

## 5 Untersuchung und Optimierung der magnetfeldgesteuerten Aerosolapplikation im Mausmodell

### 5.1 SPION und pDNA Deposition in der Mauslunge nach Vernebelung via intratrachealer Intubation

#### 5.1.1 Computer-unterstützte Simulation des magnetischen Aerosoltargetings

Die Grundlagen für die Berechnungen der Flugbahnen von Aerosoltröpfchen und die resultierende Kraft, die an jeder Position P auf ein Aerosoltröpfchen wirkt, sind in der Dissertation von Herrn Dr. Bernhard Gleich dargelegt [122]. Ausgehend von diesen Berechnungen wurden die hier beschriebenen experimentellen Untersuchungen durchgeführt.

Für die Computer-unterstützte Simulation des magnetischen Aerosoltargetings wurden die Parameter des Elektromagneten verwendet, der von Herrn Dr. Gleich für die Versuche konstruiert wurde (siehe Kapitel 2.12.1). Die Verwendung von Pulveraerosolen für die pulmonale Applikation von hochmolekularen Wirkstoffen, wie Peptide, Proteine wie z.B. Insulin, ist aufgrund von technologischen und medizinischen Vorteilen weitverbreitet. Auch für die lokale Applikation von pDNA zur Gentherapie der Lunge werden Pulveraerosole diskutiert [149]. Allerdings ergaben die Berechnungen von Herrn Dr. Gleich, dass auch mit optimiertem Design des Elektromagneten die Ablenkung eines Pulveraerosols, bestehend aus physikalisch unabhängigen SPION, durch magnetische Kräfte nicht möglich wäre, da das magnetische Moment zu niedrig ist. Im Gegensatz dazu führt die lose Ansammlung vieler SPION in einem Aerosoltröpfchen (*Nanomagnetosol*) laut theoretischer Berechnung zu einem erhöhten magnetischen Moment. Das wiederum resultiert in einem ablenkbaren Aerosol bei technisch und medizinisch vertretbarer Stärke des magnetischen Feldes.

Die Flugbahnen der Partikel des *Nanomagnetosols* wurden für die Atemwege einer Maus berechnet, wobei die Dimensionen der Trachea, der zwei Hauptbronchi und die

Strömungsverhältnisse entsprechend der physiologischen Werte gewählt wurden [150]. Es wurde eine Ventilation der Mäuse mit einer Atemfrequenz von 120/min. (2/s) und ein Tidalvolumen von 200  $\mu\text{l}$  angenommen, was in einem Volumenfluss ( $V$ ) von 800  $\mu\text{l/s}$  ( $8 \times 10^{-7} \text{ m}^3/\text{s}$ ) resultiert. Wenn man einen Durchmesser der Trachea von 1,4 mm ( $A=1,54 \text{ mm}^2$ ) annimmt, beträgt die durchschnittliche Einflussgeschwindigkeit  $V/A=0,52 \text{ m/s}$ . Für die mathematische Annäherung zur Berechnung der Partikelflugbahnen, wurde ein laminares Flussprofil angenommen mit einer Durchschnittsgeschwindigkeit der Partikel von 0,52 m/s. Die Viskosität der Atemluft wurde auf  $\eta_{\text{air}}=17 \mu\text{Pas}$  festgelegt.

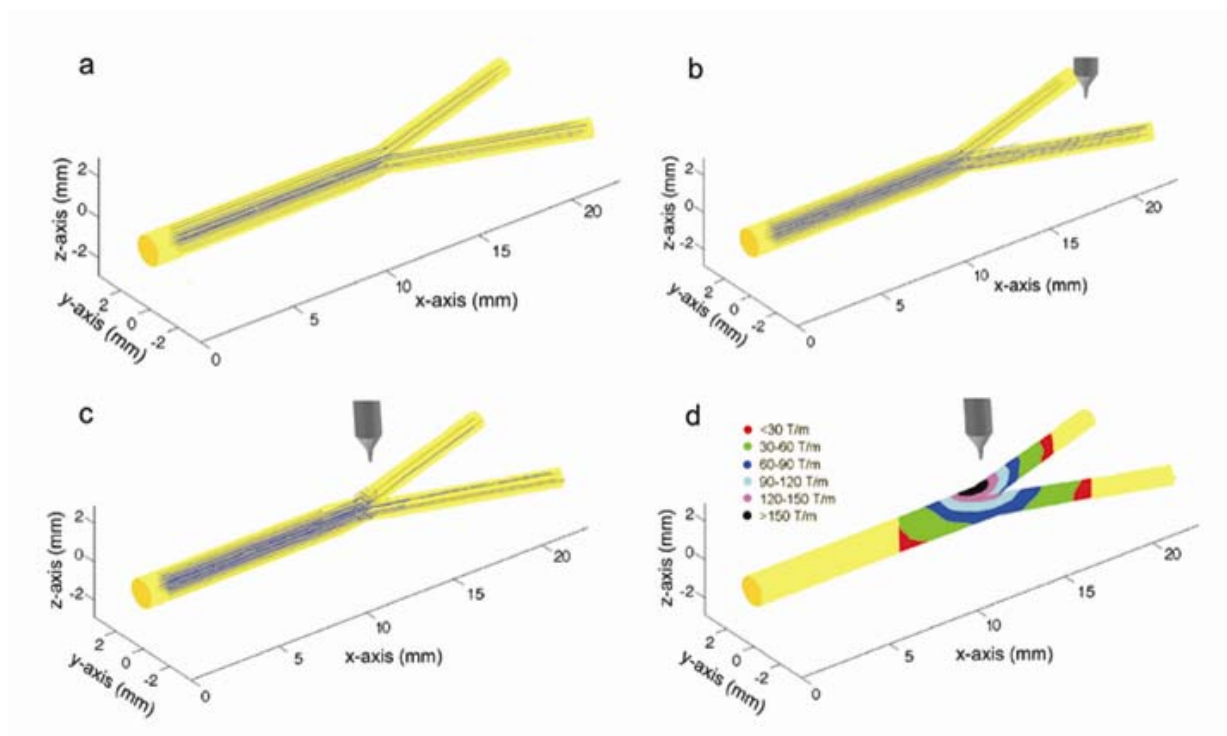
Das Model entspricht nicht exakt der experimentellen Situation in der Maus, sondern spiegelt nur die *in vivo* Situation an der Hauptverzweigung wider, um die generelle Durchführbarkeit des Konzepts rechnerisch zu belegen.

Für die Berechnungen wurde angenommen, dass i) ein *Nanomagnetosol*tröpfchen sphärisch ist und einen durchschnittlichen Durchmesser von 3,5  $\mu\text{m}$  hat, ii) das Aerosoltröpfchen viele SPION mit einem Innendurchmesser von 50 nm dispergiert in Wasser enthält, iii) die Schwerkraft, die Reibung und die Magnetkraft die Hauptkräfte sind, die auf das SPION Aerosoltröpfchen wirken und dass iv) der Magnetfeldgradient  $\nabla B > 100 \text{ T/m}$  entspricht. Die Magnetspitze wurde dabei in senkrechter Orientierung zum Luftstrom ausgerichtet.

Die Berechnungen ergaben, dass nach einer einzelnen Aerosolpassage durch den simulierten Atemweg während der Inhalation nur 4% Deposition ohne Applikation eines externen Magnetfelds stattfinden würde (Abb. 16 A). Dabei sind die deponierten SPION gleichmäßig auf beide Bronchi verteilt. Wenn während der Inhalation ein externes Magnetfeld angewendet werden würde, werden im „magnetisierten“ Atemweg 12% der Tröpfchen deponiert und im „nicht-magnetisierten“ Atemweg nur 4% (Abb. 16 B). Würde die Magnetspitze näher an der Hauptverzweigung platziert, werden 16% der Aerosoltröpfchen an der „magnetisierten“ und 4% an der „nicht-magnetisierten“ Atemwegsoberfläche deponiert (Abb. 16 C). Die höheren Depositionsraten an der Atemwegsoberfläche spiegeln den hohen magnetischen Feldgradienten in diesem Szenario wider, der bis zum entfernteren „nicht-magnetisierten“ Atemweg reicht (Abb.

16 D). In der Simulation wurde davon ausgegangen, dass jedes Tröpfchen 2930 SPION enthält, was einer Packungsdichte von 3,5% entspricht.

Nicht-deponierte Aerosoltröpfchen werden wahrscheinlich in tieferen Lungenabschnitten deponiert oder exhaliiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Ablenkung der Nanomagnetosole möglich ist.



**Abb. 16** Computer-unterstützte Simulation der Ablenkung der Nanomagnetosole

Ohne externes Magnetfeld werden SPION in beiden Bronchi gleichmäßig deponiert (4%, A). Wenn ein Magnet an den Koordinaten  $x = 20$  mm,  $y = -1,5$  mm und  $z = 2,5$  mm positioniert wird, deponieren 12% der Aerosoltröpfchen im „magnetisierten“ und 4% im „nicht-magnetisierten“ Bronchus (B). Wenn der Magnet an den Koordinaten  $x = 13$  mm,  $y = 0,8$  mm und  $z = 2,5$  mm positioniert wird, deponieren 16% der Aerosoltröpfchen im „magnetisierten“ und 4% im „nicht-magnetisierten“ Bronchus (C) (25 Flugbahnen,  $\mu_{AD} = 3 \times 10^{-14}$  Am<sup>2</sup>, 2930 SPION/Aerosoltröpfchen). In (D) ist der magnetische Feldgradient aus der Anordnung (C) dreidimensional dargestellt.

### **5.1.2 SPION können *in vivo* durch Magnetkräfte gezielt in einer Lungenregion angereichert werden**

Um das theoretische Konzept experimentell zu beweisen, wurde eine wässrige Lösung mit SPION mit einem Innendurchmesser von 50 nm über intratracheale Intubation (via Tracheotomie) während der Inspirationsphase in Mäuselungen vernebelt. In einem ersten Versuchsaufbau wurde der Thorax der Mäuse operativ entfernt und die Magnetspitze direkt über dem rechten Lungenflügel platziert, ohne das Gewebe zu berühren. Am Ende der Vernebelung wurden rechte und linke Lungenflügel getrennt entnommen und die Anzahl der SPION von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Trahms der Physikalisch Technischen Bundesanstalt (PTB) mit einem SQUID-Sensor mittels Magnetrelaxometrie bestimmt [123].

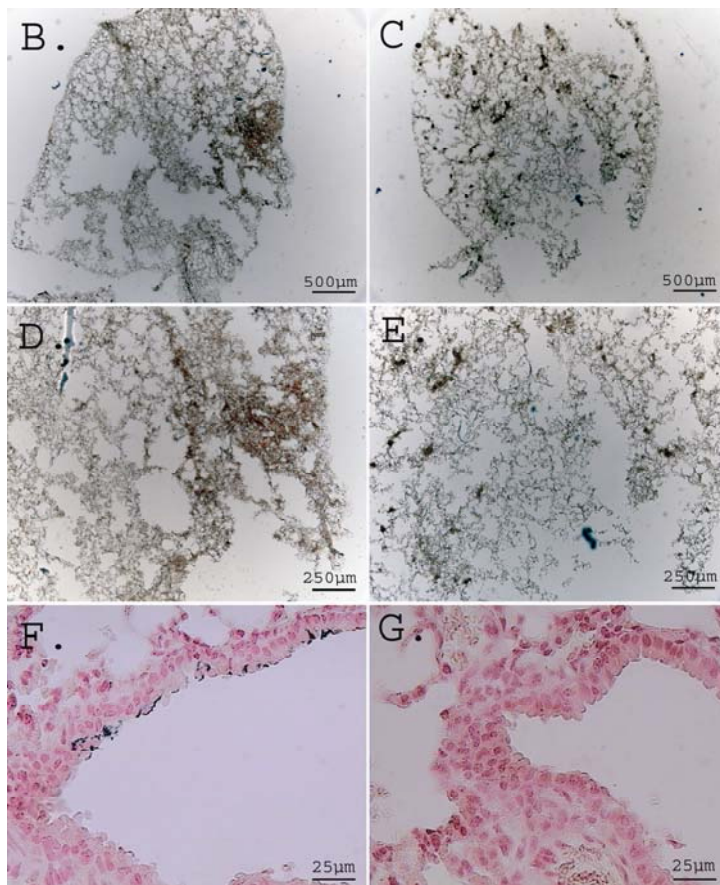
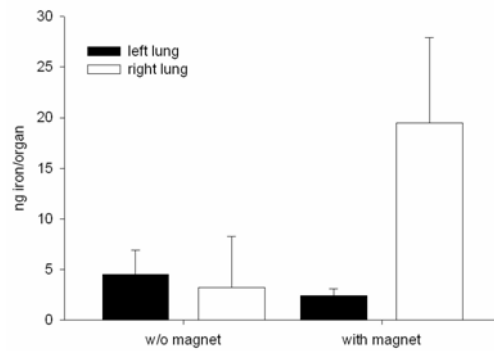
Während die Zahlen der deponierten SPION zwischen rechter und linker Lunge sich ohne Magnetfeldapplikation nicht signifikant unterschieden, konnte nach Magnetfeldapplikation eine 8-fach höhere Menge an SPION im rechten „magnetisierten“ Lungflügel detektiert werden, verglichen mit dem linken „nicht-magnetisierten“ Lungenflügel (n=5;  $p \leq 0,05$ ) (Abb. 17 A).

Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Partikeldeposition in den linken Lungenflügeln unabhängig von der Anwendung des Magneten. Die totale Deposition der Partikel in der Lunge konnte durch das externe Magnetfeld 3-fach erhöht werden. Das heißt, dass durch die Anwendung eines starken externen Magnetfeldes die Deposition von SPION in der Lunge gesteigert werden kann und dass die Partikel in bestimmte Lungenregionen gelenkt werden können.

Die lokale Deposition der SPION wurde außerdem auch histologisch untersucht. In einer Übersicht der Lungenschnitte, konnte die Anhäufung der SPION durch bräunliche Färbung der Lungenregion des rechten Lungenflügels, in der die Magnetspitze während der Vernebelung lokalisiert war, beobachtet werden (Abb. 17 B, D). In den Schnitten des linken Lungenflügels, der nicht dem Magnetfeld ausgesetzt war, konnten nur homogen verteilte Eisenoxidpartikel detektiert werden (Abb. 17 C, E). In größeren Vergrößerungen und Berliner-Blau-Färbung

konnten blaue Eisenoxidpartikel magnetfeldabhängig sowohl auf der Oberfläche von Alveolarzellen und vor allem auf der Oberfläche von Atemwegsepithelzellen identifiziert werden (Abb. 17 F, G).

**A.**



**Abb. 17 Magnetfeldabhängige Anreicherung von SPION in Mäuselungen**

Der Thorax der Mäuse wurde operativ entfernt und die SPION wurden während der kontrollierten Beatmung der Tiere vernebelt. Wenn ein Magnetfeld angelegt wurde, wurde die Magnetspitze direkt über dem mittleren rechten Lungenlappen positioniert. Die Zahl der Magnetpartikel wurde mittels Magnetrelaxometrie bestimmt (A) und histologische Schnitte wurden untersucht (B-G).

Die oben beschriebenen Experimente wurden auch an Mäusen mit nicht eröffnetem, geschlossenem Thorax durchgeführt. Die Magnetspitze wurde dabei direkt über dem rechten Brustkorb platziert, wobei der Abstand zum Zielgewebe sich notwendigerweise auf 2 mm vergrößerte. Da die Stärke des magnetischen Felds mit zunehmendem Abstand sinkt, konnte eine 2,5-fach höhere Deposition von SPION im rechten Lungenflügel detektiert werden im Vergleich zur 8-fach höheren Deposition im rechten Lungenflügel bei eröffnetem Thorax (Tabelle 6, Abb. 17 A). Das bedeutet, dass magnetisches Aerosoltargeting auch an gesunden lebenden Mäusen durchgeführt werden kann.

Magnetfeld <sup>a</sup>	linke Lunge		rechte Lunge	
	pDNA <sup>b</sup>	SPION <sup>c</sup>	pDNA <sup>b</sup>	SPION <sup>c</sup>
–	60±47	n.d.	68±30	n.d.
+	83±17	23,8±1,7	147±91	59,1±37,2

**Tabelle 6 Magnetfeldabhängige Akkumulation der SPION und der inhalierten Plasmid DNA, die mit SPION zusammen formuliert wurde, in den Mauslugen nach Aerosolapplikation**

<sup>a</sup>SPION wurden während der kontrollierten Beatmung mit oder ohne Applikation eines externen Magnetfelds in Mauslugen vernebelt (n=3). Wenn ein externs Magnetfeld angewendet wurde, wurde die Magnetspitze direkt über dem Fell des Thorax über dem rechten mittleren Lungenlappen platziert. Mit und ohne Applikation eines externen Magnetfelds wurde die gleiche Menge pDNA vernebelt. Plasmid DNA wurde mittels *Real Time* PCR detektiert.

<sup>b</sup>Depositionsraten sind als ng pCMVLuc/80ng total DNA angegeben.

<sup>c</sup>Depositionsraten sind als ng iron/Lungenflügel angegeben.

### 5.1.3 Gezielte Anreicherung vernebelter Plasmid-DNA in einer Lungenregion

In weiteren Versuchen wurde pDNA mit SPION formuliert, um den Erfolg magnetischen Aerosoltargetings am Wirkstoffmodell zu zeigen. Die Partikel wurden in Mäuselungen mit geschlossenem Thorax vernebelt. Die Menge an deponierter pDNA war in rechtem und linkem Lungenflügel etwa gleich, wenn kein externes Magnetfeld angelegt wurde. Im Gegensatz dazu konnte in der rechten Lunge eine fast 2-fach höhere Menge an pDNA im Vergleich zum linken Flügel detektiert werden, wenn rechts das Magnetfeld während der Inhalation angelegt wurde (n=3). Es gab nur einen geringen Unterschied in den pDNA Mengen der linken Lungenflügel abhängig davon, ob ein Magnetfeld angelegt wurde oder nicht (Tabelle 6).

Die PEI-pDNA-SPION Mischungen wurden nach Inkubation mit Heparansulfat mittels Agarosegelelektrophorese untersucht, um eine mögliche Bindung zwischen SPION und PEI-pDNA zu ermitteln. Das Polyanion Heparansulfat setzt pDNA aus den PEI-pDNA-SPION Partikeln frei, so dass die freie pDNA im elektrischen Feld in das Agarosegel wandert (Abb. 18 C). Wenn SPION mit einem Permanentmagnet separiert wurden, der Überstand mit Heparansulfat inkubiert wurde und dieser Überstand dann auf das Agarosegel aufgetragen wurde, wanderte ebenfalls freigesetzte pDNA in das Gel (Abb. 18 D). Dies zeigt, dass keine Bindung zwischen SPION und PEI-pDNA existiert, obwohl die SPION mit PEI umhüllt sind.

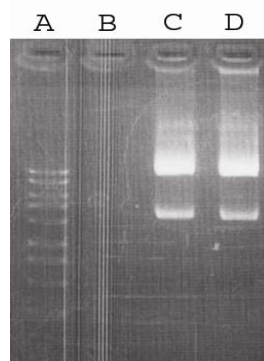


Abb. 18 Freisetzung von pDNA aus PEI-pDNA-SPION

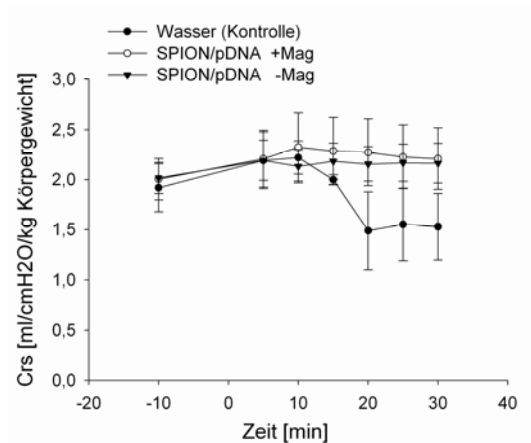
SPION und PEI-pDNA wurden gemischt, mit Heparansulfat inkubiert und auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen. (A) 1kb DNA-Ladder (B) SPION alleine wurden mit Loading-Buffer gemischt und zur Kontrolle auf das Gel aufgetragen (C) PEI-pDNA/SPION/Heparansulfat-Mischung wurde auf das Gel aufgetragen (D) SPION wurden separiert und der Überstand der PEI-pDNA/SPION/Heparansulfat-Mischung wurde auf das Gel aufgetragen.

#### 5.1.4 Einfluss der vernebelten SPION auf die Lungenfunktion

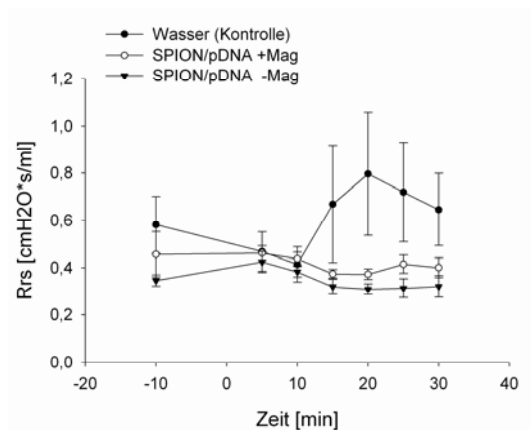
In histologischen Untersuchungen konnte eine lokale Anhäufung der SPION gezeigt werden, die theoretisch zu einem Verschluss und verminderter Ventilation dieser Geweberegionen führen könnten. Um diese unerwünschten Nebenwirkungen genauer zu untersuchen, wurden während der Vernebelung die dynamische Compliance und die Mechanik des Lungengewebes, gegeben durch die Eingangsimpedanz, gemessen (n=5). Als Kontrolle wurden Mäuse verwendet, die nur mit destilliertem Wasser behandelt wurden (n=5). Inhalieren von destilliertem Wasser führte innerhalb von Minuten zu einer Verschlechterung von Compliance und Widerstand des respiratorischen Systems. Dieser vorübergehende Effekt wurde schon früher beobachtet [124]. Aber Wasser ist als Lösungsmittel nötig, um die Aggregation der Partikel zu vermeiden, ein Phänomen, das häufig bei Polyelektrolyten wie pDNA und kationischen SPION bei hoher Ionenstärke wie z.B. in 150 nM NaCl zu beobachten ist [151]. Im Gegensatz dazu führte der Zusatz von SPION und pDNA zu der Inhalationslösung zu einer Verminderung des Wassereffektes und es konnte kein weiterer Einfluss der SPION auf die dynamischen Lungenfunktionswerte gemessen werden (Abb. 19 A, B). Dies zeigt, dass weder das pDNA-Nanomagnetosol selbst noch die zusätzliche Anwendung eines externen Magnetfeldes die Lungenfunktion nachteilig beeinflusst.



A.



B.

**Abb. 19 Lungenfunktion der Mäuse nach der Inhalation von SPION/pDNA Partikel**

Nach operativer Entfernung des Thorax der Mäuse, wurden zum Zeitpunkt null ~300 $\mu$ l SPION via Tracheotomie in die Mauslungen vernebelt (400 Atmungszyklen, 12,5 mg/ml Fe, w/w (SPION/pDNA)=20/1). Die Lungenfunktionsmessung der Mäuse wurde nach 5 min. begonnen und alle 10 min. durchgeführt. In Abb. A. ist die Compliance des respiratorischen Systems ( $C_{rs}$ ) dargestellt und in B. der Widerstand des respiratorischen Systems ( $R_{rs}$ ) (n=5,  $\pm$ Standardabweichung vom Mittelwert).

### 5.1.5 Zusammenfassende Betrachtung der magnetfeldgesteuerten Aerosoltherapie

In dieser Studie konnte sowohl theoretisch als auch in *in vivo* Experimenten an der Maus gezeigt werden, dass magnetisches Aerosoltargeting mit Aerosolen, die SPION enthalten, möglich ist. Um einen passenden Magneten zu konstruieren, mussten die verschiedenen Kräfte, die auf inhalierte Partikel während ihres Weges durch den Respirationstrakt wirken und die von der Magnetkraft zur spezifischen Deposition überwunden werden müssen, bedacht werden. Hauptsächlich treten Gravitations- und aerodynamische Kräfte auf. Die Berechnungen ergaben, dass die Gravitationskräfte vernachlässigbar sind, während die aerodynamischen Kräfte Werte vergleichbar mit der applizierten magnetischen Kraft erreichen können, je nach Flussgeschwindigkeit. Es ist wichtig zu berücksichtigen, dass die Gravitationskräfte während des gesamten Vernebelungsprozesses gleich bleiben (gewichtabhängig), wobei die aerodynamischen Kräfte während der Inhalation abnehmen. Dieses Phänomen lässt sich mit der Lungenanatomie erklären. Die regelmäßige Verzweigung der Atemwege von einer Generation zur nächsten führt zu einer Zunahme des Volumens [152], was wiederum zu einer verlangsamten Flussgeschwindigkeit führt [153]. Außerdem sinkt die Flussgeschwindigkeit während der Inhalation, weil sich mit einsetzender Expiration die Flussrichtung ändert. Diese Überlegungen ergaben, dass die aerodynamischen Kräfte während der Inspiration immer weiter sinken, bis sie am Ende Null erreichen. Während die aerodynamischen Kräfte bei hohen Flussgeschwindigkeiten am Anfang der Inhalation so hoch wie die magnetischen Kräfte sind, sinken diese aerodynamischen Kräfte *in vivo* mit der Zeit und die Partikel können durch die magnetischen Kräfte abgelenkt werden. Die Gravitationskräfte sind 10-fach kleiner als die angewendeten magnetischen Kräfte. Die Computer-unterstützte Simulation hat gezeigt, dass SPION mittels Magnetkräften in der Lunge deponiert werden können, wenn man im Bezug auf Größe der Atemwege, Atemfrequenz oder Flussraten von realistischen Bedingungen in der Lunge ausgeht. Die Berechnungen ergaben auch, dass schon niedrige Mengen an SPION von ca. 3000 pro Aerosoltröpfchen für eine Ablenkung ausreichend sind. Diese Ergebnisse sind wichtig für die zukünftige Anwendung, aber es müssen noch weitere Studien zum Beleg dieser theoretischen Berechnungen *in vivo* durchgeführt werden.

Weiter zeigten die Untersuchungen, dass SPION nicht nur in eine bestimmte Region gelenkt werden konnten, sondern auch dass die deponierte Menge an Partikeln insgesamt um das 2-fache

gesteigert werden konnte. Es lässt sich vermuten, dass diese gesteigerte Deposition auf die verminderte Exhalation der Partikel zurück zu führen ist, auch weil der „unbehandelte“ linke Lungenflügel nicht von der Anwendung eines externen Magnetfeldes beeinflusst wurde. Die *in vivo* Ergebnisse, dass die SPION Aerosoltröpfchen im „magnetisierten“ Bronchus zu einem größeren Teil deponieren, werden von den Ergebnissen der Computer-Simulation bestätigt.

Die Versuche ergaben, dass sich der Anstieg der Partikeldeposition im rechten Lungenflügel verminderte, wenn der Thorax der Mäuse geschlossen blieb. Der ca. 3-fache Abfall stimmt gut mit der ca. 3-fachen Reduktion der magnetischen Feldstärke mit zunehmendem Abstand der Magnetspitze vom Lungenflügel überein (siehe Kapitel 2.12.1). Die Dicke der Thoraxwand beträgt ungefähr 1-3 mm. Das zeigt, wie wichtig die Stärke des Magnetfeldes bzw. des magnetischen Feldgradienten für die Partikeldeposition ist. Trotz dieser limitierenden Faktoren konnte *in vivo* eine magnetfeld-gesteuerte pDNA Deposition in den Lungen beobachtet werden. Das zeigt, dass nicht nur die SPION gesteuert werden können, sondern auch die zur Formulierung beigemischte pDNA.

Hier soll betont werden, dass, obwohl die SPION mit PEI umhüllt waren, keine Bindung zwischen der pDNA und den SPION gemessen werden konnte (Abb. 18). Das passt zu früheren Untersuchungen, die zeigten, dass bei einer ausreichenden Ionenstärke des Lösungsmittels die elektrostatische Abstoßung von Partikeln reduziert und so eine Salz-induzierte Aggregation von PEI-pDNA und SPION erreicht wurde [151]. Das bedeutet, dass für das magnetische Aerosoltargeting keine Bindungen zwischen Arzneistoff und SPION nötig sind - die Assoziation der Partikel in den Aerosoltröpfchen reicht aus. Es wurden also nicht einzelne SPION angezogen, sondern die Aerosoltröpfchen, bestehend aus SPION und Arzneistoff. Das bedeutet, dass sich dieses Applikationssystem durch eine große Flexibilität auszeichnet, wobei die Arzneistoffdosis zum Beispiel einfach verändert werden kann, indem die Konzentration in der Inhalationslösung, die auch SPION enthält, erhöht wird. Außerdem können mehrere verschiedene Arzneistoffe gleichzeitig verabreicht und Arzneistoffe, die schon mit anderen pharmazeutisch relevanten Trägern wie biodegradierbaren Nanopartikeln, Liposomen oder Nanokristallen formuliert sind durch einfaches Mischen mit SPION angewendet werden.

In früheren Experimenten wurden schon Eisenoxid-Mikropartikel verwendet, um Clearance-Mechanismen der Lunge durch alveolare Makrophagen zu untersuchen. Dabei wurden keine unerwünschten Nebenwirkungen bei den Patienten berichtet [154-156]. Außerdem sind SPION für Magnet-Resonanz-Untersuchungen von Leberläsionen zugelassen, wobei auch hier bisher keine schweren Nebenwirkungen festgestellt wurden. Die Dimensionen des Elektromagneten müssen allerdings den Anforderungen für eine humane Anwendung angepasst werden, dann könnte die Methode der magnetfeld-gesteuerten Aerosoltherapie eine interessante Möglichkeit für Behandlungen von Krankheiten wie Lungenkrebs oder anhaltende pulmonale Infektionen darstellen.

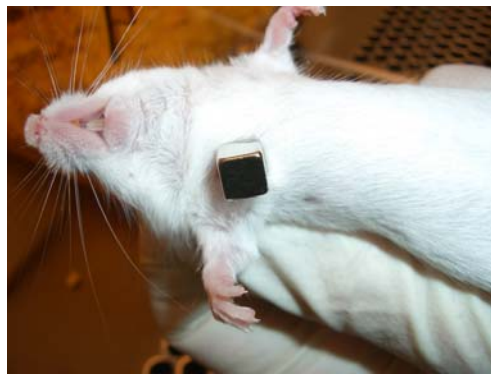
## 5.2 Magnetfeldgesteuerte Aerosolgenapplikation in der Vernebelungskammer

In den oben beschriebenen (5.1) Inhalationsstudien mit Mäusen konnte eine Anreicherung der Aerosoltröpfchen, die SPION enthielten, in den Lungen detektiert werden, wenn ein Elektromagnet (1 T) während der Aerosolapplikation via Tracheotomie über den Lungen der Mäuse platziert war. Das Ausmaß der Deposition der co-applizierten pDNA korrelierte mit der Deposition der SPION. Allerdings konnte hier keine Genexpression detektiert werden.

Deshalb wurde in einer weiteren Studie das magnetische *Drug-Targeting* angewendet, wobei die Mäuse freibeweglich in einer Vernebelungskammer platziert waren. Dabei wurde während der Vernebelung von PEI-pDNA Komplexen in Kombination mit superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln (SPION) ebenfalls ein externes Magnetfeld angewendet. Als externes Magnetfeld wurde ein kleiner, würfelförmiger Permanentmagnet mit Gewebekleber am Fell der Mäuse über den Lungen angebracht (Abb. 20). Es wurde nach der Vernebelung die Genexpression von pDNA, die für Luziferase kodiert, in den Lungen gemessen. Außerdem wurde die Deposition von pDNA in den Mauslungen mittels *Real Time* PCR quantifiziert.

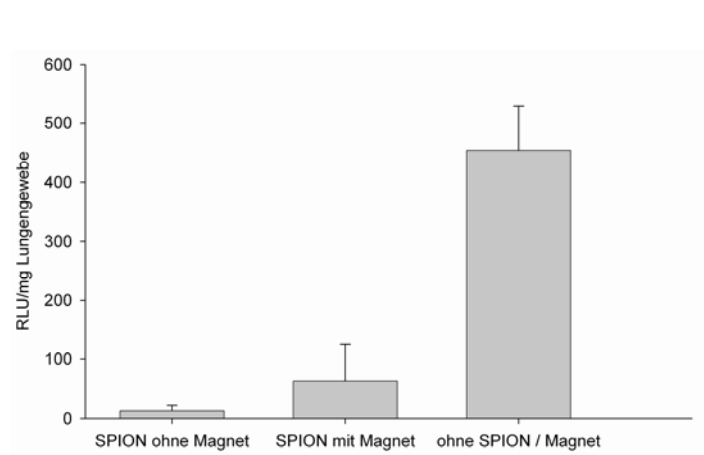
In einem ersten *Setting* wurden PEI-pDNA Komplexe zusammen mit SPION von Mäusen inhaliert. Als Plasmid wurde in diesem Fall pEGFP<sub>LucattB</sub> eingesetzt, das als Reportergen für Luziferase kodiert. 24 h nach der Aerosolapplikation von SPION zusammen mit PEI-pDNA

Komplexen konnte eine 4-fach höhere Luziferaseexpression im Homogenisat der Mäuslungen mit einem Röhrenluminometer (Lumat LB9507, siehe Kapitel 2.11) gemessen werden im Vergleich zur Expression, die nach der Aerosolapplikation der gleichen Partikel ohne externes Magnetfeld gemessen wurde (n=3). Allerdings war die Expression 7,5-fach niedriger als nach der Aerosolapplikation von einfachen PEI-pDNA Komplexen ohne SPION (und ohne Magnet) (Abb. 21).



**Abb.20 Maus mit würfelförmigem Permanentmagnet**

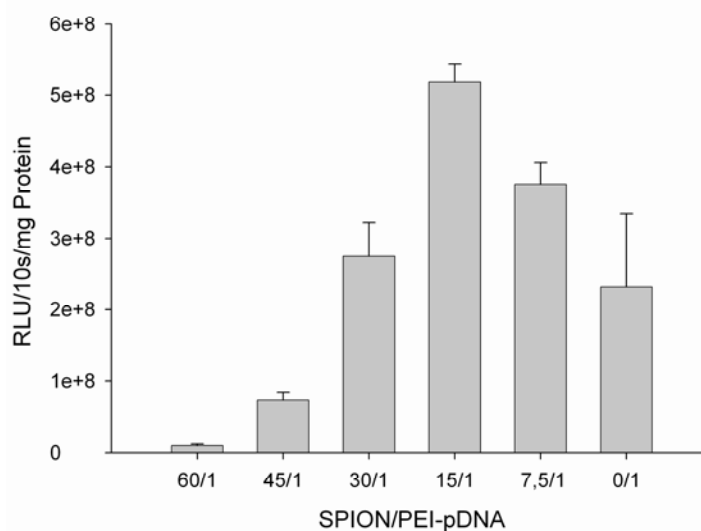
Als externes Magnetfeld wurde vor der Aerosolapplikation in der Vernebelungskammer ein 10 mm<sup>3</sup> großer, würfelförmiger Permanentmagnet (500 mT) mit Gewebekleber am Fell der Mäuse über den Lungen angebracht.



**Abb. 21 Genexpression in der Mauslunge nach Vernebelung von SPION-PEIpDNA Partikeln in die Vernebelungskammer**

1 mg pDNA komplexiert mit PEI (N/P=10) wurde mit SPION ( $c=12,5\text{mg/ml}$ ; Verhältnis Magnetpartikel zu pDNA 125:1; vernebeltes Volumen=10ml) in die Vernebelungskammer, in der sich die Mäuse befanden, vernebelt. Die Mäuse trugen entweder einen würfelförmigen Permanentmagneten ( $10\text{ mm}^3$ ) über der Lunge befestigt oder nicht. Die Luziferasegenexpression wurde in einem Röhrenluminometer (Lumat LB9507) gemessen.

Um zu sehen, ob das SPION/pDNA-Verhältnis möglicherweise die Ursache für dieses Phänomen war, wurden *in vitro* Experimente durchgeführt, wobei BEAS-2B Zellen mit PEI-pDNA und SPION in verschiedenen Verhältnissen co-transfiziert wurden. Dabei wurde während der Transfektion ein externes Magnetfeld appliziert. Genau wie in den *in vivo* Studien (Verhältnis SPION zu pDNA=125:1) war die Luziferaseexpression im Vergleich zur herkömmlichen Transfektion mit PEI-pDNA alleine bei hohen SPION/pDNA Verhältnissen erniedrigt. Bei niedrigeren SPION/pDNA Verhältnissen (15:1) konnte jedoch eine Verbesserung der Expressionswerte um das 2-fache detektiert werden im Vergleich zur Transfektion mit PEI-pDNA alleine (Abb. 22).



**Abb. 22** Luziferaseexpression *in vitro* 24 h nach der Magnetofektion von BEAS-2B Zellen mit PEI-pDNA SPION Partikeln in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen (w/w)

BEAS-2B Zellen wurden in 24-well Platten mit PEI-pDNA Komplexen, die mit SPION in einer wässrigen Lösung suspendiert vorlagen, transfiziert. Während der Transfektion stand die 24-well Platte auf einer mit

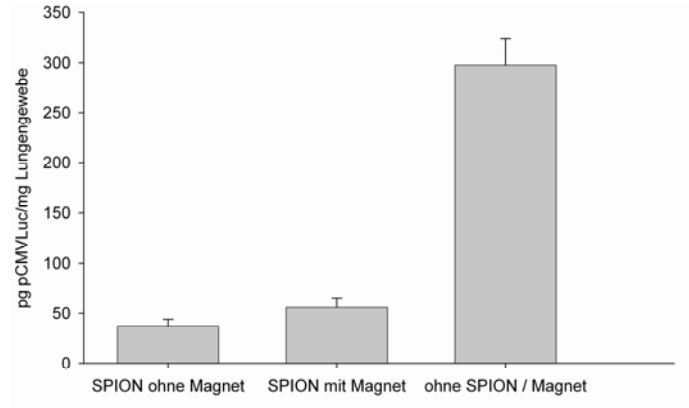
Permanentmagneten bestückten Platte (Magnetofektion). Nach 4h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit neuem MEM-Medium mit 10% FCS versorgt. Die Luziferaseexpression wurde nach 24 h im Bioluminometer Wallac Viktor<sup>2</sup> bestimmt.

In weiteren *in vivo* Studien wurden daher PEI-pDNA ( $c_{\text{DNA}}=0.2$  mg/ml) und niedrigere Konzentration der SPION ( $c=3.0$  mg/ml) verwendet (Verhältnis SPION/pDNA=15:1). Es konnte nach 24 h ein 1,5-facher Anstieg der pDNA Deposition in der gesamten Lunge mittels *Real Time* PCR detektiert werden, wenn ein externes Magnetfeld angewendet wurde im Vergleich zur Aerosolapplikation ohne externes Magnetfeld. Allerdings war die pDNA Deposition mit SPION in den Lungen um das 5-fache niedriger, als die pDNA Deposition nach Aerosolapplikation von PEI-pDNA alleine ohne externes Magnetfeld (Abb. 23 A).

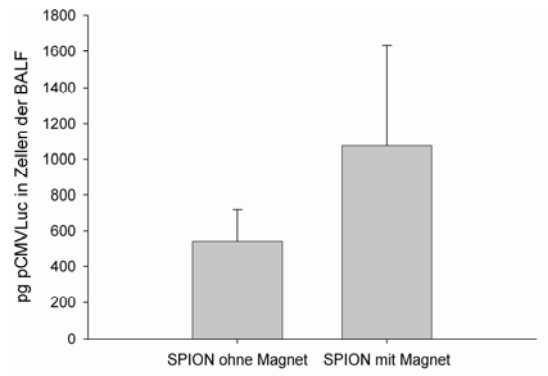
Bezüglich der Genexpression konnte keine Luziferase im Homogenisat der Mauslungen gemessen werden, wenn PEI-pDNA in Kombination mit SPION appliziert wurden (Abb. 23 C). Nach Aerosolapplikation von PEI-pDNA alleine konnte eine Luziferaseexpression gemessen werden. Allerdings wurde in diesen Versuchen pCMVLuc als Plasmid eingesetzt und die Luziferaseexpression in den Mauslungen war ~2-fach niedriger als nach Aerosolapplikation von PEI-pEGFPLuc-attB in dem oben beschriebenen ersten *Setting* (vgl. Abb. 21/23 C).

Die pDNA Deposition wurde auch in den BALF Zellen mittels *Real Time* PCR bestimmt. In den BALF Zellen konnten nach Aerosolapplikation von PEI-pDNA Komplexen in Kombination mit SPION und einem Magnetfeld ~7% der im Lungengewebe deponierten pDNA detektiert werden (Abb. 23 A, B). Nach Aerosolapplikation der gleichen Partikel ohne externem Magnetfeld wurden in den Zellen der BALF ~6% der im Lungengewebe deponierten pDNA detektiert (Abb. 23 A, B). Für die Berechnungen wurde von einem durchschnittlichen Mauslungengewicht von 260 mg ausgegangen.

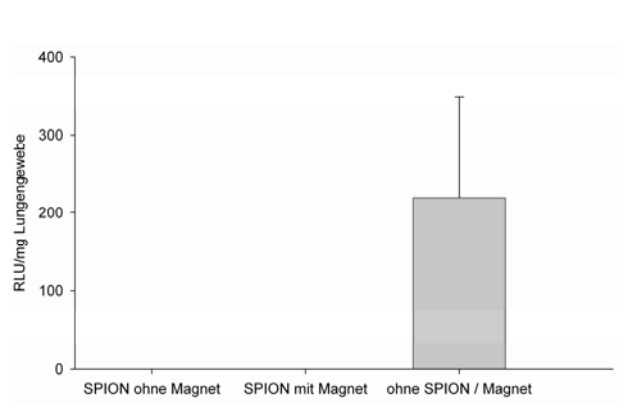
**A.**



**B.**



**C.**





**Abb. 23 Genexpression in der Mauslunge nach Vernebelung von SPION-PEIpDNA Partikeln in die Vernebelungskammer**

2 mg pDNA komplexiert mit PEI (N/P=10) wurde mit SPION ( $c=3,125\text{mg/ml}$ ; Verhältnis Magnetpartikel zu pDNA 15:1; vernebeltes Volumen=10ml) in die Vernebelungskammer in der sich die Mäuse befanden, vernebelt. Die Mäuse trugen in diesem Experiment entweder zwei würfelförmigen Permanentmagneten ( $10\text{ mm}^3$ ) über der Lunge oder keinen Magneten. Es konnte die 1,5-fache Deposition von pDNA in Mauslungen mittels *Real Time* PCR nach 24 h detektiert werden, die unter dem Einfluss der Permanentmagneten standen, im Vergleich zu Mäusen ohne externes Magnetfeld ( $n=3$ ) (A). Die pDNA wurde 24 h nach der Behandlung auch in den Zellen der BALF bestimmt (B). Es wurde die 2-fache Menge pDNA in den Zellen der BALF gefunden, wenn SPION in Kombination mit PEI-pDNA und externem Magnetfeld appliziert wurden. Luziferaseexpression, die 24 h nach der Behandlung mit einem Röhrenluminometer bestimmt wurde, war nur nach Aerosolapplikation von PEI-pDNA alleine messbar (C).

**5.3 Zusammenfassende Betrachtung der Genexpression und pDNA Deposition in Mauslungen nach magnetfeldgesteuerter Aerosolapplikation in der Vernebelungskammer**

In den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist, die pDNA Deposition und die Luziferaseexpression in Mauslungen zu erhöhen, wenn magnetische Aerosole in Kombination mit einem Permanentmagneten im Vernebelungskammer-Model angewendet werden.

Die Versuche in der Vernebelungskammer, wobei die Mäuse freibeweglich in der Kammer platziert waren, wurden durchgeführt, weil nach Ultraschallvernebelung von magnetischen Aerosolen via Tracheotomie keine Luziferaseexpression in Mauslungen gemessen werden konnte (vgl. 5.1). Das Model der Aerosolapplikation an Mäuse, die in einer Vernebelungskammer platziert sind, zeigte in vorangegangenen Studien reproduzierbare Ergebnisse im Bezug auf pDNA Deposition und Luziferaseexpression in Mauslungen (siehe auch Kapitel 2.8.2 und 3.2.).

In einem ersten *Setting* wurde das Plasmid pEGFPLuc-attB zur Aerosolapplikation von PEI-pDNA Komplexen zusammen mit SPION eingesetzt. 24 h nach der Aerosolapplikation von PEI-pDNA Komplexen in Kombination mit SPION konnte eine 4-fach höhere Luziferaseexpression gemessen werden, wenn die Mäuse einen Permanentmagneten am Fell über der Lunge fixiert

trugen im Vergleich zu Mäusen ohne Magnet. Das bedeutet, dass Ablenkung der pDNA-haltigen magnetischen Aerosole durch einen Permanentmagneten im Vernebelungskammer-Modell möglich ist. Die Stärke des magnetischen Feldes war mit 500 mT dementsprechend ausreichend (vgl. Elektromagnet 1 T, bei 10 A). Es konnte in diesem Versuch auch gezeigt werden, dass die applizierte pDNA funktionell aktiv war, da das Reporter-gen Luziferase exprimiert wurde. Allerdings wurde nach Vernebelung von PEI-pDNA in Kombination mit SPION eine 7,5-fach niedrigere Luziferaseexpression detektiert im Vergleich zur Applikation von PEI-pDNA alleine (Abb. 21).

Um die Gründe für die geringere Expression durch PEI-pDNA in Kombination mit SPION im Vergleich zu PEI-pDNA alleine genauer zu untersuchen, wurden *in vitro* Transfektionen von Bronchialepithelzellen durchgeführt. Mit Hilfe der *Magnetofektion* (PEI-pDNA in Kombination mit SPION und externem Magnetfeld), konnte in früheren Studien schon eine Akkumulation der Genvektorkomplexe im Einflussbereich des Magnetfeldes und eine nachfolgend hohe Gentransfereffizienz *in vitro* nachgewiesen werden [91-93].

In der hier durchgeführten Untersuchung wurde nun festgestellt, dass bei der Applikation von SPION in Kombination mit PEI-pDNA in einem hohen Verhältnis von 60:1 bis 30:1 (unter dem Einfluss eines externen Magnetfeldes) die Luziferaseexpression *in vitro* niedriger war im Vergleich zur Expression nach Transfektion mit PEI-pDNA alleine (Abb. 22). Bei niedrigeren SPION/pDNA Verhältnissen jedoch war die Luziferaseexpression nach PEI-pDNA Applikation in Kombination mit SPION und einem externen Magnetfeld höher als nach Applikation von PEI-pDNA alleine. Das optimale SPION/PEI-pDNA Verhältnis lag *in vitro* bei 15:1, wobei eine 2-fach höhere Luziferaseexpression detektiert werden konnte als durch PEI-pDNA alleine. Möglicherweise ist bei hohen SPION/pDNA Verhältnissen die Aufnahme der PEI-pDNA Komplexe in die Zellen *in vitro* rein physikalisch durch die hohe Menge an SPION gehemmt.

Deshalb wurden weitere *in vivo* Versuche mit Mäusen in der Vernebelungskammer durchgeführt, wobei SPION und pDNA im Verhältnis 15:1 eingesetzt wurden. Im Bezug auf die pDNA Deposition in den Mauslungen konnte eine 1,5-fach höhere pDNA Deposition nach

Aerosolapplikation von PEI-pDNA in Kombination mit SPION und Magnetfeld gemessen werden als nach der Applikation der gleichen *Nanomagnetosole* ohne Magnetfeld. Allerdings war die Deposition 5-fach niedriger, als nach Applikation von PEI-pDNA alleine (ohne Magnetfeld). Die 5-fach niedrigere Deposition von pDNA in den Mäuslungen nach Applikation von PEI-pDNA in Kombination mit SPION ist vermutlich auch der Grund dafür, dass 24 h nach Aerosolapplikation keine Luziferaseexpression detektiert werden konnte. Ein anderer Grund könnte sein, dass in diesen Versuchen pCMVLuc als Plasmid eingesetzt wurde. Nach Aerosolapplikation von PEI-pDNA alleine führte es zu einer 2-fach niedrigeren Luziferaseexpression als das Plasmid pEGFP<sub>Luc</sub>-attB, das in den vorherigen Versuchen eingesetzt wurde. Möglicherweise sind die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen auch nicht auf die *in vivo* Situation übertragbar. *In Vivo* könnte ein anderes optimales SPION/pDNA-Verhältnis vorliegen, das in weiteren Experimenten herausgefunden werden müsste.

In den Zellen der BALF konnten interessanter Weise 24 h nach Aerosolapplikation von PEI-pDNA in Kombination mit SPION (mit oder ohne externem Magnetfeld) ~6-7% der deponierten pDNA detektiert werden. Im Vergleich dazu wurden nur 0,01% der deponierten pDNA in BALF Zellen gefunden, wenn PEI-pDNA Komplexe alleine als Aerosol im Vernebelungskammer-Model appliziert wurden (vgl. Kapitel 3.2). Die höhere Aufnahme von pDNA Partikeln durch alveoläre Makrophagen nach Aerosolapplikation von *Nanomagnetosolen* könnte ein weiterer Grund für die nach 24 h gemessene geringere pDNA Deposition im Lungengewebe und somit dafür sein, dass keine Luziferaseexpression gemessen werden konnte. Dies scheint aber eher unwahrscheinlich, angesichts der Tatsache, dass es sich nur um 6-7% der pDNA handelte, sich also über 90% der pDNA im Lungengewebe befanden.

Es ist nicht vollkommen klar, warum die *Co-Applikation* von PEI-pDNA zusammen mit SPION als Aerosol zu einer höheren Aufnahme von pDNA durch alveoläre Makrophagen führte als nach Aerosolapplikation von PEI-pDNA alleine.

Eine Ursache könnte die Größe der vernebelten Partikel sein. Die mittels Photonenkorrelationspektroskopie gemessene Größe der vernebelten Partikel (100 nm) lag

zwischen 90 und 180 nm. Diese Größenordnung ist eine akzeptable Partikelgröße für eine reproduzierbare Genexpression nach Aerosolapplikation in die Vernebelungskammer (vgl. Kapitel 3). Partikel dieser Größe führten dabei nicht zu einer erhöhten Phagozytose durch alveoläre Makrophagen.

Vernebelte Partikel	Vernebelte pDNA	Größe der Partikel
PEI-pCMVLuc	1 mg	90 nm
PEI-pCMVLuc	2 mg	180 nm
PEI-pCMVLuc/SPION	2 mg	100 nm

**Tabelle 7 Größe der vernebelten Partikel**

Wie in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, werden PEI-pDNA Komplexe über anionischen Heparansulfat-Proteoglykan-Rezeptoren auf der Zelloberfläche in die Zellen aufgenommen. Man könnte daher vermuten, dass die Aufnahme der positiven PEI-pDNA Partikel durch die Zellmembran der Alveolarzellen von den ebenfalls positiven SPION, die an der Oberfläche mit PEI beschichtet sind, kompetitiv gehemmt wird. Dabei werden die PEI-pDNA Komplexe langsamer und in einem geringeren Ausmaß in die Alveolarzellen aufgenommen und können so in einem höheren Ausmaß von alveolären Makrophagen phagozytiert werden.

In zukünftigen Studien müssen also die SPION, die in Kombination mit PEI-pDNA als *Nanomagnetosole* verabreicht werden, optimiert und im Bezug auf ihren Einfluss auf die *Clearance* der pDNA durch alveoläre Makrophagen nach Aerosolapplikation genauer untersucht werden. Wenn der hier beobachtete nachteilige Effekt durch die Kombination von SPION und PEI-pDNA Partikeln aufgehoben werden könnte, wäre eine doppelt so hohe und gezielte Deposition in bestimmten Lungenregionen durch Applikation eines externen Magnetfeldes während der Aerosolapplikation eine große Verbesserung gegenüber bestehenden Modellen.

Weitere Versuche im Bezug auf die Ablenkbarkeit therapeutischer Aerosole durch ein externes Magnetfeld und den Nachweis der Wirksamkeit dieser Aerosole werden auf der Grundlage der beschriebenen Mausstudien im Schweinemodel durchgeführt werden. Der Organismus des Schweines ist dem des Menschen ähnlicher und der Versuchsaufbau mit externem Magnetfeld ist an größeren Tieren als Mäusen einfacher durchzuführen. Außerdem kann auf Grund der Größe der Versuchstiere auch die regionale Deposition der SPION-Wirkstoff-Partikel leichter untersucht werden und ein Vergleich zwischen Lungenregionen, in denen eine Partikeldeposition stattgefunden hat, und „unbehandelten“ Regionen ist leichter möglich.