	104
3.12	Einführung funktioneller Peptide in nanoskaligen Trägersysteme basierend auf kationischen Polymeren	105
3.13	Steigerung der Gentransfereffizienz durch Einführung eines endosomolytischen Peptids	106
3.14	Einführung funktioneller Peptide in den Gentransferkomplex .	108
3.15	<i>In vitro</i> Gentransfereffizienz von P(DMAEMA- <i>co</i> -OEGMA)/pDNA Polyplexen mit elektrostatisch gebundenem INF7-Peptid und TAT-Dimer	110
3.16	Bindungsstärken unterschiedlicher Polymer/mRNA Polyplexe	112
3.17	Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen unkomplexierter mRNA und pDNA im Vergleich	113
3.18	Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von mRNA und pDNA Polyplexen im Vergleich	115
3.19	Transfektionseffizienz von pDNA oder mRNA Polyplexen im Vergleich	118
3.20	Intratracheale Applikation von P(DMAEMA- <i>co</i> -OEGMA)/pDNA Polyplexen mittels MicroSprayer [®] Aerosolizer	119
4.1	Versuchsaufbau zur Herstellung <i>in situ</i> gebildeter Filme	128
4.2	Strukturen verwendeter Lösungsmittel	130
4.3	Filmgüte der getesteten Lösungsmittel	134
4.4	LD50-Werte der getesteten Lösungsmittel im Vergleich	135
4.5	Filmgüte ausgewählter Rhesomer [®] RG Polymere im Vergleich	139
4.6	Viskoelastische Untersuchungen der Filme	141
4.7	Herstellung pulverförmiger Polyplexe	144
4.8	Freisetzungskinetik unterschiedlicher Formulierungen <i>in situ</i> gebildeter Filme	147
4.9	Pathogenese peritonealer Verwachsungen und mögliche Ansatzpunkte	150

4.10 <i>In vitro</i> Applikation der Filme auf Mesothelzellen: Luziferase	
Readout	156
4.11 <i>In vitro</i> Applikation der Sprühfilme auf Mesothelzellen	158
4.12 Kotransfektion von Plasmid-DNA/siRNA auf Mesothelzellen .	159

Tabellenverzeichnis

1.1	Verwendete Nukleinsäuren in der Gentherapie	8
1.2	Nicht-virale Gentransfervektoren im Überblick	15
1.3	Verwendete Peptidsequenzen für den nicht-viralen Gentransfer	32
2.1	Verwendete Arzneistoffe	37
2.2	Antikörper für den Western Blot	38
2.3	Verwendete Kits	38
2.4	Verwendete Enzyme	38
2.5	Reagenzien und Chemikalien	39
2.6	Verwendete Oligonukleotide	40
2.7	Verwendete Verbrauchsmaterialien	41
2.8	Verwendete Geräte	42
2.9	Verwendete Zelllinien	44
2.10	Verwendete Kulturmedien und Supplements	45
2.11	Verwendete siRNAs	49
2.12	Übersicht FmocFast™ Protokoll	58
3.1	Fluoreszenz-Quenching Assay	85
3.2	Charakterisierung von mRNA und pDNA Polyplexen im Ver- gleich	116
4.1	Überblick über die getesteten Lösungsmittel	131
4.2	Eigenschaften der verwendeten Rhesomer®RG Polymere	137
4.3	Pharmaka und Barriersysteme für die Prävention peritonea- ler Adhäsionen	153
5.1	Beurteilung der P(DMAEMA- <i>co</i> -OEGMA) Copolymere als nicht- virale Gentransfervehikel	168
5.2	Evaluation of P(DMAEMA- <i>co</i> -OEGMA) copolymers as novel non-viral gene delivery systems	210

Literaturverzeichnis

- Aberle, A. M., Tablin, F., Zhu, J., Walker, N. J., Gruenert, D. C., and Nantz, M. H. (1998). A novel tetraester construct that reduces cationic lipid-associated cytotoxicity. implications for the onset of cytotoxicity. *Biochemistry*, 37(18):6533–6540.
- Adami, R. C., Collard, W. T., Gupta, S. A., Kwok, K. Y., Bonadio, J., and Rice, K. G. (1998). Stability of peptide-condensed plasmid dna formulations. *J Pharm Sci*, 87(6):678–683.
- Adrian, M., Dubochet, J., Lepault, J., and McDowell, A. W. (1984). Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature*, 308(5954):32–36.
- Ahmad, G., Duffy, J. M., Farquhar, C., Vail, A., Vandekerckhove, P., Watson, A., and Wiseman, D. (2008). Barrier agents for adhesion prevention after gynaecological surgery. *Cochrane Database Syst Rev*.
- Anchordoquy, T. J., Armstrong, T. K., and Molina, M. C. (2005). Low molecular weight dextrans stabilize nonviral vectors during lyophilization at low osmolalities: concentrating suspensions by rehydration to reduced volumes. *J Pharm Sci*, 94(6):1226–1236.
- Aneja, M. K., Geiger, J., Imker, R., Zg N, S., Kormann, M., Hasenpusch, G., Maucksch, C., and Rudolph, C. (2009). Optimization of streptomyces bacteriophage phic31 integrase system to prevent post integrative gene silencing in pulmonary type ii cells. *Exp Mol Med*.
- Aneja, M. K., Imker, R., and Rudolph, C. (2007). Phage phic31 integrase-mediated genomic integration and long-term gene expression in the lung after nonviral gene delivery. *J Gene Med*, 9(11):967–975.
- Arbeiter, K., Bidmon, B., Endemann, M., Bender, T. O., Eickelberg, O., Ruffinghofer, D., Mueller, T., Regele, H., Herkner, K., and Aufricht, C. (2001). Peritoneal dialysate fluid composition determines heat shock protein expression patterns in human mesothelial cells. *Kidney Int*, 60(5):1930–1937.

- Barry, M. E., Pinto-González, D., Orson, F. M., McKenzie, G. J., Petry, G. R., and Barry, M. A. (1999). Role of endogenous endonucleases and tissue site in transfection and cpg-mediated immune activation after naked dna injection. *Hum Gene Ther*, 10(15):2461–2480.
- Bello Roufaï, M. and Midoux, P. (2001). Histidylated polylysine as dna vector: elevation of the imidazole protonation and reduced cellular uptake without change in the polyfection efficiency of serum stabilized negative polyplexes. *Bioconjug Chem*, 12(1):92–99.
- Bennett, E. M., Lin, S. X., Towler, M. C., Maxfield, F. R., and Brodsky, F. M. (2001). Clathrin hub expression affects early endosome distribution with minimal impact on receptor sorting and recycling. *Mol Biol Cell*, 12(9):2790–2799.
- Bertschinger, M., Backliwal, G., Schertenleib, A., Jordan, M., Hacker, D. L., and Wurm, F. M. (2006). Disassembly of polyethylenimine-dna particles in vitro: implications for polyethylenimine-mediated dna delivery. *J Control Release*, 116(1):96–104.
- Bettinger, T., Carlisle, R. C., Read, M. L., Ogris, M., and Seymour, L. W. (2001). Peptide-mediated rna delivery: a novel approach for enhanced transfection of primary and post-mitotic cells. *Nucleic Acids Res*, 29(18):3882–3891.
- Bieber, T., Meissner, W., Kostin, S., Niemann, A., and Elsassner, H. P. (2002). Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-dna complexes. *J Control Release*, 82(2-3):441–454.
- Binda, M. M., Hellebrekers, B. W., Declerck, P. J., and Koninckx, P. R. (2009). Effect of reteplase and pai-1 antibodies on postoperative adhesion formation in a laparoscopic mouse model. *Surg Endosc*, 23(5):1018–1025.
- Bivas-Benita, M., Zwier, R., Junginger, H. E., and Borchard, G. (2005). Non-invasive pulmonary aerosol delivery in mice by the endotracheal route. *Eur J Pharm Biopharm*, 61(3):214–218.
- Bleiberg, B., Beers, T. R., Persson, M., and Miles, J. M. (1993). Metabolism of triacetin-derived acetate in dogs. *Am J Clin Nutr*, 58(6):908–911.
- Bonnet, M. E., Erbacher, P., and Bolcato-Bellemin, A. L. (2008). Systemic delivery of DNA or siRNA mediated by linear polyethylenimine (L-PEI) does not induce an inflammatory response. *Pharm. Res.*, 25:2972–2982.

- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(16):7297–7301.
- Boyce, N. (2001). Trial halted after gene shows up in semen. *Nature*, 414(6865):677–677.
- Brodbeck, K. J., DesNoyer, J. R., and McHugh, A. J. (1999). Phase inversion dynamics of plga solutions related to drug delivery. part ii. the role of solution thermodynamics and bath-side mass transfer. *J Control Release*, 62(3):333–344.
- Brokelman, W., Holmdahl, L., Falk, P., Klinkenbijn, J., and Reijnen, M. (2009). The peritoneal fibrinolytic response to conventional and laparoscopic colonic surgery. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*, 19(4):489–493.
- Brooks, H., Lebleu, B., and Vivès, E. (2005). Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics. *Adv Drug Deliv Rev*, 57(4):559–577.
- Brown, K. C. (2000). New approaches for cell-specific targeting: identification of cell-selective peptides from combinatorial libraries. *Curr Opin Chem Biol*, 4(1):16–21.
- Brunner, S., Fürtbauer, E., Sauer, T., Kursa, M., and Wagner, E. (2002). Overcoming the nuclear barrier: cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation. *Mol Ther*, 5(1):80–86.
- Brunner, S., Sauer, T., Carotta, S., Cotten, M., Saltik, M., and Wagner, E. (2000). Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Ther*, 7(5):401–407.
- Capan, Y., Woo, B. H., Gebrekidan, S., Ahmed, S., and DeLuca, P. P. (1999). Influence of formulation parameters on the characteristics of poly(D, L-lactide-co-glycolide) microspheres containing poly(L-lysine) complexed plasmid DNA. *J Control Release*, 60:279–286.
- Cartier, R. and Reszka, R. (2002). Utilization of synthetic peptides containing nuclear localization signals for nonviral gene transfer systems. *Gene Ther*, 9(3):157–167.
- Chan, C. K. and Jans, D. A. (2002). Using nuclear targeting signals to enhance non-viral gene transfer. *Immunol Cell Biol*, 80(2):119–130.

- Chandrashekar, G. and Udupa, N. (1996). Biodegradable injectable implant systems for long term drug delivery using poly (lactic-co-glycolic) acid copolymers. *J Pharm Pharmacol*, 48(7):669–674.
- Check, E. (2002). A tragic setback. *Nature*, 420(6912):116–118.
- Cheng, T., Zhao, Y., Li, X., Lin, F., Xu, Y., Zhang, X., Li, Y., Wang, R., and Lai, L. (2007). Computation of octanol-water partition coefficients by guiding an additive model with knowledge. *J Chem Inf Model*, 47(6):2140–2148.
- Cheong, Y. C., Laird, S. M., Li, T. C., Shelton, J. B., Ledger, W. L., and Cooke, I. D. (2001). Peritoneal healing and adhesion formation/reformation. *Hum Reprod Update*, 7(6):556–566.
- Chern, R. and Zingerman, J. (2004). Liquid polymeric compositions for controlled release of bioactive substances. US Patent App. 10/753,724.
- Cherng, J. Y., Talsma, H., Verrijck, R., Crommelin, D. J., and Hennink, W. E. (1999a). The effect of formulation parameters on the size of poly((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid complexes. *Eur J Pharm Biopharm*, 47(3):215–224.
- Cherng, J. Y., van de Wetering, P., Talsma, H., Crommelin, D. J., and Hennink, W. E. (1996). Effect of size and serum proteins on transfection efficiency of poly((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid nanoparticles. *Pharm Res*, 13(7):1038–1042.
- Cherng, J. Y., vd Wetering, P., Talsma, H., Crommelin, D. J., and Hennink, W. E. (1999b). Stabilization of polymer-based gene delivery systems. *Int J Pharm*, 183(1):25–28.
- Chernov, K. G., Curmi, P. A., Hamon, L., Mechulam, A., Ovchinnikov, L. P., and Pastré, D. (2008). Atomic force microscopy reveals binding of mrna to microtubules mediated by two major mrnp proteins yb-1 and pabp. *FEBS Lett*, 582(19):2875–2881.
- Choi, Y. H., Liu, F., Kim, J. S., Choi, Y. K., Park, J. S., and Kim, S. W. (1998). Polyethylene glycol-grafted poly-l-lysine as polymeric gene carrier. *J Control Release*, 54(1):39–48.
- Chollet, P., Favrot, M. C., Hurbin, A., and Coll, J. L. (2002). Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-dna complexes. *J Gene Med*, 4(1):84–91.

- Committe for veterinary medicinal products (1996). *Glycerol Formal, Summary Report*. European Agency for Evaluation of Medicinal Products.
- Csaba, N., Caamaño, P., Sánchez, A., Domínguez, F., and Alonso, M. J. (2005). PLGA:poloxamer and PLGA:poloxamine blend nanoparticles: new carriers for gene delivery. *Biomacromolecules*, 6:271–278.
- Dames, P., Ortiz, A., Schillinger, U., Lesina, E., Plank, C., Rosenecker, J., and Rudolph, C. (2007). Aerosol gene delivery to the murine lung is mouse strain dependent. *J Mol Med*, 85(4):371–378.
- Dash, P. R., Read, M. L., Barrett, L. B., Wolfert, M. A., and Seymour, L. W. (1999). Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery. *Gene Ther*, 6(4):643–650.
- Dauty, E. and Verkman, A. S. (2005). Actin cytoskeleton as the principal determinant of size-dependent dna mobility in cytoplasm: a new barrier for non-viral gene delivery. *J Biol Chem*, 280(9):7823–7828.
- Davis, F. F., Abuchowski, A., van Es, T., Palczuk, N. C., Chen, R., Sacova, K., and Wieder, K. (1978). Enzyme-polyethylene glycol adducts: modified enzymes with unique properties. *Enzyme Eng*, 4:169–173.
- De Smedt, S. C., Demeester, J., and Hennink, W. E. (2000). Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharm Res*, 17(2):113–126.
- de Wolf, H., Luten, J., Snel, C., Oussoren, C., Hennink, W., and Storm, G. (2005). In vivo tumor transfection mediated by polyplexes based on biodegradable poly (DMAEA)-phosphazene. *Journal of Controlled Release*, 109(1-3):275–287.
- DeCherney, A. H. and diZerega, G. S. (1997). Clinical problem of intraperitoneal postsurgical adhesion formation following general surgery and the use of adhesion prevention barriers. *Surg Clin North Am*, 77(3):671–688.
- Delgado, C., Francis, G. E., and Fisher, D. (1992). The uses and properties of peg-linked proteins. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 9(3-4):249–304.
- Demeneix, B. and Behr, J. P. (2005). Polyethylenimine (pei). *Adv Genet*, 53:217–230.
- Demeneix, B., Hassani, Z., and Behr, J. P. (2004). Towards multifunctional synthetic vectors. *Curr Gene Ther*, 4(4):445–455.

- Deshayes, S., Morris, M. C., Divita, G., and Heitz, F. (2005). Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cell Mol Life Sci*, 62(16):1839–1849.
- Diamond, M. P. (1998). Reduction of de novo postsurgical adhesions by intraoperative precoating with sepracoat (hal-c) solution: a prospective, randomized, blinded, placebo-controlled multicenter study. the sepracoat adhesion study group. *Fertil Steril*, 69(6):1067–1074.
- Diebold, S. S., Lehrmann, H., Kursa, M., Wagner, E., Cotten, M., and Zenke, M. (1999). Efficient gene delivery into human dendritic cells by adenovirus polyethylenimine and mannose polyethylenimine transfection. *Hum Gene Ther*, 10(5):775–786.
- diZerega, G. S. and Campeau, J. D. (2001). Peritoneal repair and post-surgical adhesion formation. *Hum Reprod Update*, 7(6):547–555.
- Dokka, S., Toledo, D., Shi, X., Castranova, V., and Rojanasakul, Y. (2000). Oxygen radical-mediated pulmonary toxicity induced by some cationic liposomes. *Pharm Res*, 17(5):521–525.
- Dubruel, P., Christiaens, B., Vanloo, B., Bracke, K., Rosseneu, M., Vandekerckhove, J., and Schacht, E. (2003). Physicochemical and biological evaluation of cationic polymethacrylates as vectors for gene delivery. *Eur J Pharm Sci*, 18(3-4):211–220.
- Dubruel, P. and Schacht, E. (2006). Vinyl polymers as non-viral gene delivery carriers: current status and prospects. *Macromol Biosci*, 6(10):789–810.
- Dubruel, P., Toncheva, V., and Schacht, E. (2000). pH sensitive vinyl copolymers as vectors for gene therapy. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 15(3):191.
- Dunn, R., English, J., Cowsar, D., and Vanderbilt, D. (1994). Biodegradable in-situ forming implants and methods for producing the same. US Patent 5,340,849.
- Dunn, R., Lyman, M. D., Edelman, P. G., and Campbell, P. K. (2001). Evaluation of the spraygel adhesion barrier in the rat cecum abrasion and rabbit uterine horn adhesion models. *Fertil Steril*, 75(2):411–416.
- Echlin, P. (2001). Biological x-ray microanalysis: The past, present practices, and future prospects. *Microsc Microanal*, 7(2):211–219.

- Edelstein, M. L., Abedi, M. R., and Wixon, J. (2007). Gene therapy clinical trials worldwide to 2007—an update. *J Gene Med*, 9(10):833–842.
- Ehrhardt, A., Xu, H., Huang, Z., Engler, J. A., and Kay, M. A. (2005). A direct comparison of two nonviral gene therapy vectors for somatic integration: in vivo evaluation of the bacteriophage integrase phic31 and the sleeping beauty transposase. *Mol Ther*, 11(5):695–706.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide rnas mediate rna interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411(6836):494–498.
- Elfinger, M., Geiger, J., Hasenpusch, G., Üzgün, S., Sieverling, N., Aneja, M. K., Maucksch, C., and Rudolph, C. (2009). Targeting of the beta(2)-adrenoceptor increases nonviral gene delivery to pulmonary epithelial cells in vitro and lungs in vivo. *J Control Release*, 135(3):234–241.
- Elfinger, M., Uezguen, S., and Rudolph, C. (2008). Controlled release systems for dna delivery. *Curr Nanoscience*, 4:322–353.
- Eliasz, R. E. and Kost, J. (2000). Characterization of a polymeric PLGA-injectable implant delivery system for the controlled release of proteins. *J Biomed. Mater. Res.*, 50:388–396.
- Eliasz, R. E. and Szoka, F. C. (2002). Robust and prolonged gene expression from injectable polymeric implants. *Gene Ther.*, 9:1230–1237.
- Eliasz, R. E., Wallach, D., and Kost, J. (2000). Delivery of soluble tumor necrosis factor receptor from in-situ forming PLGA implants: in-vivo. *Pharm. Res.*, 17:1546–1550.
- Ellis, H., Moran, B. J., Thompson, J. N., Parker, M. C., Wilson, M. S., Menzies, D., McGuire, A., Lower, A. M., Hawthorn, R. J., O'Brien, F., Buchan, S., and Crowe, A. M. (1999). Adhesion-related hospital readmissions after abdominal and pelvic surgery: a retrospective cohort study. *Lancet*, 353(9163):1476–1480.
- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., and Discher, D. E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4):677–689.
- Erbacher, P., Remy, J. S., and Behr, J. P. (1999). Gene transfer with synthetic virus-like particles via the integrin-mediated endocytosis pathway. *Gene Ther*, 6(1):138–145.

- Fan, L. and Singh, S. (1989). *Controlled release: a quantitative treatment*. Springer New York.
- Farquhar, C., Vandekerckhove, P., Watson, A., Vail, A., and Wiseman, D. (2000). Barrier agents for preventing adhesions after surgery for subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*, 2.
- Fazio, V. W., Cohen, Z., Fleshman, J. W., van Goor, H., Bauer, J. J., Wolff, B. G., Corman, M., Beart, R. W., Wexner, S. D., Becker, J. M., Monson, J. R., Kaufman, H. S., Beck, D. E., Bailey, H. R., Ludwig, K. A., Stamos, M. J., Darzi, A., Bleday, R., Dorazio, R., Madoff, R. D., Smith, L. E., Gearhart, S., Lillemoe, K., and Göhl, J. (2006). Reduction in adhesive small-bowel obstruction by seprafilm adhesion barrier after intestinal resection. *Dis Colon Rectum*, 49(1):1–11.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., and Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated dna-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(21):7413–7417.
- Ferland, R., Mulani, D., and Campbell, P. K. (2001). Evaluation of a sprayable polyethylene glycol adhesion barrier in a porcine efficacy model. *Hum Reprod*, 16(12):2718–2723.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded rna in *caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669):806–811.
- Fretz, M., Koning, G., Mastrobattista, E., Jiskoot, W., and Storm, G. (2004). OVCAR-3 cells internalize TAT-peptide modified liposomes by endocytosis. *BBA-Biomembranes*, 1665(1-2):48–56.
- Fried, I., Traitel, T., Goldbart, R., Shmilowitz, D., Wolfson, M., and Kost, J. (2005). Cancer gene therapy using ph-sensitive polyplexes released from an injectable plga implant. In *Proceedings of the 33rd Annual Meeting of the Controlled Release Society*, page 598, Vienna, Austria.
- Friedmann, T. and Roblin, R. (1972). Gene therapy for human genetic disease? *Science*, 175(25):949–955.
- Funhoff, A. M., van Nostrum, C. F., Lok, M. C., Kruijtzter, J. A., Crommelin, D. J., and Hennink, W. E. (2005). Cationic polymethacrylates with covalently linked membrane destabilizing peptides as gene delivery vectors. *J Control Release*, 101(1-3):233–246.

- Gago, L. A., Saed, G. M., Chauhan, S., Elhammady, E. F., and Diamond, M. P. (2003). Septrafilm (modified hyaluronic acid and carboxymethylcellulose) acts as a physical barrier. *Fertil Steril*, 80(3):612–616.
- Gardlík, R., Pálffy, R., Hodosy, J., Lukács, J., Turna, J., and Celec, P. (2005). Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit*, 11(4):110–121.
- Gebhart, C. L. and Kabanov, A. V. (2001). Evaluation of polyplexes as gene transfer agents. *J Control Release*, 73(2-3):401–416.
- Gene Therapy Clinical Trials Worldwide (2009). Journal of gene medicine. Available online at <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>.
- Godbey, W. T., Barry, M. A., Saggau, P., Wu, K. K., and Mikos, A. G. (2000). Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery. *J Biomed Mater Res*, 51(3):321–328.
- Godbey, W. T. and Mikos, A. G. (2001). Recent progress in gene delivery using non-viral transfer complexes. *J Control Release*, 72(1-3):115–125.
- Godbey, W. T., Wu, K. K., Hirasaki, G. J., and Mikos, A. G. (1999a). Improved packing of poly(ethylenimine)/dna complexes increases transfection efficiency. *Gene Ther*, 6(8):1380–1388.
- Godbey, W. T., Wu, K. K., and Mikos, A. G. (1999b). Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *J Control Release*, 60(2-3):149–160.
- Godbey, W. T., Wu, K. K., and Mikos, A. G. (1999c). Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/dna complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(9):5177–5181.
- Goepferich, A. (1997). Mechanisms of polymer degradation and elimination. *Handbook of biodegradable polymers*, pages 451–471.
- Goepferich, A., Shieh, L., and Langer, R. (1995). Aspects of polymer erosion. In *Materials Research Society Symposium Proceedings*, volume 394, pages 155–160.
- Graham, P. D., Brodbeck, K. J., and McHugh, A. J. (1999). Phase inversion dynamics of plga solutions related to drug delivery. *J Control Release*, 58(2):233–245.

- Gumbleton, M., Abulrob, A. G., and Campbell, L. (2000). Caveolae: an alternative membrane transport compartment. *Pharm Res*, 17(9):1035–1048.
- Habib, N. (2007). Clinical study with hydrodynamic gene delivery into hepatocytes in humans. In *Proceedings of the 10th Annual Meeting ASGT*, pages 36–37, Seattle, USA.
- Haensler, J. and Szoka, F. C. (1993). Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug Chem*, 4(5):372–379.
- Hansma, H. G. (2001). Surface biology of dna by atomic force microscopy. *Annu Rev Phys Chem*, 52:71–92.
- Harris, E. S., Morgan, R. F., and Rodeheaver, G. T. (1995). Analysis of the kinetics of peritoneal adhesion formation in the rat and evaluation of potential antiadhesive agents. *Surgery*, 117(6):663–669.
- Hashida, H., Miyamoto, M., Cho, Y., Hida, Y., Kato, K., Kurokawa, T., Okushiba, S., Kondo, S., Dosaka-Akita, H., and Katoh, H. (2004). Fusion of HIV-1 Tat protein transduction domain to poly-lysine as a new DNA delivery tool. *British journal of cancer*, 90(6):1252.
- Hatefi, A. and Amsden, B. (2002). Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems. *J Control Release*, 80(1-3):9–28.
- Hayat, M. and Miller, S. (1990). *Negative staining*. McGraw-Hill.
- Hed, J., Hallden, G., Johansson, S. G., and Larsson, P. (1987). The use of fluorescence quenching in flow cytofluorometry to measure the attachment and ingestion phases in phagocytosis in peripheral blood without prior cell separation. *J Immunol Methods*, 101(1):119–125.
- Hellebrekers, B. W., Trimbos-Kemper, T. C., Boesten, L., Jansen, F. W., Kolkman, W., Trimbos, J. B., Press, R. R., van Poelgeest, M. I., Emeis, S. J., and Kooistra, T. (2009). Preoperative predictors of postsurgical adhesion formation and the prevention of adhesions with plasminogen activator (papa-study): results of a clinical pilot study. *Fertil Steril*, 91(4):1204–1214.
- Hellebrekers, B. W., Trimbos-Kemper, T. C., Trimbos, J. B., Emeis, J. J., and Kooistra, T. (2000). Use of fibrinolytic agents in the prevention of postoperative adhesion formation. *Fertil Steril*, 74(2):203–212.

- Hill-West, J. L., Dunn, R. C., and Hubbell, J. A. (1995). Local release of fibrinolytic agents for adhesion prevention. *J Surg Res*, 59(6):759–763.
- Holmdahl, L. and Risberg, B. (1997). Adhesions: prevention and complications in general surgery. *Eur J Surg*, 163(3):169–174.
- Hunter, A. C. (2006). Molecular hurdles in polyfectin design and mechanistic background to polycation induced cytotoxicity. *Adv Drug Deliv Rev*, 58(14):1523–1531.
- Huth, S., Hoffmann, F., von Gersdorff, K., Laner, A., Reinhardt, D., Rosenecker, J., and Rudolph, C. (2006). Interaction of polyamine gene vectors with rna leads to the dissociation of plasmid dna-carrier complexes. *J Gene Med*, 8(12):1416–1424.
- Hyndman, L., Lemoine, J., Huang, L., Porteous, D., Boyd, A., and Nan, X. (2004). HIV-1 Tat protein transduction domain peptide facilitates gene transfer in combination with cationic liposomes. *Journal of Controlled Release*, 99(3):435–444.
- Ince, A., Eroglu, A., Tarhan, O., and Bülbül, M. (2002). Peritoneal fibrinolytic activity in peritonitis. *Am J Surg*, 183(1):67–69.
- Innes, N. P. and Ogden, G. R. (1999). A technique for the study of endocytosis in human oral epithelial cells. *Arch Oral Biol*, 44(6):519–523.
- Ivarsson, M. L., Bergström, M., Eriksson, E., Risberg, B., and Holmdahl, L. (1998). Tissue markers as predictors of postoperative adhesions. *Br J Surg*, 85(11):1549–1554.
- Ivics, Z. and Izsvák, Z. (2006). Transposons for gene therapy! *Curr Gene Ther*, 6(5):593–607.
- Jain, R. A. (2000). The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (plga) devices. *Biomaterials*, 21(23):2475–2490.
- Jain, R. A., Rhodes, C. T., Railkar, A. M., Malick, A. W., and Shah, N. H. (2000). Controlled release of drugs from injectable in situ formed biodegradable plga microspheres: effect of various formulation variables. *Eur J Pharm Biopharm*, 50(2):257–262.
- Jones, R. A., Poniris, M. H., and Wilson, M. R. (2004). pdmaema is internalised by endocytosis but does not physically disrupt endosomes. *J Control Release*, 96(3):379–391.

- Kaplan, I., Wadia, J., and Dowdy, S. (2005). Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *Journal of Controlled Release*, 102(1):247–253.
- Kataoka, K., Harada, A., and Nagasaki, Y. (2001). Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv Drug Deliv Rev*, 47(1):113–131.
- Katayose, S. and Kataoka, K. (1997). Water-soluble polyion complex associates of dna and poly(ethylene glycol)-poly(l-lysine) block copolymer. *Bioconjug Chem*, 8(5):702–707.
- Katayose, S. and Kataoka, K. (1998). Remarkable increase in nuclease resistance of plasmid dna through supramolecular assembly with poly(ethylene glycol)-poly(l-lysine) block copolymer. *J Pharm Sci*, 87(2):160–163.
- Keck, C. M. and Müller, R. H., editors (2009). *Moderne Pharmazeutische Technologie*, pages 2–7. Keck, C M and Müller, R H, first edition.
- Kichler, A., Chillon, M., Leborgne, C., Danos, O., and Frisch, B. (2002). Intranasal gene delivery with a polyethylenimine-peg conjugate. *J Control Release*, 81(3):379–388.
- Kim, D. H. and Rossi, J. J. (2007). Strategies for silencing human disease using rna interference. *Nat Rev Genet*, 8(3):173–184.
- Kircheis, R., Blessing, T., Brunner, S., Wightman, L., and Wagner, E. (2001). Tumor targeting with surface-shielded ligand–polycation dna complexes. *J Control Release*, 72(1-3):165–170.
- Kleemann, E., Neu, M., Jekel, N., Fink, L., Schmehl, T., Gessler, T., Seeger, W., and Kissel, T. (2005). Nano-carriers for DNA delivery to the lung based upon a TAT-derived peptide covalently coupled to PEG–PEI. *Journal of Controlled Release*, 109(1-3F):299–316.
- Kolb, H., Finn, M., and Sharpless, K. (2001). Click-Chemie: diverse chemische Funktionalität mit einer Handvoll guter Reaktionen. *Angewandte Chemie*, 113(11):2056–2075.
- Kopatz, I., Remy, J. S., and Behr, J. P. (2004). A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin. *J Gene Med*, 6(7):769–776.

- Koshkina, N. V., Agoulnik, I. Y., Melton, S. L., Densmore, C. L., and Knight, V. (2003). Biodistribution and pharmacokinetics of aerosol and intravenously administered dna-polyethyleneimine complexes: optimization of pulmonary delivery and retention. *Mol Ther*, 8(2):249–254.
- Kreuter, J. (1983a). Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. ii: Comparison of the body distribution of nanoparticles with the body distribution of microspheres (diameter greater than 1 micron), liposomes, and emulsions. *Pharm Acta Helv*, 58(8):217–226.
- Kreuter, J. (1983b). Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. iii: materials, stability, toxicity, possibilities of targeting, and use. *Pharm Acta Helv*, 58(9-10):242–250.
- Kreuter, J. (1994). *Colloidal drug delivery systems*. CRC.
- Krieg, A. M. (1999). Direct immunologic activities of cpg dna and implications for gene therapy. *J Gene Med*, 1(1):56–63.
- Kumar, S., Wong, P. F., and Leaper, D. J. (2009). Intra-peritoneal prophylactic agents for preventing adhesions and adhesive intestinal obstruction after non-gynaecological abdominal surgery. *Cochrane Database Syst Rev*, 1.
- Kurisawa, M., Yokoyama, M., and Okano, T. (2000). Transfection efficiency increases by incorporating hydrophobic monomer units into polymeric gene carriers. *J Control Release*, 68(1):1–8.
- Laitinen, M., Hartikainen, J., Hiltunen, M. O., Eränen, J., Kiviniemi, M., Närvänen, O., Mäkinen, K., Manninen, H., Syväne, M., Martin, J. F., Laakso, M., and Ylä-Herttuala, S. (2000). Catheter-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer to human coronary arteries after angioplasty. *Hum Gene Ther*, 11(2):263–270.
- Lambert, W. J. and Peck, K. D. (1995). Development of an in situ forming biodegradable poly-lactide-co-glycolide system for controlled release of proteins. *J Control Release*, 33(1):189–195.
- Lechardeur, D., Sohn, K. J., Haardt, M., Joshi, P. B., Monck, M., Graham, R. W., Beatty, B., Squire, J., O’Brodivich, H., and Lukacs, G. L. (1999). Metabolic instability of plasmid dna in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther*, 6(4):482–497.
- Lee, R. J. and Huang, L. (1997). Lipidic vector systems for gene transfer. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 14(2):173–206.

- Lemieux, P., Vinogradov, S. V., Gebhart, C. L., Gu erin, N., Paradis, G., Nguyen, H. K., Ochiatti, B., Suzdaltseva, Y. G., Bartakova, E. V., Bronich, T. K., St-Pierre, Y., Alakhov, V. Y., and Kabanov, A. V. (2000). Block and graft copolymers and nanogel copolymer networks for dna delivery into cell. *J Drug Target*, 8(2):91–105.
- Leuneberger, H. (2002). *Martin, Physikalische Pharmazie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Li, S., Tan, Y., Viroonchatapan, E., Pitt, B. R., and Huang, L. (2000). Targeted gene delivery to pulmonary endothelium by anti-pecam antibody. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 278(3):504–511.
- Lifschitz, A., Pis, A., Alvarez, L., Virkel, G., Sanchez, S., Sallovitz, J., Kujanek, R., and Lanusse, C. (1999). Bioequivalence of ivermectin formulations in pigs and cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 22:27–34.
- Liu, D., Ren, T., and Gao, X. (2003a). Cationic transfection lipids. *Curr Med Chem*, 10(14):1307–1315.
- Liu, F., Song, Y., and Liu, D. (1999). Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid dna. *Gene Ther*, 6(7):1258–1266.
- Liu, G., Li, D., Pasumathy, M. K., Kowalczyk, T. H., Gedeon, C. R., Hyatt, S. L., Payne, J. M., Miller, T. J., Brunovskis, P., Fink, T. L., Muhammad, O., Moen, R. C., Hanson, R. W., and Cooper, M. J. (2003b). Nanoparticles of compacted dna transfect postmitotic cells. *J Biol Chem*, 278(35):32578–32586.
- Lombry, C., Edwards, D. A., Pr eat, V., and Vanbever, R. (2004). Alveolar macrophages are a primary barrier to pulmonary absorption of macromolecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 286(5):1002–1008.
- Lungwitz, U., Breunig, M., Blunk, T., and G opferich, A. (2005). Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm*, 60(2):247–266.
- Luo, D. and Saltzman, W. M. (2000). Synthetic dna delivery systems. *Nat Biotechnol*, 18(1):33–37.
- Lutz, J., Andrieu, J.,  uzg un, S., Rudolph, C., and Agarwal, S. (2007). Bio-compatible, thermosensitive, and biodegradable: Simple preparation of  all-in-one" biorelevant polymers. *Macromolecules*, 24(40):8540–8543.

- Lutz, J. and Hoth, A. (2006). Preparation of ideal peg analogues with a tunable thermosensitivity by controlled radical copolymerization of 2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate and oligo(ethylene glycol) methacrylate. *Macromolecules*, 2(39):893–896.
- Luzio, J. P., Mullock, B. M., Pryor, P. R., Lindsay, M. R., James, D. E., and Piper, R. C. (2001). Relationship between endosomes and lysosomes. *Biochem Soc Trans*, 29(Pt 4):476–480.
- MacRitchie, F. (1972). The adsorption of proteins at the solid/liquid. *J Colloid Interface Sci*, 38(2):484–488.
- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., and Hori, K. (2000). Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release*, 65(1-2):271–284.
- Mahat, R. I., Monera, O. D., Smith, L. C., and Rolland, A. (1999). Peptide-based gene delivery. *Curr Opin Mol Ther*, 1(2):226–243.
- Markova, S. V., Golz, S., Frank, L. A., Kalthof, B., and Vysotski, E. S. (2004). Cloning and expression of cDNA for a luciferase from the marine copepod *metridia longa*. a novel secreted bioluminescent reporter enzyme. *J Biol Chem*, 279(5):3212–3217.
- Marshall, E. (1999). Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science*, 286(5448):2244–2245.
- Martin, M. E. and Rice, K. G. (2007). Peptide-guided gene delivery. *AAPS J*, 9(1):18–29.
- Matschke, C., Isele, U., van Hoogevest, P., and Fahr, A. (2002). Sustained-release injectables formed in situ and their potential use for veterinary products. *J Control Release*, 85(1-3):1–15.
- McCullagh, K. (2006). RNA bound: the future of antisense drugs. *Cancer World*, pages 26–30.
- Medina-Kauwe, L. K., Xie, J., and Hamm-Alvarez, S. (2005). Intracellular trafficking of nonviral vectors. *Gene Ther*, 12(24):1734–1751.
- Mehier-Humbert, S. and Guy, R. H. (2005). Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv Drug Deliv Rev*, 57(5):733–753.

- Mellman, I. (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 12:575–625.
- Menzies, D. (1992). Peritoneal adhesions. incidence, cause, and prevention. *Surg Annu*, 24 Pt 1:27–45.
- Menzies, D. and Ellis, H. (1991). The role of plasminogen activator in adhesion prevention. *Surg Gynecol Obstet*, 172(5):362–366.
- Merdan, T., Kopecek, J., and Kissel, T. (2002a). Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv Drug Deliv Rev*, 54(5):715–758.
- Merdan, T., Kunath, K., Fischer, D., Kopecek, J., and Kissel, T. (2002b). Intracellular processing of poly(ethylene imine)/ribozyme complexes can be observed in living cells by using confocal laser scanning microscopy and inhibitor experiments. *Pharm Res*, 19(2):140–146.
- Merrifield, R. B. (1963). x. *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149 – 2154.
- Mettler, L., Audebert, A., Lehmann-Willenbrock, E., Schive, K., and Jacobs, V. R. (2003). Prospective clinical trial of spraygel as a barrier to adhesion formation: an interim analysis. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*, 10(3):339–344.
- Midoux, P., LeCam, E., Coulaud, D., Delain, E., and Pichon, C. (2002). Histidine containing peptides and polypeptides as nucleic acid vectors. *Somat Cell Mol Genet*, 27(1-6):27–47.
- Midoux, P. and Monsigny, M. (1999). Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pdna complexes. *Bioconjug Chem*, 10(3):406–411.
- Mislick, K. A. and Baldeschwieler, J. D. (1996). Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(22):12349–12354.
- Montier, T., Benvegno, T., Jaffrès, P. A., Yaouanc, J. J., and Lehn, P. (2008). Progress in cationic lipid-mediated gene transfection: a series of bio-inspired lipids as an example. *Curr Gene Ther*, 8(5):296–312.
- Mottu, F., Laurent, A., R
üfenacht, D., and Doelker, E. (2000). Organic solvents for pharmaceutical parenterals and embolic liquids: a review of toxicity data. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 54(6):456.

- Mottu, F., Stelling, M. J., Rüfenacht, D. A., and Doelker, E. (2001). Comparative hemolytic activity of undiluted organic water-miscible solvents for intravenous and intra-arterial injection. *PDA J Pharm Sci Technol*, 55(1):16–23.
- Munkonge, F. M., Dean, D. A., Hillery, E., Griesenbach, U., and Alton, E. W. (2003). Emerging significance of plasmid dna nuclear import in gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 55(6):749–760.
- Navarro, J., Oudrhiri, N., Fabrega, S., and Lehn, P. (1998). Gene delivery systems: Bridging the gap between recombinant viruses and artificial vectors. *Adv Drug Deliv Rev*, 30(1-3):5–11.
- Nichols, B. J. and Lippincott-Schwartz, J. (2001). Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol*, 11(10):406–412.
- Nishikawa, M., Takakura, Y., and Hashida, M. (2005). Pharmacokinetics of plasmid dna-based non-viral gene medicine. *Adv Genet*, 53PA:47–68.
- Ogris, M., Brunner, S., Schüller, S., Kircheis, R., and Wagner, E. (1999). Pegylated dna/transferrin-pei complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther*, 6(4):595–605.
- Ogris, M., Steinlein, P., Kursa, M., Mechtler, K., Kircheis, R., and Wagner, E. (1998). The size of dna/transferrin-pei complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther*, 5(10):1425–1433.
- Ogris, M. and Wagner, E. (2007). Linear polyethylenimine: Synthesis and transfection procedures for in vitro and in vivo. In Friedman, T. and Rossi, J., editors, *Gene Transfer: Delivery and Expression of cDNA and RNA, A Laboratory Manual*, pages 521–528. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ogris, M., Walker, G., Blessing, T., Kircheis, R., Wolschek, M., and Wagner, E. (2003). Tumor-targeted gene therapy: strategies for the preparation of ligand-polyethylene glycol-polyethylenimine/dna complexes. *J Control Release*, 91(1-2):173–181.
- Okuda, T., Niidome, T., and Aoyagi, H. (2004). Cytosolic soluble proteins induce dna release from dna-gene carrier complexes. *J Control Release*, 98(2):325–332.
- Pack, D. W., Hoffman, A. S., Pun, S., and Stayton, P. S. (2005). Design and development of polymers for gene delivery. *Nat Rev Drug Discov*, 4(7):581–593.

- Packhaeuser, C. B., Schnieders, J., Oster, C. G., and Kissel, T. (2004). In situ forming parenteral drug delivery systems: an overview. *Eur J Pharm Biopharm*, 58(2):445–455.
- Pannier, A. K. and Shea, L. D. (2004). Controlled release systems for dna delivery. *Mol Ther*, 10(1):19–26.
- Park, T. G., Jeong, J. H., and Kim, S. W. (2006). Current status of polymeric gene delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 58(4):467–486.
- Parker, M. C., Ellis, H., Moran, B. J., Thompson, J. N., Wilson, M. S., Menzies, D., McGuire, A., Lower, A. M., Hawthorn, R. J., O’Brien, F., Buchan, S., and Crowe, A. M. (2001). Postoperative adhesions: ten-year follow-up of 12,584 patients undergoing lower abdominal surgery. *Dis Colon Rectum*, 44(6):822–829.
- Petersen, H., Fechner, P. M., Martin, A. L., Kunath, K., Stolnik, S., Roberts, C. J., Fischer, D., Davies, M. C., and Kissel, T. (2002a). Polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) copolymers: influence of copolymer block structure on dna complexation and biological activities as gene delivery system. *Bioconjug Chem*, 13(4):845–854.
- Petersen, H., Kunath, K., Martin, A. L., Stolnik, S., Roberts, C. J., Davies, M. C., and Kissel, T. (2002b). Star-shaped poly(ethylene glycol)-block-polyethylenimine copolymers enhance dna condensation of low molecular weight polyethylenimines. *Biomacromolecules*, 3(5):926–936.
- Plank, C., Oberhauser, B., Mechtler, K., Koch, C., and Wagner, E. (1994). The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems. *J Biol Chem*, 269(17):12918–12924.
- Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M., Mechtler, K., and Wagner, E. (1992). Gene transfer into hepatocytes using asialoglycoprotein receptor mediated endocytosis of dna complexed with an artificial tetra-antennary galactose ligand. *Bioconjug Chem*, 3(6):533–539.
- Pollard, H., Remy, J. S., Loussouarn, G., Demolombe, S., Behr, J. P., and Escande, D. (1998). Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J Biol Chem*, 273(13):7507–7511.
- Putnam, D. (2006). Polymers for gene delivery across length scales. *Nat Mater*, 5(6):439–451.

- Ramchandani, M. and Robinson, D. (1998). In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from plga 50:50 implants. *J Control Release*, 54(2):167–175.
- Rathbone, M. J., Hadgraft, J., and Roberts, M. S., editors (2003a). *Modified-release drug delivery technology*, pages 648–656. Marcel Dekker, Inc., 126 edition.
- Rathbone, M. J., Hadgraft, J., and Roberts, M. S., editors (2003b). *Modified-release drug delivery technology*, pages 639–646. Marcel Dekker, Inc., 126 edition.
- Read, M. L., Singh, S., Ahmed, Z., Stevenson, M., Briggs, S. S., Oupicky, D., Barrett, L. B., Spice, R., Kendall, M., Berry, M., Preece, J. A., Logan, A., and Seymour, L. W. (2005). A versatile reducible polycation-based system for efficient delivery of a broad range of nucleic acids. *Nucleic Acids Res*, 33(9).
- Rejman, J., Bragonzi, A., and Conese, M. (2005). Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Mol Ther*, 12(3):468–474.
- Richard, J., Melikov, K., Brooks, H., Prevot, P., Lebleu, B., and Chernomordik, L. (2005). Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 280(15):15300.
- Rosenberg, S. A., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R. A., Moen, R., Karson, E. M., Lotze, M. T., Yang, J. C., and Topalian, S. L. (1990). Gene transfer into humans—immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med*, 323(9):570–578.
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R., and Anderson, R. G. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, 68(4):673–682.
- Rout, U. K., Saed, G. M., and Diamond, M. P. (2005). Expression pattern and regulation of genes differ between fibroblasts of adhesion and normal human peritoneum. *Reprod Biol Endocrinol*, 3:1–1.
- Rudolph, C., Lausier, J., Naundorf, S., Müller, R. H., and Rosenecker, J. (2000). In vivo gene delivery to the lung using polyethylenimine and fractured polyamidoamine dendrimers. *J Gene Med*, 2(4):269–278.

- Rudolph, C., Plank, C., Lausier, J., Schillinger, U., Müller, R. H., and Rosenecker, J. (2003). Oligomers of the arginine-rich motif of the hiv-1 tat protein are capable of transferring plasmid dna into cells. *J Biol Chem*, 278(13):11411–11418.
- Rudolph, C., Schillinger, U., Ortiz, A., Plank, C., Golas, M. M., Sander, B., Stark, H., and Rosenecker, J. (2005). Aerosolized nanogram quantities of plasmid dna mediate highly efficient gene delivery to mouse airway epithelium. *Mol Ther*, 12(3):493–501.
- Rudolph, C., Schillinger, U., Ortiz, A., Tabatt, K., Plank, C., Müller, R. H., and Rosenecker, J. (2004). Application of novel solid lipid nanoparticle (sln)-gene vector formulations based on a dimeric hiv-1 tat-peptide in vitro and in vivo. *Pharm Res*, 21(9):1662–1669.
- Rungsardthong, U., Deshpande, M., Bailey, L., Vamvakaki, M., Armes, S. P., Garnett, M. C., and Stolnik, S. (2001). Copolymers of amine methacrylate with poly(ethylene glycol) as vectors for gene therapy. *J Control Release*, 73(2-3):359–380.
- Rungsardthong, U., Ehtezazi, T., Bailey, L., Armes, S. P., Garnett, M. C., and Stolnik, S. (2003). Effect of polymer ionization on the interaction with dna in nonviral gene delivery systems. *Biomacromolecules*, 4(3):683–690.
- Sakamoto, T., Oshima, Y., Nakagawa, K., Ishibashi, T., Inomata, H., and Sueishi, K. (1999). Target gene transfer of tissue plasminogen activator to cornea by electric pulse inhibits intracameral fibrin formation and corneal cloudiness. *Hum Gene Ther*, 10(15):2551–2557.
- Sakata, Y., Yoshioka, W., Tohyama, C., and Ohsako, S. (2007). Internal genomic sequence of human cyp1a1 gene is involved in superinduction of dioxin-induced cyp1a1 transcription by cycloheximide. *Biochem and Biophys Research Commun.*, 355:687–692.
- Schneider, H., Harbottle, R. P., Yokosaki, Y., Kunde, J., Sheppard, D., and Coutelle, C. (1998). A novel peptide, plaetidgielty, for the targeting of alpha9beta1-integrins. *FEBS Lett*, 429(3):269–273.
- Seisenberger, G., Ried, M. U., Endress, T., Büning, H., Hallek, M., and Bräuchle, C. (2001). Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science*, 294(5548):1929–1932.
- Severin, N., Zhuang, W., Ecker, C., Kalachev, A. A., Sokolov, I. M., and Rabe, J. P. (2006). Blowing dna bubbles. *Nano Lett*, 6(11):2561–2566.

- Shively, M., Coonts, B., Renner, W., Southard, J., and Bennett, A. (1995). Physico-chemical characterization of a polymeric injectable implant delivery system. *Journal of Controlled Release*, 33(2):237–243.
- Sidi, A. A., Ohana, P., Benjamin, S., Shalev, M., Ransom, J. H., Lamm, D., Hochberg, A., and Leibovitch, I. (2008). Phase i/ii marker lesion study of intravesical bc-819 dna plasmid in h19 over expressing superficial bladder cancer refractory to bacillus calmette-guerin. *J Urol*, 180(6):2379–2383.
- Sieverling, N. (2005). *Synthesis and Characterization of Modified Polyethyleneimine for Application as Non Viral Gene Carriers*. PhD thesis, University of Potsdam.
- Simberg, D., Danino, D., Talmon, Y., Minsky, A., Ferrari, M. E., Wheeler, C. J., and Barenholz, Y. (2001). Phase behavior, dna ordering, and size instability of cationic lipoplexes. relevance to optimal transfection activity. *J Biol Chem*, 276(50):47453–47459.
- Simões, S., Filipe, A., Faneca, H., Mano, M., Penacho, N., Düzgünes, N., and de Lima, M. P. (2005). Cationic liposomes for gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 2(2):237–254.
- Singh, U. V. and Udupa, N. (1997). In vitro characterization of methotrexate loaded poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres and antitumor efficacy in sarcoma-180 mice bearing tumor. *Pharm Acta Helv*, 72(3):165–173.
- Sitter, T., Toet, K., Quax, P., and Kooistra, T. (1999). Fibrinolytic activity of human mesothelial cells is counteracted by rapid uptake of tissue-type plasminogen activator. *Kidney Int*, 55(1):120–129.
- Snyder, E. L. and Dowdy, S. F. (2004). Cell penetrating peptides in drug delivery. *Pharm Res*, 21(3):389–393.
- Sonawane, N. D., Szoka, F. C., and Verkman, A. S. (2003). Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances dna transfer by polyamine-dna polyplexes. *J Biol Chem*, 278(45):44826–44831.
- Soundara Manickam, D., Bisht, H., Wan, L., Mao, G., and Oupicky, D. (2005). Influence of TAT-peptide polymerization on properties and transfection activity of TAT/DNA polyplexes. *Journal of Controlled Release*, 102(1):293–306.
- Spiegel, A. and Noseworthy, M. (1963). [use of non-aqueous solvents in parenteral products]. *J Pharm Sci*, 52:917–927.

- Stolnik, S., Illum, L., and Davis, S. S. (1995). Long circulating microparticulate drug carriers. *Adv Drug Del Rev*, 16(2):195–214.
- Suk, J., Suh, J., Choy, K., Lai, S., Fu, J., and Hanes, J. (2006). Gene delivery to differentiated neurotypic cells with RGD and HIV Tat peptide functionalized polymeric nanoparticles. *Biomaterials*.
- Szcepek, M., Brondani, V., Büchel, J., Serrano, L., Segal, D. J., and Cathomen, T. (2007). Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 25(7):786–793.
- Talsma, H., Cherng, J., Lehrmann, H., Kursa, M., Ogris, M., Hennink, W. E., Cotten, M., and Wagner, E. (1997). Stabilization of gene delivery systems by freeze-drying. *Int J Pharm*, 157:233–238.
- Tang, G. P., Zeng, J. M., Gao, S. J., Ma, Y. X., Shi, L., Li, Y., Too, H. P., and Wang, S. (2003). Polyethylene glycol modified polyethylenimine for improved cns gene transfer: effects of pegylation extent. *Biomaterials*, 24(13):2351–2362.
- Tatum, E. L. (1966). Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine. *Perspect Biol Med*, 10(1):19–32.
- Thomas, M. and Klibanov, A. M. (2002). Enhancing polyethylenimine’s delivery of plasmid dna into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(23):14640–14645.
- Thomas, M. and Klibanov, A. M. (2003). Non-viral gene therapy: polycation-mediated dna delivery. *Appl Microbiol Biotechnol*, 62(1):27–34.
- Thorén, P. E., Persson, D., Esbjörner, E. K., Goksör, M., Lincoln, P., and Nordén, B. (2004). Membrane binding and translocation of cell-penetrating peptides. *Biochemistry*, 43(12):3471–3489.
- Tiera, M. J., Winnik, F. O., and Fernandes, J. C. (2006). Synthetic and natural polycations for gene therapy: state of the art and new perspectives. *Curr Gene Ther*, 6(1):59–71.
- Treutner, K. H. and Schumpelick, V. (2000). [prevention of adhesions. wish and reality]. *Chirurg*, 71(5):510–517.
- Tuschl, T. (2001). Rna interference and small interfering rnas. *ChemBiochem*, 2(4):239–245.

- Tuschl, T. and Borkhardt, A. (2002). Small interfering rnas: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy. *Mol Interv*, 2(3):158–167.
- Tyagi, M., Rusnati, M., Presta, M., and Giacca, M. (2001). Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry*, 276(5):3254–3261.
- Ungaro, F., De Rosa, G., Miro, A., and Quaglia, F. (2003). Spectrophotometric determination of polyethylenimine in the presence of an oligonucleotide for the characterization of controlled release formulations. *J Pharm Biomed Anal*, 31:143–149.
- Valentine, R. C., Shapiro, B. M., and Stadtman, E. R. (1968). Regulation of glutamine synthetase. xii. electron microscopy of the enzyme from escherichia coli. *Biochemistry*, 7(6):2143–2152.
- van de Wetering, P., Cherng, J., Talsma, H., and Hennink, W. (1997). Relation between transfection efficiency and cytotoxicity of poly(2-(dimethylamino) ethyl methacrylate)/plasmid complexes. *J Control Release*, 49(1):59–69.
- van de Wetering, P., Cherng, J. Y., Talsma, H., Crommelin, D. J., and Hennink, W. E. (1998). 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate based (co)polymers as gene transfer agents. *J Control Release*, 53(1-3):145–153.
- Van Driessche, A., Van de Velde, A. L., Nijs, G., Braeckman, T., Stein, B., De Vries, J. M., Berneman, Z. N., and Van Tendeloo, V. F. (2009). Clinical-grade manufacturing of autologous mature mrna-electroporated dendritic cells and safety testing in acute myeloid leukemia patients in a phase i dose-escalation clinical trial. *Cytotherapy*, 11(5):653–668.
- Verbaan, F., van Dam, I., Takakura, Y., Hashida, M., Hennink, W., Storm, G., and Oussoren, C. (2003). Intravenous fate of poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)-based polyplexes. *Eur J Pharm Sci*, 20(4-5):419–427.
- Verbaan, F. J., Klein Klouwenberg, P., van Steenis, J. H., Snel, C. J., Boerman, O., Hennink, W. E., and Storm, G. (2005). Application of poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)-based polyplexes for gene transfer into human ovarian carcinoma cells. *Int J Pharm*, 304(1-2):185–192.
- Verbaan, F. J., Oussoren, C., Snel, C. J., Crommelin, D. J., Hennink, W. E., and Storm, G. (2004). Steric stabilization of poly(2-(dimethylamino)ethyl

- methacrylate)-based polyplexes mediates prolonged circulation and tumor targeting in mice. *J Gene Med*, 6(1):64–75.
- Vijayanathan, V., Thomas, T., and Thomas, T. J. (2002). Dna nanoparticles and development of dna delivery vehicles for gene therapy. *Biochemistry*, 41(48):14085–14094.
- Villemejjane, J. and Mir, L. M. (2009). Physical methods of nucleic acid transfer: general concepts and applications. *Br J Pharmacol*, 157(2):207–219.
- Viviani, V. R. (2002). The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases. *Cell Mol Life Sci*, 59(11):1833–1850.
- Wadia, J., Stan, R., Dowdy, S., et al. (2004). Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nature medicine*, 10(3):310–315.
- Wagner, E. (2004). Strategies to Improve DNA Polyplexes for in Vivo Gene Transfer: Will Artificial Viruses Be the Answer? *Pharmaceutical research*, 21(1):8–14.
- Wagner, E., Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M., and Birnstiel, M. L. (1992). Influenza virus hemagglutinin ha-2 n-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-dna complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(17):7934–7938.
- Walker, G. F., Fella, C., Pelisek, J., Fahrmeir, J., Boeckle, S., Ogris, M., and Wagner, E. (2005). Toward synthetic viruses: endosomal ph-triggered deshielding of targeted polyplexes greatly enhances gene transfer in vitro and in vivo. *Mol Ther*, 11(3):418–425.
- Wightman, L., Kircheis, R., Rössler, V., Carotta, S., Ruzicka, R., Kursa, M., and Wagner, E. (2001). Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med*, 3(4):362–372.
- Wiman, A. (1998). Tissue plasminogen activator (tPA) antigen in plasma: correlation with different tPA/inhibitor complexes. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 58(6):475–484.
- Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner, P. L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 247(4949 Pt 1):1465–1468.

- Yagmurlu, A., Barlas, M., Gursel, I., and Gokcora, I. H. (2003). Reduction of surgery-induced peritoneal adhesions by continuous release of streptokinase from a drug delivery system. *Eur Surg Res*, 35(1):46–49.
- Yamamoto, A., Kormann, M., Rosenecker, J., and Rudolph, C. (2009). Current prospects for mrna gene delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 71(3):484–489.
- Yeo, Y., Bellas, E., Highley, C. B., Langer, R., and Kohane, D. S. (2007). Peritoneal adhesion prevention with an in situ cross-linkable hyaluronan gel containing tissue-type plasminogen activator in a rabbit repeated-injury model. *Biomaterials*, 28(25):3704–3713.
- Yew, N. S., Zhao, H., Wu, I. H., Song, A., Tousignant, J. D., Przybylska, M., and Cheng, S. H. (2000). Reduced inflammatory response to plasmid dna vectors by elimination and inhibition of immunostimulatory cpg motifs. *Mol Ther*, 1(3):255–262.
- Zhang, S., Xu, Y., Wang, B., Qiao, W., Liu, D., and Li, Z. (2004). Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *J Control Release*, 100(2):165–180.
- Zou, S., Scarfo, K., Nantz, M. H., and Hecker, J. G. (2010). Lipid-mediated delivery of rna is more efficient than delivery of dna in non-dividing cells. *Int J Pharm*, 389(1-2):232–243.
- Zou, S. M., Erbacher, P., Remy, J. S., and Behr, J. P. (2000). Systemic linear polyethylenimine (l-pei)-mediated gene delivery in the mouse. *J Gene Med*, 2(2):128–134.
- Zuidam, N. J., Posthuma, G., de Vries, E. T., Crommelin, D. J., Hennink, W. E., and Storm, G. (2000). Effects of physicochemical characteristics of poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)-based polyplexes on cellular association and internalization. *J Drug Target*, 8(1):51–66.

Summary

Gene therapy is currently under development and investigation for the treatment of various inherited and acquired diseases such as cystic fibrosis, vaccination and cancer. Viral systems have dominated the field of clinical trials in gene therapy due to high efficiency in the past. However, serious side effects led to the emerging field of non-viral gene therapy which shows i) high viability in vector design , ii) low risk of mutagenic integration, iii) high encapsulation efficiencies and iv) low immunogenicity.

Delivery systems for non-viral gene therapy have been widely investigated in the past few years. Although a lot of different technologies are currently available, none of them totally fulfilled the requirements of successful non-viral gene therapy. In detail, non-viral gene delivery systems should efficiently deliver the transgene into diseased cells, remain colloidal stable at high nucleic acid concentrations and avoid inducing adverse effects. Nucleic acids as novel compounds in pharmaceutical applications are of high interest. However they have to be delivered intracellular to reach their target molecule.

Delivery systems based on cationic polymers such as polyethylenimine (PEI) or poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate) (P(DMAEMA)) have been extensively studied as gene transfer agents in previous studies (Demeineix and Behr, 2005; Dubruel and Schacht, 2006; Lungwitz et al., 2005). These cationic polymers condense plasmid DNA (pDNA) into gene vector nanoparticles and efficiently transfect cells *in vitro*. However, *in vivo* application of non-viral gene vector nanoparticles are still limited due to i) low biocompatibility, ii) colloidal instability of gene vectors in physiological fluids at high plasmid concentrations, iii) rapid clearance from the bloodstream after systemic application and iv) low transfection efficiency compared to viral systems. But such delivery systems can be applied locally in order to target lung tissue and treat inherent diseases such as zystic fibroses or cancer with higher efficiency.

The overall aim of the first part of this thesis was the evaluation of novel polymeric based delivery systems for non-viral gene transfer, particularly into lung cells. Biodegradable chimeric polymer-polypeptide conjugates were investigated in detail for that purpose. Oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylates (OEGMA) of various chain-lengths (i.e. 9, 23 or 45 EG units) and N,N-dimethylaminoethyl methacrylate (DMAEMA) have been copolymerized by atom transfer radical polymerization (ATRP) yielding well-defined P(DMAEMA-*co*-OEGMA) copolymers with increasing PEGylation (OEGMA molar fractions (F_{OEGMA}) and OEGMA-chain-lengths) but comparable degrees of polymerization (DP = 120). These systems could therefore be easily tailor-made for different types of nucleic acid and particle characteristics of interest. A summary of the assessment in comparison to frequently used cationic polymers like br-PEI and P(DMAEMA) is given in table 5.2.

	P(DMAEMA- <i>co</i> -OEGMA)	P(DMAEMA)	br-PEI/l-PEI
Synthesis	++	+/-	+/-
Complexation	+/-	+	+
Nanosized particles	+	-	+/-
Colloidal stability	++	-	+/-
Toxicity	++	-	-
Transfection efficiency	+/-	+/-	+
Cellular binding	+/-	+	+
Internalization	+	+	+
Endosomal Release	-	+	+

Table 5.2: Evaluation of P(DMAEMA-*co*-OEGMA) copolymers as novel non-viral gene delivery systems in comparison to standards like br-PEI und P(DMAEMA), ++ excellent, + good, +/- ordinary, - questionable

Biophysical characterization of polyplexes revealed that increased OEGMA molar ratios and OEGMA chain-lengths strongly influenced particle size, morphology and zeta potential, thereby allowing to form tailor-made gene vector complexes. P(DMAEMA-*co*-OEGMA) copolymers formed gene vectors with excellent colloidal stability at high plasmid DNA concentrations in isotonic solution and low cytotoxicity even at a low degree of PEGylation, which are both critical parameters for *in vivo* application. The shielding effect of the PEG side-chains was obvious for both plasmid DNA and messenger RNA (mRNA) complexes as evidenced by a reduction of the surface charge. Zetapotential measurements further revealed that P(DMAEMA-*co*-OEGMA) copolymers lead to the formation of a core-shell-corona like particle

structure, which is stabilized in aqueous media by a hydrophilic PEG shell. This PEG outer-corona probably hampers the aggregation of nanoparticles and shields the positively poly-ion corona, thereby showing good biocompatibility.

Further, electron and atom force microscopy images clearly indicate that P(DMAEMA-*co*-OEGMA) copolymers were capable of condensing both pDNA and mRNA into gene vector particles of nanometer size. While binding efficiency and particle morphology inversely correlated with PEGylation degree for pDNA, PEGylation of P(DMAEMA) improved mRNA binding. Complexes with pDNA were of irregular round shape with 100-200 nm in size, while mRNA particles were significantly smaller and more distinct with an overall average size of 40 nm. Increasing amounts of PEGylation resulted, however, in gradual loss of the compact, globular gene vector shape and appearance of filamentous structures which can be attributed to reduced pDNA condensation and is in agreement with an increase in gene vector size and negative surface charge.

Transfection efficiency of most efficient P(DMAEMA-*co*-OEGMA) copolymers was found to be comparable with P(DMAEMA) and approximately 10-fold lower compared to br-PEI 25 kDa independent of the cell type used. Surprisingly, PEGylation of P(DMAEMA) increased mRNA transfection, most likely due to better stability of nanosized polyplexes. The discrepancy between PEGylated polyplexes and the homopolymer does not simply appear to represent the exclusive cause of a reduced cellular uptake. Although OEGMA copolymerization can reduce gene vector binding with the cell membrane at higher OEG-amounts, cellular internalization of the bound complexes was less affected. Thus, a combination of reduced cellular binding, endolysosomal escape and loss of compact gene vector shape at higher degrees of PEGylation seems to limit transfection efficiency of P(DMAEMA-*co*-OEGMA) copolymer gene vectors. Although changes in polymer design increased the buffering capacity and resulted in a 6-fold increase in transfection efficiency, buffering capacity is not the only key to efficient gene delivery (Dubruel et al., 2000). Thus, electrostatical or covalent coupling with a endosomal lytical peptide INF7 improved gene expression at least 20-fold compared to P(DMAEMA), although both polymers have similar buffering capacities. Codelivery of INF 7 with the TAT-Dimer, a cell penetrating peptide with an NLS function, further increased gene transfer efficiency of (DMAEMA-*co*-OEGMA) copolymers 100-fold.

Despite these observations, optimized P(DMAEMA-*co*-OEGMA) gene vectors remained stable under conditions for *in vivo* application leading to 7-

fold greater gene expression in the lung compared to br-PEI. In summary, the *in vivo* results emphasize that PEGylation of cationic polymers can enhance colloidal stability under conditions which are essential for *in vivo* applications (high salt and pDNA concentrations) and therefore improve gene transfer to the lung. Therefore, a higher degree of PEGylation was required compared to *in vitro* applications. Tailor-made P(DMAEMA-co-OEGMA) copolymers are promising non-viral gene transfer agents which fulfil the requirements for successful *in vivo* gene delivery. Cationic polymers have been intensively investigated for plasmid DNA delivery, but only a few studies address their use for mRNA transfection. Hence, P(DMAEMA-co-OEGMA) copolymers may help to further improve mRNA delivery using cationic polymers whose potential in this context is still underestimated.

Biodegradable polymeric matrices have been introduced for the sustained release of genes to facilitate the development of nucleic acids as novel pharmaceutical compounds and augment local gene transfer. Therefore *in situ* forming implants have been already proposed as an alternative to *ex vivo* matrix formation for protein delivery, where the biodegradable implant is formed upon injection into the body. Thus, a sprayable biodegradable *in situ* forming film encapsulating non-viral gene vectors was developed in the second part of the thesis. For this purpose, an application system from Baxter was used comprised of a water-insoluble biodegradable polymer dissolved in a pharmaceutically acceptable water-miscible solvent (lipophilic part) and water for injections (hydrophilic part). PLGA polymers of different chain-length and compositions (PLA/PGA-ratio, free *versus* ester end groups) were used as polymer-matrix composites in a 10 % (w/v) solution to control release kinetics. These polymers have been already approved by the FDA for parenteral applications. Lyophilized pDNA/l-PEI polyplexes as active pharmaceutical ingredients (APIs) were successfully encapsulated within the polymer matrix as it solidifies. Therefore, two different encapsulation techniques were tested in feasibility studies. The API was either dissolved in the hydrophilic part (type A) or dispersed in the lipophilic part (type B) of the application system. First *in vitro* release studies from *in situ* forming films showed prolonged release of polyplexes over a 4-weeks time period.

Mechanical strength, matrix quality, i.e. encapsulation amount of polymer into the matrix, and release kinetics from *in situ* formed films strongly correlated with the solvent and the chain-length of the PLGA polymer used. In this context, solvents with decreasing water solubility (Glycerolformal > DMI >> Tetraglykol) already used for parenteral applications were tested, among which Glycerolformal showed the best biocompatibility. Further stu-

dies revealed that matrix quality increased with larger chain-lengths and lipophilicity of the PLGA polymers as well as good water-soluble solvents, while mechanical strength of the matrix increased with polymers of large chain-lengths, but decreased using more hydrophilic solvents (DMI > Glycerolformal >> Tetraglykol).

Dissolution experiments were performed with PLGA polymers of free end groups, named Rhesomer[®] RG H series, since these are assumed to show faster degradation times. *In vitro* release from *in situ* forming films based on these polymers were mainly influenced by the solvent, the chain-length of the polymer and to a minor extent by the encapsulation technique used. In general, polyplexes incorporated within the lipophilic part showed lower burst with more retained drug release. Fast phase-separation was prone to good matrix quality and zero order release kinetics without initial burst. Therefore, good water-miscible solvents and a low solubility of the matrix forming polymer in the solvent was required, which was fulfilled by Glycerolformal or DMI combined with the long chain polymer. Both provided spray films with diffusion- and erosion controlled release kinetics over a 4-weeks time period with high burst release detected for DMI in contrast to Glycerolformal. Tetraglykol, however, which was the most lipophilic solvent tested, formed matrices of high mechanical strength with extremely prolonged release kinetics.

Sprayable biodegradable *in situ* forming films provided robust and prolonged gene expression over a 1-month release time. Hence, these barriers systems combined with prolonged release of API might be useful to overcome the shortcomings of treating peritoneal adhesions, where two weeks after abdominal surgery fibrous bands of scar tissue are formed between tissues and organs as a result of injury. In addition, *in situ* forming systems are suitable for laparoscopic applications. Nowadays, the ratio between tissue plasminogen activator (tPA) and the plasminogen activator inhibitor (PAI-1) appears to be a key driver for the formation of permanent adhesions, which varies between 3.5 and 0.4 in normal and inflamed tissue, respectively. Hence, encapsulation of a plasmid encoding for tPA (ptPA) as an biological active agent in these films composed of Glycerolformal/Rhesomer[®] RG 504 H revealed a 4-fold increase in the tPA-level (2 ng/ml) compared to the empty control over 2-weeks *in vitro* which is in line with the reduction observed in diseased tissue. Besides, it has been shown that PAI-1 increased up to 17-fold in inflamed tissue leading to extremely variable tPA/PAI-1 ratios. As a result codelivery of ptPA and siRNA against PAI-1 without matrix encapsulation further led to 8.3-fold increase of tPA/PAI-1 ratio in cell culture after 48 h,

whereas pDNA alone improved the ratio by only 4.5-fold. The further relevance of the delivery systems by incorporating both siRNA and pDNA into the sprayable film has to be demonstrated in suitable animal models. Nevertheless, *in situ* forming controlled release systems using biocompatible and/or biodegradable polymers provide an attractive alternative approach for gene therapy to overcome short-term gene expression and safety problems related to high concentrations of nucleic acid or gene carriers not only for the treatment of adhesive diseases.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von PD Dr. Carsten Rudolph am Forschungszentrum des Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Mein außerordentlicher Dank gilt ihm für die Auswahl des kreativen Themas, die wissenschaftliche Anleitung, anregende Diskussionen und konstruktive Kritik. Bedanken möchte ich mich auch für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die mir gewährten Freiheiten, sowie seinen ungebrochener Optimismus bei der Erstellung der Arbeit.

Im gleichen Maße möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Rainer Müller, für die hervorragende Zusammenarbeit und Betreuung dieser Arbeit bedanken. Die gemeinsamen Treffen an der Universität in Berlin oder auf Kongressen waren für mich stets eine Bereicherung.

Den Kollegen in der Arbeitsgruppe Rudolph/Rosenecker danke ich für die zahlreichen fachlichen Diskussionen und die Unterstützung meiner Arbeit, sowie die vielen schönen Stunden auch außerhalb des Labors. Besonderen Dank gilt Dr. Manish Aneja-Kumar und Dr. Nihal Yüksesday für die fachliche Betreuung in der Arbeitsgruppe, Dr. Markus Elfinger und Dr. Christof Maucksch für die gute Einarbeitung in viele neue Methoden zu Beginn meiner Doktorandenzeit, sowie Marta Illenyi und Rabea Imker für ihre Unterstützung in der Laborarbeit. Mein außerordentlicher Dank gilt Dr. Markus Elfinger für die schnelle und gewissenhafte Durchsicht der Arbeit und die zahlreiche fachliche Unterstützung.

Dr. Jean François Lutz und Dr. Özgür Akdemir danke ich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des DFG Projekts, ohne die der erste Teil der Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Mein Dank gilt auch PD Dr. C. Plank und Christian Koch für die Unterstützung in der Peptidsynthese, PD Dr. Burkhard Luy und Dr. Grit Kummerlöwe für die Polymersynthese und die zahlreichen NMR-Aufnahmen, sowie Dr. Monika Golas und Dr. Björn Sander für die Erstellung der elektronen-mikroskopischen Aufnahmen. Prof.

Marc Schneider danke ich für die AFM Aufnahmen und Dr. Oliver Lieg für die rheologischen Untersuchungen der Sprühfilme.

An dieser Stelle möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern für ihre immerwährende uneingeschränkte Unterstützung danken, ohne die mein Studium und die anschließende Doktorarbeit niemals möglich gewesen wären.

Nicht zuletzt danke ich Florian für seine Liebe, seine fortwährende Geduld und Unterstützung, insbesondere in den letzten Monaten dieser Arbeit.

Publikationen

Zeitschriftenartikel

Lutz J-F, Andrieu J, **Uezguen S**, Rudolph C and Agarwal S. Biocompatible, Thermoresponsive, and Biodegradable: Simple Preparation of „All In-One“ Biorelevant Polymers. *Macromolecules*, 2007 Nov, 40(24): 8540-8543.

Elfinger M, **Uezguen S** and Rudolph C. Nanocarriers for gene delivery-polymer structure, targeting ligands and controlled-release devices. *Current Nanoscience*, 2008 Nov, 4 (4): 322-353.

Elfinger M, Geiger J, Hasenpusch G, **Uezguen S**, Sieveling N, Aneja-Kumar M, Maucksch C and Rudolph C. Targeting of the *beta 2*-adrenoceptor increases nonviral gene delivery to pulmonary epithelial cells *in vitro* and lungs *in vivo*. *Journal of Controlled Release*, 2009 Jan, 135(3): 234-241.

Elfinger M, Pfeifer C, **Uezguen S**, Golas M, Sander B, Maucksch C, Stark H, Aneja-Kumar M and Rudolph C. Selfassembly of ternary Insulin- Polyethylenimin (PEI)-DNA nanoparticles for enhanced gene delivery and expression in alveolar epithelial cells. *Biomacromolecules*, 2009 Oct, 10(10): 2912-20.

Aneja-Kumar M, Geiger J, Imker R, **Uezguen S**, Kormann M, Hasenpusch G, Maucksch C and Rudolph C. Optimization of Streptomyces bacteriophage fC31 integrase system to prevent post integrative gene silencing in pulmonary type II cells. *Experimental and Molecular Medicine*, 2009 Dec, 41(12): 919-34.

Uezguen S, Akdemir O, Hasenpusch G, Maucksch C, Golas M, Sander B, Imker R, Stark H, Lutz J-F and Rudolph C. Characterization of tailor made copolymers of oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate (OEGMA) and N,N-dimethylaminoethyl methacrylate (DMAEMA) as non viral gene transfer agents-Influence of macromoleculare structure non gene vector particle properties and transfection efficiency. *Biomacromolecules*, 2010, 11(1): 39-50.

Uezguen S, Nica G, Pfeifer C, Akdemir O, Boscino M, Lutz J-F, Schneider M, Rosenecker J and Rudolph C. PEGylation of poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate) (P(DMAEMA)) improves nanoparticle formation and transfection efficiency of messenger RNA. *In Vorbereitung*

Uezguen S, Lieleg O, Imker R and Rudolph C. Sprayable *in situ* forming films as novel controlled delivery systems for non-viral gene delivery. *In Vorbereitung*

Kongressbeiträge

Uezguen S, Akdemir O, Maucksch C, Lutz J-F and Rudolph C. Novel poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate)-graftpolyethylenglycol (pDMAEMA-g-PEG) copolymers as nonviral gene transfer agents. 14th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Athens, Greece, Nov 9-12, 2006

Uezguen S, Akdemir O, Maucksch C, Lutz J-F and Rudolph C. Co-delivery of the endosome-disrupting peptide INF 7 improves gene delivery of poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate)-graft-polyethylenglycol (pDMAEMA -g-PEG) copolymers. 34th Annual Meeting of the Controlled Release Society, Long Beach, USA, Jul 7-11 2007.

Elfinger M, **Uezguen S**, Kummerloewe G, Luy B and Rudolph C. *In vitro* gene transfer efficiency of urocanic acid-modified non-viral polymeric gene transfer agents. 34th Annual Meeting of the Controlled Release Society, Long Beach, USA, Jul 7-11 2007.

Elfinger M, **Uezguen S**, Sieverling N, Aneja M, Maucksch C and Rudolph C. Targeting of the *beta* 2-Adrenoceptor Increases Nonviral Gene Delivery to Pulmonary Epithelial Cells *in vitro* and Lungs *in vivo*. 11th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, Boston, USA, May 28-June 1, 2008.

Uezguen S, Akdemir O, Maucksch C, Lutz J-F and Rudolph C. Characterization of pDMAEMA-graft-PEG copolymers as non-viral gene transfer agents. European Workshop on Particulate Systems 2008, Berlin, May 30-31, 2008.

Geiger JP, **Uezguen S**, Aneja MK and Rudolph C. Development of Nonviral Gene Vectors for Gene Delivery to the Lungs and Blood Cells, Ehrlich II. 2nd World Conference on Magic Bullets, Nürnberg, Oct 2-5, 2008.