

3 pDNA-Clearance und Kinetik der Luziferaseexpression in der Mauslunge nach Aerosolapplikation oder intranasaler Instillation von PEI-pDNA Komplexen

3.1 Konzentrationsabhängige Stabilität von PEI-pDNA Komplexen

Für den Gentransfer *in vivo* benötigt man konzentrierte Genvektorformulierungen, weil einerseits eine hohe Dosis an pDNA für eine erfolgreiche Genexpression notwendig ist und auf der anderen Seite nur ein begrenztes Volumen – vor allem intranasal oder i.v. - verabreicht werden kann. Daher ergeben sich häufig kolloidale Instabilitäten der Genvektorformulierungen, die zu einer Präzipitation der pDNA und somit zu einem Aktivitätsverlust führen kann. Deshalb wurden die Stabilität der PEI-pDNA Komplexe bei hohen Konzentrationen und der Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität untersucht. Es wurden vier verschiedene pDNA Konzentrationen bei drei verschiedenen pH-Werten für die Komplexformulierung getestet (Tabelle 4).

Die Untersuchungen ergaben, dass für die höchste komplexierte pDNA Konzentration von 1 mg/ml die obere pH-Schwelle pH=6 ist. Bei einem höheren pH-Wert von 7,4 liegt die maximale komplexierte pDNA Konzentration bei 0,75 mg/ml. Es ist auch bei einem niedrigen pH-Wert von 5 nicht möglich, eine höhere Konzentration als 1 mg/ml der pDNA in Komplexen zu erreichen (die pDNA fällt aus). Die Größe der PEI-pDNA Partikel ist von der Konzentration der pDNA abhängig und beträgt ~100 nm bei einer Konzentration von 0,25 mg/ml. Die Größe steigt mit zunehmender pDNA Konzentration bis auf 150 nm und 200 nm an. Die Partikel waren für mindestens 50 min. stabil (keine Größenänderung). Das Zetapotential der Partikel für die Aerosolapplikation (pH=7,4; pDNA 0,25 mg/ml) und für die intranasale Instillation (pH=6; pDNA 1,0 mg/ml) wurde vor der Gabe gemessen. Die Oberflächenladung der Partikel war leicht positiv und es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Formulierungen.

[pCMVLuc]	Partikeldurchmesser		
	[nm] bei pH=5	[nm] bei pH=6	[nm] bei pH=7,4
0.25 mgml ⁻¹	90±0.9	97±1.9	97±0.9
0.5 mgml ⁻¹	121±1.3	127±1.5	104±0.9
0.75 mgml ⁻¹	172±0.2	148±1.6	160±1.8
1.0 mgml ⁻¹	197±3.1	196±1.8	Präzipitation der DNA

Tabelle 4 Größe der PEI-pDNA Partikel in Abhängigkeit des pH-Wertes

3.2 Pulmonale pDNA-Clearance nach Aerosolapplikation oder intranasaler Instillation von PEI-pDNA Komplexen

Die Clearance wurde aus verschiedenen Lungenkompartimenten - Lungengewebe, BALF Zellen und Überstand der BALF - nach Aerosolapplikation oder intranasaler Instillation untersucht. Die pDNA Clearance aus dem Lungengewebe war 3,5-fach höher nach intranasaler Instillation als nach Aerosolapplikation (Tabelle 5, Abb. 10 A). Dieses spiegelte sich in der Eliminationskonstante wider, die nach intranasaler Gabe 4,9-fach höher war verglichen mit der Gabe als Aerosol. Sieben Tage nach der Aerosolapplikation konnten 44% der im Lungengewebe deponierten pDNA Menge (C_{max}) detektiert werden. Die Halbwertszeit ($T_{1/2}$) der pDNA im Lungengewebe betrug dabei 75,4 h (Tabelle 5, Abb. 10 A). Im Gegensatz dazu wurden nach intranasaler Instillation innerhalb von 24 h 90% der pDNA aus dem murinen Lungengewebe eliminiert (Tabelle 5, Abb. 10 A) und die Halbwertszeit der pDNA im Lungengewebe betrug nur 15,4 h (Tabelle 5). Die AUC (*Aerea Under the Curve*) der Mauslunge für pCMVLuc war nach Aerosolapplikation 2,5-fach größer als nach intranasaler Instillation (Tabelle 5), was zur oben beschriebenen erhöhten Clearance nach Instillation passt.

Während nach der Inhalation der PEI-pDNA Partikel die pDNA Level in BALF Zellen und

BALF Überstand sehr gering waren, konnten im Vergleich dazu nach intranasaler Instillation 400- und 38-fach höhere Level in BALF Zellen und im Überstand detektiert werden (Tabelle 5, Abb. 10 B/C). Sieben Tage nach der Behandlung konnten weder nach Instillation noch nach Aerosolapplikation in BALF Zellen und Überstand pDNA detektiert werden. Innerhalb der ersten 24 h nach Aerosolapplikation nahm die pDNA Menge im BALF Kompartiment um das 2,1-fache ab, in der gleichen Zeit stieg die pDNA Menge in BALF Zellen nach intranasaler Instillation um das 1,2-fache an (Tabelle 5, Abb. 10 B). Die Ergebnisse zeigen, dass die Pharmakokinetik der PEI-pDNA Komplexe in den Lungen von der Applikationsart abhängig ist.

Applikationsart	Kompartiment	AUC [#]	C _{max} [§]	Clearance [§]	K _e [*]	T _{1/2} ^{**}
Aerosol	Lungengewebe	72.997	257.759	2,92	0,0092	75,4
	BALF Zellen	0,12	172	1,551	0,015	46,4
	BALF Überstand	12,0	2,6	0,11	0,016	44,2
Instillation	Lungengewebe	28.861	293.519	10,17	0,0448	15,4
	BALF Zellen	4,55	5.595	2,149	0,0098	70,6
	BALF Überstand	5,212	1.028	0,14	0,020	34,0

Tabelle 5 Vergleich der Lungenclearance-Parameter der PEI-pCMVLuc Komplexe nach Aerosolapplikation und intranasaler Instillation

[#]Die AUC wurde für 7 Tage mit der Trapezregel berechnet und ist als pg pCMVLuc pro mg Lungengewebe [pg pCMVLuc*h/mg Lungengewebe], pg pCMVLuc pro BALF Zellen [pg pCMVLuc*h/individuelle Zelle] oder pg pCMVLuc pro ml Überstand der BALF Zellen [pg pCMVLuc*h/ml Überstand] angegeben.

[§]C_{max} wurde nach 1 h gemessen und ist als pg pCMVLuc im Lungengewebe, in allen BALF Zellen oder im kompletten Überstand der BALF Zellen (7 ml) angegeben.

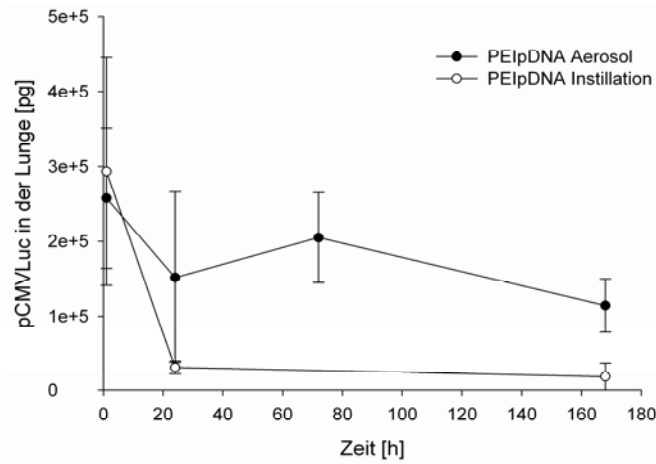
^{*}Die CL ist als mg Lungengewebe, das pro Stunde gecleared wird, als BALF Zellen, die pro Stunde gecleared werden oder als ml Überstand, der pro Stunde gecleared wird, angegeben und wurde mit folgender Formel berechnet:

$$C_{\max}(\text{Dosis})/\text{AUC}$$

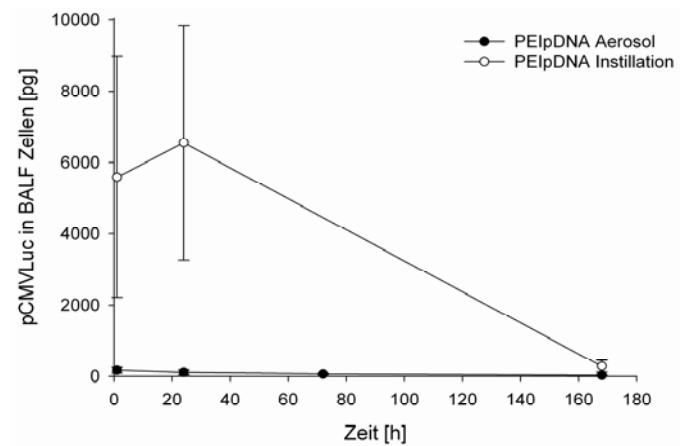
^{*}K_e ist CL/mg komplettes Lungengewebe, CL/Anzahl aller BALF Zellen oder CL/7 ml Überstand der BALF [1/h]

**Die $T_{1/2}$ ist $\ln 2/K_e$ und in Stunden angegeben.

A.



B.



C.

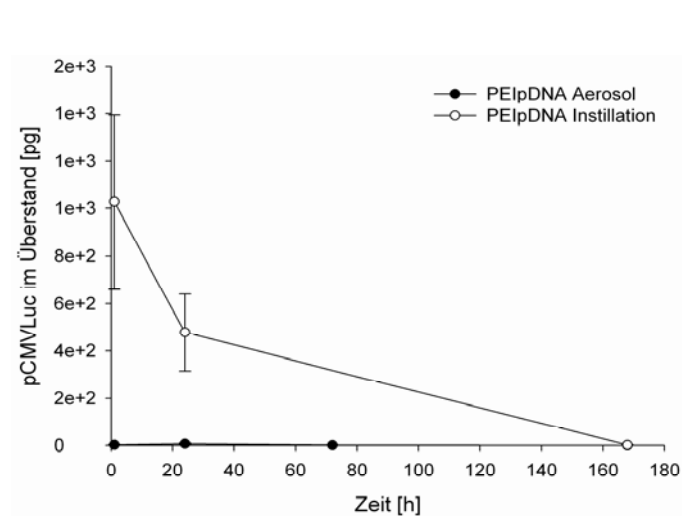


Abb. 10 Plasmid DNA Clearance aus den drei untersuchten Lungenkompartimenten nach Aerosolapplikation bzw. intranasaler Instillation von PEI-pDNA Komplexen

PEI-pDNA Komplexe wurden von Mäusen entweder inhaliert oder die Komplexe wurden intranasal instilliert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde die Plasmid DNA im Lungengewebe (A.), in den Zellen der BALF (B.) und im Überstand der BALF (C.) mittels Real Time PCR bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n=5).

3.3 Untersuchung der Anzahl der BALF-Zellen und der aktivierten Makrophagen nach Aerosolapplikation oder nach intranasaler Instillation

Zellen der BALF bestanden hauptsächlich aus alveolären Makrophagen (AMs), die ungefähr 90% der Zellpopulation ausmachten. Ungefähr 0.3% der Zellen waren Neutrophile, die übrigen Zellen waren hauptsächlich Lymphozyten.

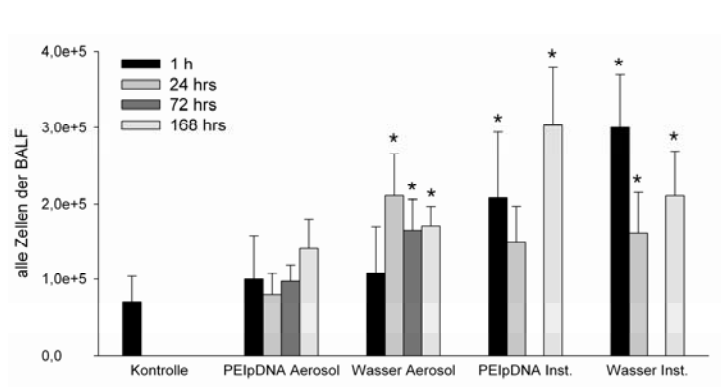
Nach Aerosolapplikation von PEI-pDNA Partikeln war die Gesamtzellzahl zu keinem Zeitpunkt signifikant gegenüber den unbehandelten Kontrollmäusen erhöht (Abb. 11 A). Nach Instillation wurde ein 4-6-facher Anstieg der Gesamtzellzahl detektiert und auch Aerosolapplikation und Instillation von destilliertem Wasser führten zu einem Anstieg. Während Instillation von

destilliertem Wasser zu einem sofortigen Anstieg der Zellen um das 4-fache führte und in 24 h leicht reduziert wurde, um dann bis Tag sieben konstant zu bleiben, führte die Aerosolapplikation von Wasser erst nach 24 h zum gleichen Anstieg. Da der größte Anteil der BALF Zellen alveolare Makrophagen sind, wurden bei deren Anzahl analoge Ergebnisse beobachtet (Abb. 11 B).

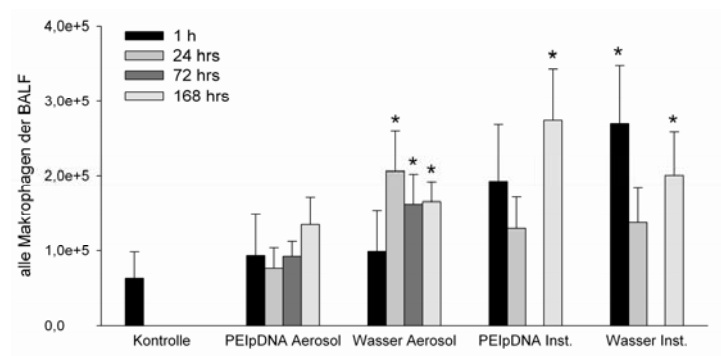
Um die Aktivierung alveolarer Makrophagen abzuschätzen, wurde ein Myeloperoxidase-Benzidin-*Staining* durchgeführt. Nach diesem Staining sind die aktivierten Makrophagen an dunkelblauen Myeloperoxidase-Körnchen im Zytoplasma leicht zu erkennen. Nach Aerosolapplikation von PEI-pDNA Komplexen stieg die Anzahl der aktivierten Makrophagen in 24 h auf das 6-fache gegenüber unbehandelter Kontrolle an, normalisierte sich aber in den folgenden 6 Tagen (Abb. 11 C). Nach Instillation der Partikel stieg die Anzahl der aktivierten Makrophagen um das 15-fache und verringerte sich auch in den folgenden Tagen nicht. Die Behandlung mit destilliertem Wasser führte nach Aerosolapplikation zu keiner Veränderung, allerdings wurde ein 3-facher Anstieg der aktivierten Makrophagen der BALF nach Instillation beobachtet.

Die Anzahl der Lymphozyten und Neutrophilen in den BALF Proben war nach Aerosolapplikation nicht signifikant erhöht (Abb. 11 D/E). Nur 24 h nach Vernebelung von destilliertem Wasser konnte ein leichter, 3-facher Anstieg der Neutrophilen detektiert werden (nicht signifikant). Nach intranasaler Instillation von PEI-pDNA Partikeln stieg die Zahl der Lymphozyten in 7 Tagen auf das 5-fache der Kontrollen, während Wasserinstillation einen initialen 5-fachen Anstieg verursachte und die Zellzahl sich in den folgenden Tagen normalisierte. Die Zahl der Neutrophilen stieg in sieben Tagen nach Partikelinstillation um das 8-fache an. Wiederum verursachte die Instillation von destilliertem Wasser eine initiale starke 9-fache Erhöhung und die Werte sanken in 7 Tagen auf das 5-fache gegenüber Kontrollzellzahlen ab.

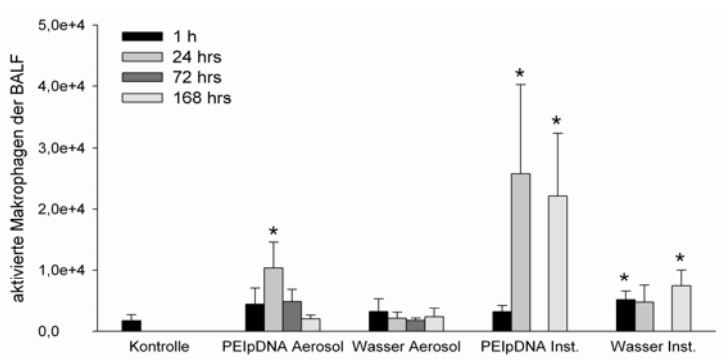
A.



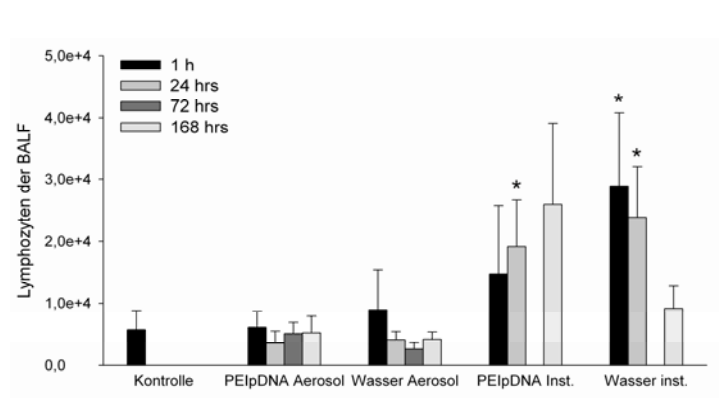
B.



C.



D.



E.

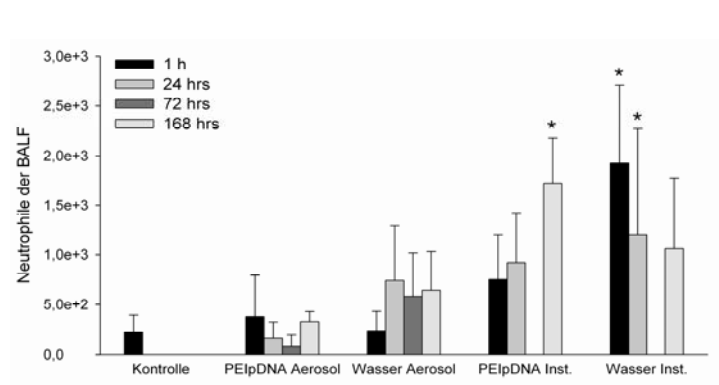


Abb. 11 Anzahl der BALF Zellen nach Aerosolapplikation bzw. intranasaler Instillation von PEI-pDNA Komplexen

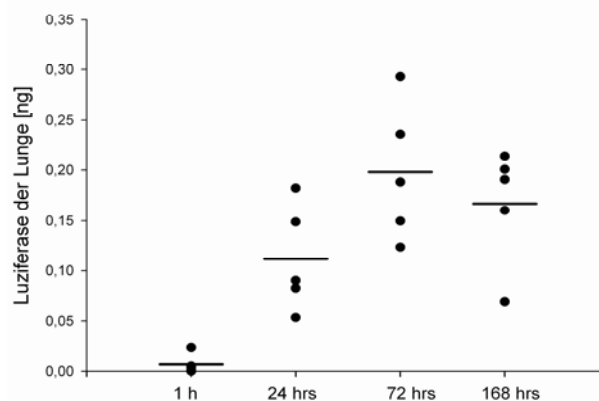
Eine bronchoalveoläre Lavage der Mäuslungen wurde durchgeführt und die in der Lavage Flüssigkeit enthaltenen Zellen wurden nach May-Grünwald und Giemsa-Stain gezählt. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden die gesamten Zellen der BALF (A.), Makrophagen der BALF (B.), Lymphozyten (D.) und die Neutrophilen (E.) bestimmt. Die aktivierten Makrophagen wurden nach Myeloperoxidase-Stain nach der Methode von Kaplow detektiert und gezählt (C). Die Zellzahlen sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n=5), signifikante Änderungen der Zellzahlen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollmäusen sind mit einem Sternchen gekennzeichnet ($p \leq 0,01$).

3.4 Kinetik der Luziferaseexpression nach Vernebelung oder nach intranasaler Instillation der PEI-pDNA Komplexe

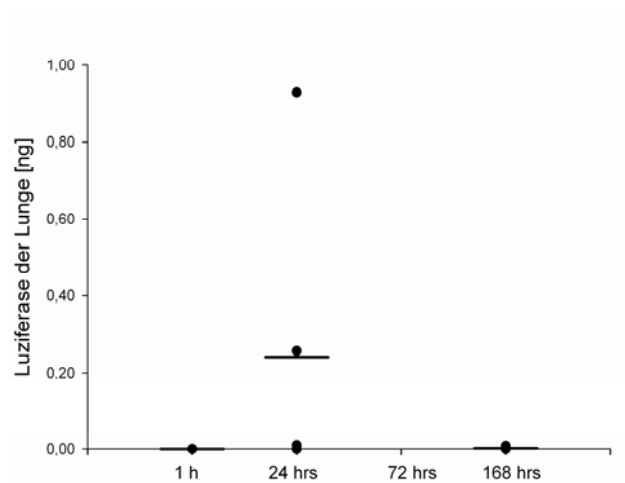
1 h nach Aerosolapplikation wurden sehr geringe Luziferaseexpressions-Werte gemessen, nicht aber nach intranasaler Instillation. Die höchsten Luziferasewerte wurden 72h nach Aerosolapplikation detektiert, wobei die Werte bis Tag 7 auf einem ähnlichen Level blieben (Abb. 12 A). Die höchsten Expressionswerte nach intranasaler Instillation wurden beim 24 h Zeitpunkt gemessen, jedoch wurde nach 3 Tagen nicht gemessen. Nach sieben Tagen konnte keine Expression mehr detektiert werden. Außerdem zeigten die Expressionswerte nach Instillation eine sehr große Streuung. Zwei von fünf behandelten Mäusen exprimierten Luziferase in relativ hohen Levels und 3 Mäuse zeigten keine Expression (Abb. 12 B). In BALF Zellen und im Überstand der BALF konnte unter keiner Bedingung Luziferaseexpression gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

Wurden statt PEI-pCMVLuc Komplexen CpG-depletierte PEI-pCpGLuc Komplexe vernebelt, war die Luziferaseexpression nach 24 h am höchsten (Abb. 12 C). Im Plasmid CpGLuc sind alle bakteriellen CpG Motive entfernt. 1 h und 24 h nach der Aerosolapplikation waren die Expressionswerte 10-fach höher verglichen mit PEI-pCMVLuc. Nach 72h waren die Werte noch 3-fach höher. 7 Tage nach der Vernebelung von PEI-pCpGLuc konnten nur noch geringe Mengen an Luziferase detektiert werden.

A.



B.



C.

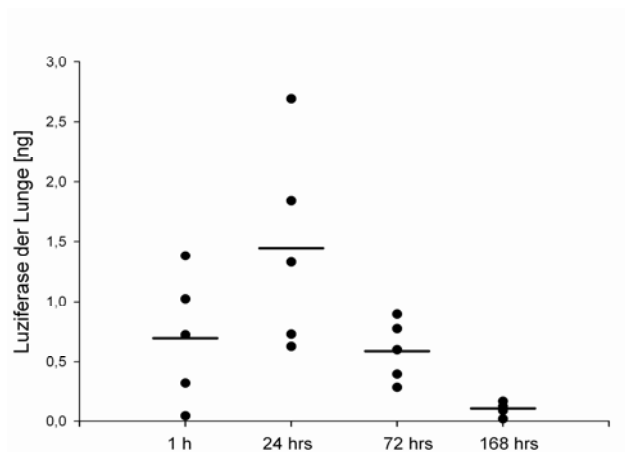


Abb. 12 Zeitverlauf der Luziferaseexpression nach Aerosolapplikation von PEIpCMVLuc bzw. PEI-pCpGLuc und intranasaler Instillation von PEI-pCMVLuc

PEI-pCMVLuc Komplexe wurden von Mäusen entweder inhaliert (A.) oder die Komplexe wurden intranasal instilliert (B.). Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurde die Luziferaseexpression im Lungengewebe der Mäuse gemessen. Außerdem wurden in einem weiteren Experiment CpG-depletierte PEI-pCpGLuc Komplexe von Mäusen inhaliert (C.). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n=5).

3.5 Zusammenfassende Betrachtung der Lungenclearance und der Kinetik der Luziferaseexpression

In den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Clearance der pDNA Partikel aus der Lunge und die Kinetik der Genexpression von der Art der Applikation in die Mauslunge abhängen. Aerosolapplikation der PEI-pDNA Partikel resultierte in einer langsameren und reduzierten pDNA Clearance aus den Lungen. Dies könnte ein Grund für die höheren und länger anhaltenden Luziferaseexpressionswerte sein, die im Vergleich zur intranasalen Instillation nach Aerosolapplikation detektiert werden konnten. Außerdem verursachte die Aerosolapplikation keine signifikante Erhöhung der Anzahl alveolärer Zellen, im Gegensatz zur nasalen Instillation, bei der ein schneller Anstieg der Zellzahlen und ein höheres Ausmaß an aktivierten Makrophagen detektiert wurden. Die Aerosolapplikation CpG-depletierter PEI-pDNA Komplexe führte zu 10-fach höheren Luziferaseexpressionswerten, als nach Aerosolapplikation von CpG-haltigen Plasmiden. Dies ist wahrscheinlich auf eine Entzündungsreaktion, die durch bakterielle CpG-Motive ausgelöst wird, zurückzuführen. Der Gentransfer mit CpG-depletierten Plasmiden wird in den Kapiteln 4.3f ausführlicher weiter besprochen.

Sowohl nach Aerosolapplikation als auch nach intranasaler Instillation von PEI-pCMVLuc konnte eine 2-phasige Kinetik der Clearance der pDNA aus dem Lungengewebe der Mäuse beobachtet werden. Dabei erfolgte eine initiale schnelle Clearance in den ersten 24 h. Der Level der pDNA sank um 41% nach Aerosolapplikation und um 90% nach intranasaler Instillation. In den darauf folgenden 6 Tagen wurde nur noch wenig pDNA aus den Lungen gecleared, so dass 7 Tage nach Aerosolapplikation noch 44% der ursprünglich deponierten pDNA Menge im Lungengewebe detektiert werden konnten. 7 Tage nach intranasaler Instillation waren es nur 6%. Aufgrund dieser Clearance Daten konnte für die Lungen nach Aerosolapplikation eine 2,5-fach höhere AUC und eine 4,9-fach höhere Halbwertszeit der pDNA, verglichen mit den Werten nach intranasaler Instillation, ermittelt werden. Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in den Luziferaseexpressionsdaten wider, die für die Lungen erhoben wurden. Auch die Luziferaseexpressionswerte blieben nach der Vernebelung für 7 Tage auf einem hohen Level während nach intranasaler Instillation nach 7 Tagen keine Expression mehr gemessen werden konnte.

Die pDNA Menge in BALF Zellen und im Überstand der BALF wurde untersucht, um die offensichtlich unterschiedlichen Clearancemechanismen nach Aerosolapplikation bzw. intranasaler Instillation besser zu verstehen. Nach intranasaler Instillation konnte eine 400-fach höhere Menge an pDNA im Überstand der BALF als nach Aerosolapplikation detektiert werden. Dies zeigt eine signifikant unterschiedliche Menge an freien PEI-pDNA Partikeln nach den beiden verschiedenen Methoden der Applikation. Die Clearance der pDNA aus dem Überstand der BALF folgte ebenfalls einer 2-phasigen Kinetik und war nach intranasaler Instillation 1,3-fach höher als nach Aerosolapplikation. Es wurden nach nasaler Instillation 33-fach höhere Mengen an pDNA in den Zellen der BALF gefunden als nach Aerosolapplikation. Interessanterweise unterschied sich die Kinetik der pDNA Clearance aus dem Überstand der BALF von der Clearance aus den BALF Zellen: In den ersten 24 h nach der Instillation stieg die pDNA Menge in den Zellen der BALF leicht an und verminderte sich im Überstand. Deshalb ist zu vermuten, dass der initiale Anstieg der pDNA in den BALF Zellen nach intranasaler Instillation die Clearance der pDNA Partikel aus dem Überstand der BALF hauptsächlich durch alveoläre Makrophagen widerspiegelt.

Diese Hypothese wird unterstützt durch den 3-fachen Anstieg der AMs in der BALF, der nach der Instillation beobachtet werden konnte. Des Weiteren ist die Zahl der aktivierten Makrophagen in der BALF nach Instillation signifikant erhöht, was auf eine erhöhte Phagozytose-Aktivität der AMs schließen lässt. Die Ergebnisse könnten auf eine Zellinfiltration nach nasaler Applikation von PEI-pDNA Partikeln hindeuten. Allerdings wurden ähnliche Werte nach intranasaler Instillation von destilliertem Wasser gefunden, was darauf hindeutet, dass die Menge der nasal applizierten Flüssigkeit einen großen Einfluss hat und weniger die Partikel, die darin gelöst sind. Auch frühere Studien zeigten schon, dass destilliertes Wasser zur Infiltration von Zellen in der Lunge führen kann [124]. Deshalb lässt sich vermuten, dass zusätzlich zu den PEI-pDNA Partikeln der hypotone Charakter der nasal applizierten Lösung zur Zellinfiltration beiträgt. Allerdings sind hypoosmotische Lösungsmittel für die PEI-pDNA Komplex-Formulierung nötig, um ein hohes Expressionslevel der pDNA in den Mauslungen zu gewährleisten [76, 125]. Hier ist es wichtig anzumerken, dass nach Aerosolapplikation der PEI-pDNA Komplexe die Zahl der BALF Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollmäusen nicht signifikant erhöht war.

Während nach 1 h bzw. 24 h nur 3% (Instillation) und 0,1% (Aerosolapplikation) der insgesamt deponierten pDNA Partikel mit den BALF Zellen assoziiert waren, wurde die größte Fraktion im Lungengewebe detektiert. Das könnte bedeuten, dass die pDNA hauptsächlich durch intrazelluläre Degradationsprozesse im Lungengewebe – entweder durch zelluläre oder extrazelluläre Komponenten - eliminiert wurde.

Um die Kinetik der Clearance der Komplexe aus den Lungen besser zu verstehen, wurde die Anzahl der PEI-pDNA Partikel berechnet, die mit einem einzigen alveolären Makrophagen assoziiert waren. Neutrophile der Lunge besitzen ebenfalls phagozytotische Aktivität [126]. Da sie einen geringen Anteil der Zellen der BALF ausmachen und außerdem ihre Passivität gegenüber Partikeln kleiner als 1 μm von anderen Autoren berichtet wurde [127], wurde angenommen, dass die in BALF Zellen gefundenen PEI-pDNA Komplexe hauptsächlich mit Makrophagen assoziiert waren. Die Berechnungen basierten auf den Bestimmungen der Anzahl der AMs in der BALF und den Messungen der pDNA Menge, die mit den Zellen der BALF assoziiert waren. Die Berechnungen ergaben, dass ungefähr 6000 bzw. 250 pDNA Moleküle nach intranasaler Instillation bzw. Aerosolapplikation mit jedem alveolären Makrophagen assoziiert waren. Die 100 nm großen Komplexe, die für die Vernebelung verwendet wurden, könnten ungefähr 3,5 pDNA Moleküle pro Partikel enthalten, was ca. 70 PEI-pDNA Komplexen mit einem gesamten Volumen von 0,04 μm^3 pro Makrophage entspricht [128]. Es lässt sich annehmen, dass Komplexe mit 200 nm Durchmesser, die für die intranasale Instillation verwendet wurden, 7 pDNA Moleküle enthalten könnten. Das würde 860 Komplexen mit einem Volumen von 3,6 μm^3 pro phagozytierender Zelle entsprechen. Die Aufnahmekapazität eines Makrophagen kann unter bestimmten Bedingungen z.B. im Fall von Liposomen 10 μm betragen oder sogar 20 μm im Falle eines einzigen Latexpartikels [129, 130], was einem Volumen von $\sim 500 \mu\text{m}^3$ entspricht. Diese Überlegungen zeigen, dass die Aufnahmekapazität der Makrophagen nicht überschritten war. Allerdings hängt die Aufnahmekapazität der Makrophagen sehr von der Struktur der Partikel ab, denen sie ausgesetzt sind. Im Falle von Nanopartikeln wurde berichtet, dass Phagozyten bereits weit unter ihrem Aufnahmelimit überladen sind [131].

Der Grund für die unterschiedliche Pharmakokinetik der PEI-pDNA Komplexe nach Aerosolapplikation bzw. intranasaler Instillation ist nicht offensichtlich. Die PEI-pDNA Partikel wurden für beide Methoden in gleichen N/P Verhältnissen hergestellt. Verschiedenste Aspekte könnten zu diesen Beobachtungen geführt haben:

Die regionale Verteilung der PEI-pDNA Komplexe könnte nach Aerosolapplikation bzw. intranasaler Instillation unterschiedlich gewesen sein. Das könnte zu einer inhomogenen Partikelverteilung geführt haben, d.h. Lungenabschnitten mit hoher und mit niedriger PEI-pDNA Partikel Konzentration, vor allem nach intranasaler Instillation. Teile mit höherer PEI-pDNA Partikel Konzentration könnten zu einer stärkeren Lungenreaktion führen als nach Aerosolapplikation. Für die Aerosolapplikation ist eine homogene Partikelverteilung in der Lunge von Mäusen bereits beschrieben [76, 132]. Tatsächlich sind ähnliche Beobachtungen schon für Titaniumdioxidpartikel gemacht worden [133]. Mittels histopathologischen Methoden könnte dieses Thema weiter untersucht werden.

Die Größe der PEI-pDNA Partikel war unterschiedlich (90 nm und 200 nm), was zu unterschiedlichen Lungenreaktionen geführt haben könnte. Da ein Volumen von 50 µl jeder Maus intranasal instilliert wurde, war eine hohe pDNA Konzentration ($c=1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) für die Herstellung der PEI-pDNA Komplexe nötig, was wiederum zu einer Vergrößerung des Partikeldurchmessers führte. Die Formulierung einer entsprechend hoch konzentrierten PEI-pDNA Lösung war nur möglich, indem der pH-Wert der PEI Lösung von $\text{pH}=7,4$ auf $\text{pH}=6$ vermindert wurde. Die Verringerung des pH-Wertes erhöht die Menge an positiven Ladungen des PEIs, die für die Bindung der negativ geladenen pDNA nötig sind. Außerdem wird gleichzeitig die Zahl der negativen Ladungen der pDNA vermindert. Beide Effekte tragen wahrscheinlich zu einem höheren Überschuss an positiver Ladung bei und so zur Stabilität der Partikel bei hohen Konzentrationen.

Mit 50 µl wurde allerdings immer noch ein für Mäuse relativ hohes Volumen intranasal instilliert. Die hohen Mengen an destilliertem Wasser, das als Lösungsmittel für die PEI-pDNA Partikel verwendet wurde, verändern wahrscheinlich die Lungenphysiologie, was zu veränderten

Clearance Raten und einem veränderten Zellmetabolismus führt. In weiteren Studien muss dies näher untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Vernebelung von PEI-pDNA Partikeln Vorteile gegenüber der Instillation zeigt, auch im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung. i) Aufgrund der langsameren pDNA Clearance und der daraus folgenden verlängerten Genexpression in den Lungen, könnte die Frequenz der Applikation signifikant reduziert werden, was auch zu einer besseren Compliance für den Patienten beiträgt. ii) Die Dosis der Gentransferkomplexe könnte reduziert werden, ohne das Expressionslevel zu beeinträchtigen, was auch zu verringerter Zellinfiltration und Aktivierung von Makrophagen führen könnte. iii) Die Aerosolapplikation wäre die einfachste klinische Applikationsart und invasive Techniken könnten vermieden werden.

Eine Herausforderung in der Zukunft wird sein, die Methode der Aerosolapplikation von Gentransferkomplexen und das Wissen auf ein Großtiermodell und dann letztendlich auf Patienten zu übertragen. Ein detaillierteres Verständnis der Pharmakokinetik von PEI-pDNA Partikeln in größeren Tieren könnte hilfreich sein, den Mechanismus der PEI-pDNA Aerosol-Gen-Applikation besser zu verstehen und diese zu optimieren.