

**Methoden zur Charakterisierung von großtechnisch  
hergestellten Lipoplexen  
zum Gentransfer**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.**

***2005***

vorgelegt von

**Jule Clement**

aus Tübingen

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Januar 2002 bis Februar 2005 am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie des Institutes für Pharmazeutische Wissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg im Breisgau.

Dekan:	Prof. Dr. H. Hillebrecht
Vorsitzender des Promotionsausschusses:	Prof. Dr. G. E. Schulz
Referentin:	PD Dr. R. Peschka-Süss
Korreferent:	Prof. Dr. R. Schubert
Tag der Bekanntgabe des Prüfungsergebnisses:	07.07.2005

Mein Dank gilt:

Meiner Doktormutter Frau PD Dr. Regine Peschka-Süss, bei der ich mich herzlich für die Aufnahme in den Arbeitskreis, für die Betreuung und Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit und von Veröffentlichungen und für ihr Verständnis bedanken möchte.

Herrn Prof. Dr. Rolf Schubert für ein harmonisches Arbeitsklima, anregende Diskussionen, Unterstützung und für die Bereitstellung finanzieller Mittel.

Der Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Biberach, für die finanzielle Unterstützung und Bereitstellung von Geräten, besonders Herrn Dr. Patrick Garidel für die gute und konstruktive Zusammenarbeit sowie allen weiteren am Gentherapie-Projekt beteiligten Personen.

Frau Birgit Erhard, Frau Sabrina Adler und Frau Zakia Khalil für die Mitwirkung an Projekten und Unterstützung im Laboralltag.

Herrn PD Dr. Ulrich Massing für die Möglichkeit der Gerätenutzung und leckeren Kaffee.

Herrn Missbach von der LaborChemie Gerätevertriebsges.m.b.H. für die unentgeltliche Bereitstellung eines PCS-Gerätes.

Herrn Wolf Ulrich Michaelis und Herrn Dr. Bochow für fachlichen Beistand und die gute Zusammenarbeit im Praktikum.

Frau Margit Singer für ihre Mitwirkung im Rahmen eines Mitarbeiterpraktikums.

Frau Dr. Andrea Kimpfler, Herrn Andreas Neub und Herrn Dr. Bibus für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Herrn Pfeiffer für die Durchführung des Bartlett-Assays.

Frau Nuria Beltran-Sanchez für ihre Hilfe bei organisatorischen Fragen.

Herrn Peter Wiest und Herrn Sascha Ferlaino für ihre Hilfe bei technischen Problemen.

Allen Kolleginnen und Kollegen aus der Pharmazeutischen Technologie für ein gutes Arbeitsklima, hilfreiche Diskussionen und viel Spaß.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Steffi Häfele für fachliche Tips und Tricks, Korrekturlesen von zahlreichen Manuskripten, der stetigen Verbreitung guter Stimmung und Unterstützung in allen Lebenslagen. Bei Karin Kiefer für die Einarbeitung und gute Zusammenarbeit sowie bei Uli Huth und Andreas Fritze für die vielen fachlichen Hilfen und lustigen Stunden vom ersten bis zum letzten Tag.

All meinen Freundinnen und Freunden, die mit mir diese Zeit durchlebt haben.

Für meine Eltern

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. SOMATISCHE GENTHERAPIE .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. LIPIDVERMITTELTEN GENTRANSFER .....</b>	<b>3</b>
1.2.1. HERSTELLUNG LIPOSOMALER GENTRANSFERSYSTEME .....	8
1.2.2. BIOLOGISCHE AKTIVITÄT UND PHYSIKALISCHE STABILITÄT LIPOSOMALER GENTRANSFERSYSTEME .....	9
<b>1.3. METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG UND ANALYTIK VON LIPOPLEXEN .....</b>	<b>12</b>
1.3.1. TRANSFEKTIONSEFFIZIENZ UND ZYTOTOXIZITÄT .....	12
1.3.2. PARTIKELGRÖSSE UND STRUKTUR .....	15
1.3.3. PARTIKELLADUNG .....	17
1.3.4. LIPIDANALYTIK .....	17
1.3.5. DNA-ANALYTIK .....	19
1.3.6. METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG VON LYOPHILISATEN .	19
1.3.6.1. Restfeuchtebestimmung .....	19
1.3.6.2. Rasterelektronenmikroskopie .....	20
<b>1.4. ZIEL DER ARBEIT .....</b>	<b>20</b>
<b>2. Material und Geräte .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1. MATERIAL .....</b>	<b>23</b>
2.1.1. PLASMIDE .....	23
2.1.2. LIPOSOMALE TRANSFEKTIONSREAGENZIE .....	23
2.1.3. ZELLEN .....	23
2.1.4. ZELLKULTURREAGENZIE .....	24
2.1.5. CHEMIKALIEN .....	24
2.1.6. ENZYME UND BAKTERIENSTÄMME .....	26
2.1.7. LÖSUNGEN UND PUFFER .....	26
2.1.8. COMMERCIAL KITS .....	27
2.1.9. VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	28
2.1.10. SONSTIGE MATERIALIEN .....	28
<b>2.2. GERÄTE .....</b>	<b>29</b>
<b>3. Methoden .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1. HERSTELLUNG DER LIPOPLEXE .....</b>	<b>31</b>
3.1.1. HERSTELLUNG DER LIPOPLEXE IM KLEINEN MASSSTAB DURCH PIPETTIEREN .....	31

---

3.1.1.1.	Lipoplexe für TNS-Assay .....	32
3.1.2.	KONTINUIERLICHE HERSTELLUNG DER LIPOPLEXE IM GROSSMASSSTAB MIT ANSCHLIESSENDE LYOPHILISATION .....	32
3.1.2.1.	Kontinuierliche Herstellung der Lipoplexe.....	32
3.1.2.2.	Lyophilisation.....	34
<b>3.2.</b>	<b>AUFARBEITUNG DER LIPOPLEXE FÜR ANALYTISCHE ZWECKE .....</b>	<b>34</b>
3.2.1.	AUFARBEITUNG DER LYOPHILISATE .....	35
3.2.1.1.	Herstellung von Lipoplexdispersionen .....	35
3.2.1.2.	Herstellung von Dispersionen mit freiem Lipid und DNA .....	35
3.2.1.3.	Extraktion der Lyophilisate.....	35
<b>3.3.</b>	<b>ZELLEN UND PLASMID .....</b>	<b>35</b>
3.3.1.	KULTIVIERUNG.....	35
3.3.2.	VORBEREITUNG DER ZELLEN ZUR TRANSFEKTION.....	36
3.3.3.	PLASMIDGEWINNUNG.....	36
3.3.3.1.	Transformation .....	36
3.3.3.2.	Plasmidisolierung .....	36
3.3.3.3.	Bestimmung der Plasmidkonzentration .....	37
3.3.3.4.	Agarosegel-Elektrophorese .....	37
<b>3.4.</b>	<b>METHODEN ZUR ANALYTIK UND CHARAKTERISIERUNG VON LIPOPLEXEN.....</b>	<b>38</b>
3.4.1.	TRANSFEKTIONSEFFIZIENZ UND ZYTOTOXIZITÄT .....	38
3.4.1.1.	Transfektion.....	38
3.4.1.2.	Durchflusszytometrie .....	38
3.4.1.3.	CellTiter-Glo™ Test.....	39
3.4.2.	PARTIKELGRÖSSE UND STRUKTUR .....	40
3.4.2.1.	Photonenkorrelations-Spektroskopie (PCS) .....	40
3.4.2.2.	Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie (Cryo-TEM).....	41
3.4.2.3.	Fluoreszenzmessung von DNA durch Ausschluss und Verdrängung aus Lipoplexen .....	41
3.4.2.3.1.	Ausschlussverfahren .....	42
3.4.2.3.2.	Verdrängungsverfahren.....	43
3.4.2.4.	Agarosegel-Elektrophorese .....	43
3.4.3.	PARTIKELLADUNG.....	44
3.4.3.1.	Zetapotential.....	44

---

3.4.3.2. Oberflächenladung mittels 2-(p-Toluidinyl) naphthalin-6-sulfonsäure (TNS)-Assay.....	44
3.4.4. LIPIDQUANTIFIZIERUNG .....	45
3.4.4.1. Hochleistungsdünnschicht-Chromatographie (HPTLC) .....	45
3.4.4.2. Bartlett-Assay .....	47
3.4.4.3. Fluorescamin-Assay .....	48
3.4.5. DNA-QUANTIFIZIERUNG.....	49
3.4.5.1. UV-Messung.....	49
3.4.5.2. PicoGreen-Assay.....	49
<b>3.5. CHARAKTERISIERUNG DER LYOPHILISATE .....</b>	<b>50</b>
3.5.1. ERMITTLUNG DER MORPHOLOGIE DURCH RASTER-ELEKTRONENMIKROSKOPIE (REM) .....	50
3.5.2. ERMITTLUNG DER RESTFEUCHTE DURCH KARL-FISCHER-TITRATION .....	50
<b>4. Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1. METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG UND ANALYTIK LYOPHILISierter DC-30- UND DAC-30/DNA-LIOPLEXE .....</b>	<b>51</b>
4.1.1. TRANSFEKTIONSEFFIZIENZ UND ZYTOTOXIZITÄT .....	52
4.1.1.1. Ermittlung der Transfektionseffizienz und Zytotoxizität mittels Durchflusszytometrie.....	52
4.1.1.1.1. Einfluss unterschiedlicher Lipid/Plasmid Verhältnisse (w/w) .....	52
4.1.1.1.2. Einfluss zunehmender Lipid- und Plasmidmengen.....	53
4.1.1.2. Ermittlung der Zellviabilität mittels CTG-Test.....	54
4.1.1.2.1. Einfluss von Lipoplexen mit unterschiedlichen Masseverhältnissen.....	54
4.1.1.2.2. Einfluss zunehmender Lipid- und Plasmidmengen.....	55
4.1.1.3. Vergleich der Methoden zur Bestimmung der Toxizität .....	56
4.1.2. PARTIKELGRÖSSE UND STRUKTUR .....	58
4.1.2.1. PCS .....	58
4.1.2.1.1. Einfluss des Ladungsverhältnisses auf die Grösse .....	58
4.1.2.1.2. Einfluss des Herstellungsverfahrens .....	61
4.1.2.2. Cryo-TEM .....	62
4.1.2.3. Fluoreszenzmessung von DNA durch Ausschluss und Verdrängung aus Lipoplexen .....	64

---

4.1.2.4.	Agarosegel-Elektrophorese .....	66
4.1.2.4.1.	Lipoplexe mit verschiedenen Verhältnissen .....	66
4.1.2.4.2.	Einfluss des Herstellungsverfahrens .....	67
4.1.3.	PARTIKELLADUNG .....	69
4.1.3.1.	Zetapotential .....	69
4.1.3.1.1.	Einfluss des Mediums auf das Zetapotential pipettierter Lipoplexe .....	69
4.1.3.1.2.	Einfluss des Herstellungsprozesses .....	72
4.1.3.2.	Oberflächenladung mittels TNS-Assay .....	72
4.1.3.2.1.	DNA .....	73
4.1.3.2.2.	Liposomen .....	73
4.1.3.2.3.	Lipoplexe mit unterschiedlichen Ladungsverhältnissen .....	74
4.1.3.2.4.	Lyophilisierte Lipoplexe .....	75
4.1.3.3.	Zusammenhang von Zetapotential und TNS-Assay .....	76
4.1.4.	LIPIDANALYTIK .....	77
4.1.4.1.	Bartlett-Assay .....	77
4.1.4.2.	HPTLC .....	79
4.1.4.2.1.	Auftrennung der Lipidbestandteile .....	79
4.1.4.2.2.	Detektion .....	80
4.1.4.2.3.	Wiederfindung der Lipidbestandteile aus lyophilisierten Lipoplexen .....	83
4.1.4.3.	Fluorescamin-Assay .....	85
4.1.4.4.	Bewertung der Methoden zur Lipid-Quantifizierung .....	86
4.1.5.	DNA-QUANTIFIZIERUNG .....	87
4.1.5.1.	UV-Messung .....	87
4.1.5.2.	PicoGreen-Assay .....	88
4.1.5.3.	Bewertung der Methoden zur DNA-Quantifizierung .....	91
4.1.6.	STABILITÄT UND LAGERFÄHIGKEIT LYOPHILISierter LIPOPLEXE .....	91
4.1.6.1.	Transfektionseffizienz und Zytotoxizität .....	92
4.1.6.2.	Partikelgrösse .....	94
4.1.6.3.	Zetapotential .....	95
4.1.6.4.	Lipidgehalt mit Fluorescamin-Assay .....	96
4.1.6.5.	DNA-Gehalt durch UV-Messung .....	97



---

4.1.7. REPRODUZIERBARKEIT DES SCALE-UP VERFAHRENS UND VERGLEICHBARKEIT DER METHODEN .....	98
4.1.7.1. Transfektionseffizienz und Zytotoxizität .....	101
4.1.7.2. Partikelgrösse und Struktur .....	104
4.1.7.2.1. PCS .....	104
4.1.7.2.2. Cryo-TEM .....	105
4.1.7.2.3. Agarosegel-Elektrophorese .....	106
4.1.7.3. Zetapotential .....	109
4.1.7.4. Lipidquantifizierung mittels HPTLC, Bartlett-Assay und Fluorescamin-Assay .....	109
4.1.7.5. DNA-Quantifizierung mittels UV-Messung und PicoGreen-Assay .	112
4.1.8. METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DER LYOPHILISATE ..	113
4.1.8.1. Restfeuchtebestimmung durch Karl-Fischer-Titration.....	113
4.1.8.2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	115
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>117</b>
<b>6. Literatur .....</b>	<b>124</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino-Actinomycin-D
ADA	Adenosindesaminase
AMG	Arzneimittelgesetz
ANS	8-Anilino-1-naphthalin-sulfonat
A-10 SMC	glatte Rattenmuskelzellen
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
Cryo-TEM	Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie
CTG-Test	CellTiter-Glo Test
cm	Zentimeter
D	Diffusionskoeffizient
DAC-Chol	(3β[N-(N,N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]-cholesterol)-HCl
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DC-Chol	(3β-N-[(N',N'- Dimethylaminoethan)-carbamoyl]-cholesterol-HCl
DEAE-Dextran	Diethylaminoethyl-Dextran
DeReG	Deutsches Register für somatische Gentransferstudien
d(h)	Hydrodynamischer Durchmesser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
DOPE	Dioleoylphosphatidylethanolamin
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum
FI	Fluoreszenzintensität
FSC	<i>forward angle light-scatter</i>
g	Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GMP	<i>good manufacturing practice</i> (Gute Herstellungspraxis)
h	Stunde
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssig-Chromatographie)

---

HPTLC	<i>high performance thin layer chromatography</i> (Hochleistungsdünnschicht-Chromatographie)
kb	Kilobasen
kcps	<i>kilocounts per second</i>
l	Liter
m	Masse
MeOH	Methanol
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
M <sub>r</sub>	relative Molmasse
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid
mV	Millivolt
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar, 10 <sup>-6</sup> Mol pro Liter Lösung
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
n.e.	nicht ermittelt
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
Pa	Pascal
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
PharmBetrV	Pharmazeutische Betriebsverordnung
r	Radius
RLU	relative light units
RT	Raumtemperatur
RNase	Ribonuclease
s	Sekunde
sd	<i>standard deviation</i>
SSC	<i>sideward scatter</i>

---

T	Temperatur
TE	Transfektionseffizienz
TNS	2-( <i>p</i> -Toluidinyl)-naphthalin-6-sulfonsäure Natriumsalz
Tox	Toxizität
TR	Transfektionsreagenz
TRM	Transfektionsmedium
UV	Ultraviolett
V	Volumen
VT	Volumenteil
ZP	Zetapotential

# 1. Einleitung

## 1.1. SOMATISCHE GENTHERAPIE

Die gezielte Einführung von Genen oder Polynukleotiden in Zellen wird als Gentransfer bezeichnet. Dies ist abzugrenzen vom Begriff der Gentherapie, die den Gentransfer in menschliche Zellen oder Gewebe mit therapeutischer Zielsetzung beschreibt („Richtlinien zum Gentransfer in menschliche Körperzellen“, [www.bundesaerztekammer.de](http://www.bundesaerztekammer.de)). Die somatische Gentherapie dient diagnostischen, therapeutischen oder präventiven Zwecken. Im Gegensatz zur Keimbahntherapie werden eingeführte Gene nicht von einer zur nächsten Generation weitergegeben. Ein Patient wird mit einem therapeutischen Gen behandelt, das seinen Zellen ermöglicht, fehlende oder nutzbringende Stoffe neu zu synthetisieren. Dabei können zwei Wege unterschieden werden. In der Ex-vivo-Therapie werden dem Patienten Zellen oder Gewebe entnommen, in welche das therapeutische Gen eingebracht wird. Anschließend erfolgt eine Reimplantation der Zellen. Die In-vivo-Therapie verfolgt den Ansatz, dass die genetische Information mit einem Vektor direkt lokal oder systemisch appliziert wird. Ein Beispiel hierfür ist die Mukoviszidose, für deren Behandlung ein therapeutisches Gen über Inhalation appliziert wird.

Begünstigte Ziele sind monogenetische Störungen wie z.B. Hämophilie, Adenosindesaminase-Mangel oder Mukoviszidose, welche aufgrund der einfacheren Lokalisierung des Gendefektes gezielt therapiert werden können. Eine weitere Möglichkeit wäre die Suppression pathogener Genaktivitäten. Wesentlich komplexer sind polygenetische Störungen wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder erworbene genetische Erkrankungen wie AIDS, bei denen mehrere defekte Gene an der Erkrankung beteiligt sind.

Da „nackte“ DNA nach Einbringung in Zellen durch Nukleasen sehr schnell abgebaut wird und außerdem meist nur unzureichend in Zellen permeieren kann, muss die genetische Information mit Hilfe eines Vektors, d. h. Vehikel zum Transport, in die Zellen eingeschleust werden.

Die Wahl eines geeigneten Vektors hängt u. a. davon ab, ob der Gentransfer in vitro, das heißt in der Zellkulturschale oder in vivo am Patienten durchgeführt werden soll, da dadurch unterschiedliche Anforderungen an Sicherheit und Zielgenauigkeit gestellt werden. Ein idealer Vektor sollte mehreren Anforderungen genügen, wie

effektives Einbringen des therapeutischen Gens in die Zielzelle, Selektivität für die gewünschten Zielzellen, hohe Aufnahmekapazität von Genen, Erzielen einer ausreichend langen Expression, sowie fehlende Immunogenität und Pathogenität und schließlich eine hohe Sicherheit bei Umgang mit dem Vektor.

Die derzeit verwendeten Vektoren lassen sich in drei Gruppen aufteilen. Dies sind biologische, physikalische und chemische Vektoren. Bei den biologischen Vektoren sind Viren, in der Mehrzahl Retro- und Adenoviren, zu nennen. Virale Vektoren werden am häufigsten in klinischen Studien eingesetzt (Hallek et al. 2001). Die Fähigkeit der Viren, Gene in infizierte Wirtszellen einzubringen, wird dabei therapeutisch ausgenutzt. Bei der Vektorherstellung werden bestimmte Gene aus dem Virus entfernt oder zerstört, wodurch dieser vermehrungsunfähig wird und dadurch die Pathogenität verliert. Durch Einsetzen des Therapiogens entsteht ein rekombinantes Virus, das zum Gentransfer verwendet werden kann. Viren weisen eine hohe Transfektionseffizienz auf und erreichen ein breites Spektrum an Zellen (Imai et al. 1998). Allerdings ist die Anwendung in vivo mit einigen Problemen behaftet. Toxische Reaktionen und Reaktionen des Immunsystems schränken die Möglichkeit einer wiederholten Applikation ein (Yang et al. 1994). Die Aufreinigung und Herstellung im großen Maßstab ist schwierig und die Beladungskapazität ist beschränkt. Seit dem tödlichen Verlauf einer Gentherapie-Studie im Jahr 1999 bei dem Patienten Jesse Gelsinger sowie dem Auftreten von Leukämie bei 3 gentherapeutisch behandelten Kindern steht die virale Gentherapie unter besonders kritischer Beobachtung (Somia und Verma 2000; Teichler 2000; Kohn et al. 2003).

Zu den physikalischen Gentransfermethoden zählen die Mikroinjektion (direkte Applikation der DNA in den Zellkern oder in das Zytoplasma), die Biobalistik, bei der mit Hilfe einer Genkanone Goldpartikel, die mit DNA beladen sind, auf Gewebe oder Zellen geschossen werden (Biolistic<sup>®</sup> oder Helios<sup>®</sup> zur Applikation von Impfstoffen) oder die Elektroporation, bei der durch kurze Hochspannungsimpulse die Permeabilität der Zellwand erhöht wird und exogene DNA aufgenommen werden kann (Capecchi 1980; Stopper et al. 1987; Vassilev et al. 2001; Bridgman et al. 2003).

Schließlich sind die chemischen Vektoren zu nennen. Hierzu zählen Polymere (Polyethylenimin (PEI), Poly-L-Lysin, Diethylaminoethyl-(DEAE-) Dextran) (Boussif et al. 1995; Boussif et al. 1996; Gregory et al. 2003), Dendrimere wie Superfect<sup>®</sup> (Tang et al. 1996; Gebhart und Kabanov 2001) sowie kationische Lipide, die im folgenden

Teil ausführlicher besprochen werden. Aufgrund der kationischen Ladungen können die Substanzen mit der negativ geladenen DNA Komplexe, sogenannte Lipoplexe (mit Lipiden), Polyplexe (mit Polymeren) oder, bei Vorliegen einer Mischform, Lipopolyplexe bilden (Felgner et al. 1997). Synthetische (chemische) Vektoren wurden wegen der geringeren Toxizität und der einfacheren Herstellung zunehmend als Alternative zu viralen Vektoren untersucht (Thomas und Klibanov 2003).

1990 wurde erstmalig eine Gentherapiestudie am Menschen mit viralen Vektoren zur Therapie des ADA-Mangels durchgeführt, 1994 fand die erste Gentherapiestudie in Deutschland statt (Hallek et al. 2001) und seit 2004 ist auf dem chinesischen Markt ein gentherapeutisches Produkt erhältlich (Pearson et al. 2004). Im Jahr 1993 wurde die erste klinische Studie, in der kationische Lipide als Vektoren verwendet wurden, beschrieben (Nabel et al. 1993). Seitdem wurden zahlreiche weitere Gentherapiestudien mit liposomalen Vektoren durchgeführt, zum großen Teil zur Therapie von Krebserkrankungen (Hortobagyi et al. 2001; DeReG 2002) und Zystischer Fibrose (Knowles et al. 1998; Alton et al. 1999; Noone et al. 2000).

## **1.2. LIPIDVERMITTELTEN GENTRANSFER**

Kationische Lipide stellen eine vielversprechende Alternative zu den viralen Vektorsystemen dar. Sie weisen eine große Transportkapazität für genetisches Material auf und sind leicht in großem Maßstab herzustellen (Dani 1999; Zhdanov et al. 2002). Trotz berichteter toxischer Reaktionen (Loisel et al. 2001) ist das Sicherheitsrisiko geringer als bei den viralen Systemen, da die Verabreichung von liposomalen Gentransfersystemen nicht zur Bildung von Antikörpern führt (Nabel et al. 1992; Nabel et al. 1993; Hyde et al. 2000). Jedoch ist die Effizienz der liposomalen Gentransfersysteme nach wie vor vergleichsweise niedrig (Walther und Stein 2000).

Ziel des lipidvermittelten Gentransfers ist es, durch Komplexierung von DNA mit kationischen Lipiden genetische Informationen in Zellen einzuschleusen und dort zur Expression zu bringen. Bis zur Expression des Proteins sind verschiedene Voraussetzungen zu erfüllen. Nach der Bindung der Lipoplexe an die Zelloberfläche müssen diese in die Zelle aufgenommen werden. Falls die Aufnahme durch clathrinabhängige Endozytose abläuft, müssen die Partikel aus dem Endosom freigesetzt und durch das Zytosol transportiert werden, bevor Dissoziation der Lipoplexe, Aufnahme der DNA in den Zellkern und anschließend die Transkription

stattfinden kann (Escriou et al. 1998; Cornelis et al. 2002). Die in diesen Prozessen involvierten zellulären und molekularen Mechanismen konnten noch nicht komplett aufgeklärt werden. Fest steht aber, dass die verschiedenen Schritte teilweise deutliche Barrieren für einen effizienten Gentransfer darstellen (Bally et al. 1999; Wiethoff und Middaugh 2003), siehe auch Abbildung 1.2.1-1.

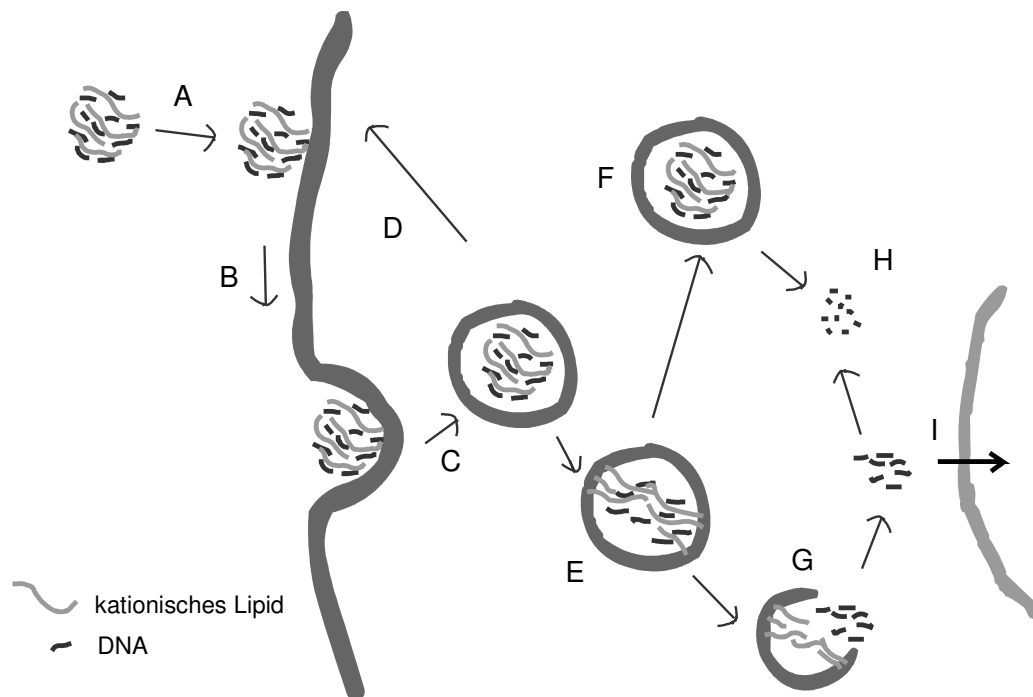


Abbildung 1.2.1-1 Barrieren des lipidvermittelten Gentransfers. Bindung der Komplexe bestehend aus kationischem Lipid und DNA an die Zelloberfläche (A). Aufnahme in die Zelle (B), wo die Komplexe meist in intrazellulären Vesikeln wiedergefunden werden. Die aufgenommenen Komplexe gelangen in frühe Endosomen (C). Dort kommt es zum Recycling nicht weiter benötigter Rezeptoren (D) und es erfolgt weitere Verteilung in zelluläre Kompartimente. Aus dem späten Endosom (E) kann sich das Lysosom (F) bilden, wo die DNA komplett abgebaut wird (H). Für einen effektiven Gentransfer muss die DNA aus dem endosomalen Kompartiment freigesetzt werden (G), was möglicherweise durch eine Interaktion der Lipide aus den Komplexen mit negativ geladenen Lipiden der endosomalen Membran bewirkt werden kann. Die freigesetzte DNA kann entweder ebenfalls durch Nucleasen abgebaut werden (H) oder sie kann in den Zellkern aufgenommen werden (I).

„Nackte“ DNA wird im extrazellulären Kompartiment schnell durch dort existierende Nucleasen abgebaut. Aber auch Lipoplexe sind in ihrer Stabilität gefährdet, da die



zur besseren Zelladhäsion an die durch Proteine und Glykopeptide negativ geladene Zellmembran meist positiv geladenen Systeme mit endogenen, negativ geladenen Molekülen wie Glykosaminoglykanen und Serumproteinen interagieren und aggregieren können (Wiethoff und Middaugh 2003). Es scheint klar zu sein, dass die kationischen Lipide durch Kondensation oder Bindung der DNA die zelluläre Aufnahme vermitteln. Obwohl viele Faktoren der Zellaufnahme weiterhin ungeklärt sind, ist Endozytose der am häufigsten postulierte Weg zur Zellinternalisierung. Lipoplexe wurden in Endosomen gefunden (Zabner et al. 1995; Escriou et al. 1998) und die zelluläre Aufnahme kann durch Endozytose-Inhibitoren beeinflusst werden (Legendre und Szoka 1992; Almofti et al. 2003a). Die Lipoplexe müssen aus dem Endosom freigesetzt werden bevor sie ins Lysosom gelangen und dort u.U. einer Abbaureaktion unterliegen (Wiethoff und Middaugh 2003). Außerdem dürfen die Lipoplexe nicht zu stabil sein. Die DNA muss freigesetzt werden, um eine Expression bewirken zu können (Zabner et al. 1995).

Weitere diskutierte Mechanismen der Zellinternalisierung sind Fusion mit der Plasmamembran oder Phagozytose (Felgner et al. 1987; Matsui et al. 1997; Harbottle et al. 1998).

Auch der Transport der freigesetzten DNA durch das Zytosol stellt ein weiteres Problem dar. Die Größe der DNA kann eine Rolle spielen, da als Transportmechanismus passive Diffusion angenommen wird. Zudem sind auch im Zytosol Nukleasen enthalten, welche die DNA abbauen können (Lechardeur et al. 1999). Die letzte große Hürde ist die Aufnahme der DNA in den Zellkern. Angenommene Mechanismen sind die Aufnahme durch Poren (Zanta et al. 1999), die Assoziation mit Chromatin, wenn während der Mitose die Kernmembran zerstört wird (Brisson et al. 1999), oder die direkte Überwindung der Kernmembran, die allerdings nur hypothetisch und nicht wissenschaftlich belegt ist (Wiethoff und Middaugh 2003).

Felgner beschrieb 1987 das erste kationische Lipid für den lipidvermittelten Gentransfer (Felgner et al. 1987). Seit diesem Zeitpunkt wurden zahlreiche weitere Strukturen entwickelt (Lee et al. 1996; Liu et al. 1996; Wheeler et al. 1996). Das Grundgerüst der Substanzen lässt sich in funktionelle Domänen aufteilen (Gao und Huang 1995; Pedroso de Lima et al. 2003). Anhand der Strukturen von DC-Cholesterol und DAC-Cholesterol, welche in den kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenzien DC-30 und DAC-30 in Kombination mit

Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) im Verhältnis 7:3 DOPE/Cholesterolderivat (w/w) enthalten sind (und sich lediglich in der Position einer Methylgruppe unterscheiden), werden die Einheiten genauer beschrieben (Abbildung 1.2.1-2).

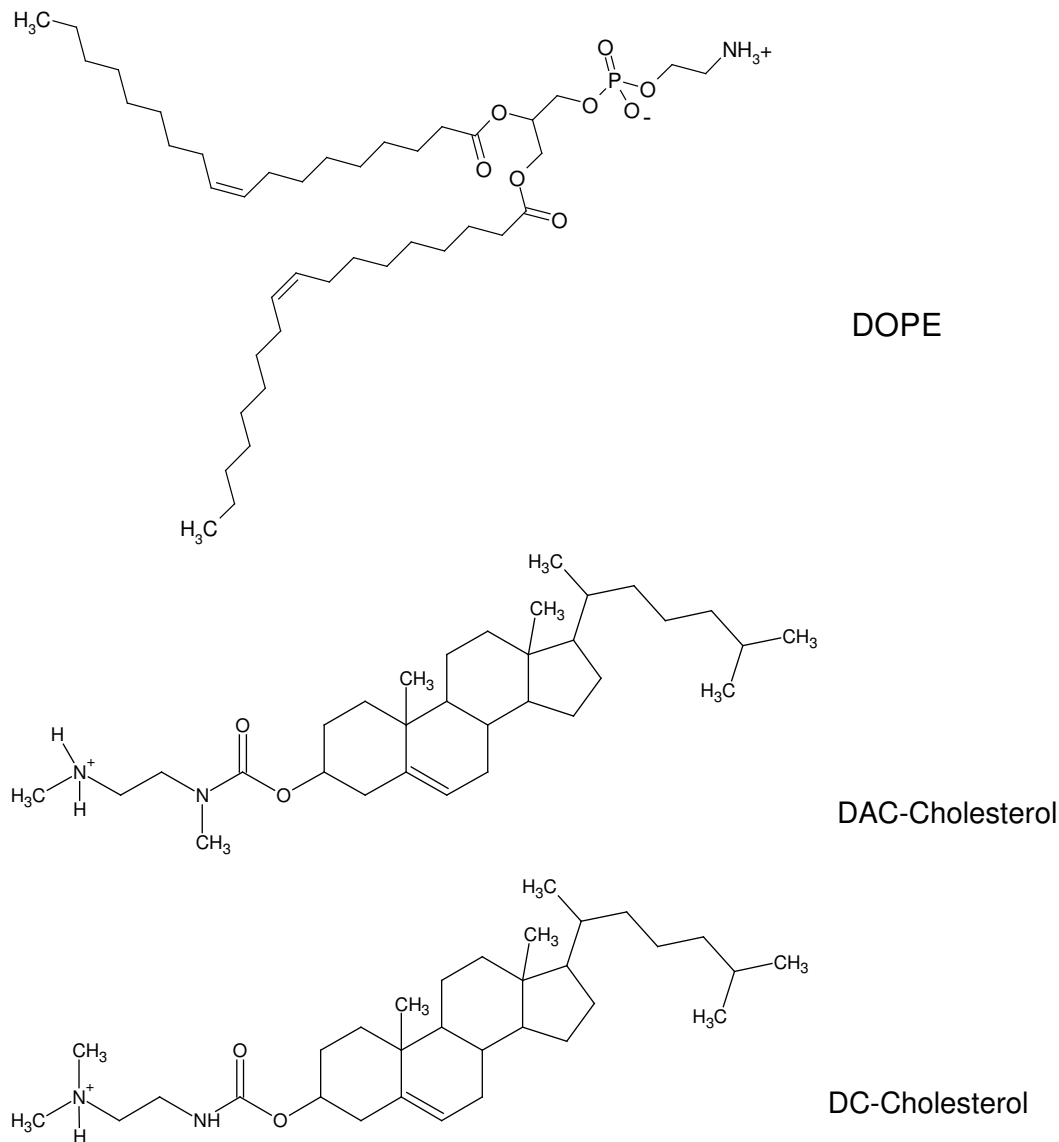


Abbildung 1.2.1-2 Strukturen des neutralen Helferlipids DOPE und der kationischen Cholesterolderivate DAC- und DC-Cholesterol

Die Cholesterolderivate weisen eine Ammoniumgruppe als positiv geladenen Kopfgruppenteil auf; eine tertiäre im Fall von DC-Chol und eine sekundäre bei DAC-Chol (Reszka et al. 1995). Bei monovalenten Lipiden kann eine oder bei multivalenten Lipiden können mehrere positive Ladungen in den Kopfgruppen enthalten sein. Die Kopfgruppe dient zur Interaktion mit der DNA sowie mit der Zellmembran und wirkt sich dadurch auf die Transfektionseffizienz und möglicherweise auch auf die Toxizität aus.

An die Kopfgruppe schließt sich ein Spacer bestehend aus zwei C-Atomen an, der über eine Carbamoylbindung als Verbindungsteil mit einem Cholesterol-Gerüst als hydrophoben Anker verknüpft ist. Die Länge des Spacers scheint für die Transfektionseffizienz nicht ausschlaggebend zu sein. Auch Lipide, in denen gar kein oder nur ein sehr kurzer Spacer vorhanden ist, weisen eine hohe Transfektionseffizienz auf (Gao und Huang 1995). Der Verbindungsteil hat einen deutlichen Einfluss auf die Stabilität und die Bioabbaubarkeit des Moleküls. Je stabiler solch eine Brücke ist (z. B. Ether oder C-N Bindungen), desto niedriger ist die Bioabbaubarkeit, was sich nachteilig auf die Anwendung im Menschen auswirken kann. Esterbindungen sind leicht abbaubar, weisen dafür aber eine sehr geringe Stabilität auf. Amide oder Carbamoylbindungen hingegen sind stabiler und ausreichend bioabbaubar.

Das in DC-Chol und DAC-Chol vorhandene Cholesterolgerüst stellt den hydrophoben Anker dar. Dieser ist von Vorteil, da Cholesterol auch natürlich in Membranen vorkommt. Zudem erhöht Cholesterol die Stabilität von Membranen durch eine Erhöhung der Packungsdichte fluider Lipide. Weiterhin werden als Anker-moleküle Fettsäureketten verwendet, die eine ausreichende Membranfluidität und die Ausbildung von Bilayern ermöglichen sollen. Die Ketten von monovalenten Lipiden sind entweder länger (C18) und einfach ungesättigt, oder kürzer (C12 oder C14) und gesättigt. Auf die Transfektionseffizienz von multivalenten Lipiden scheinen sich Länge und Sättigungsgrad nicht sehr ausgeprägt auszuwirken (Remy et al. 1994). Balasubramanian berichtete, dass für ein gutes Transfektionsergebnis die optimale Kettenlänge und Symmetrie der Ketten abhängig vom zu transfizierenden Zelltyp sind (Balasubramanian et al. 1996).

Oftmals sind in Transfektionsreagenzien neben den kationischen Lipiden weitere sogenannte Helferlipide enthalten. DC-30 und DAC-30 werden mit DOPE kombiniert, welches auch in zahlreichen anderen Transfektionsreagenzien vorkommt. DOPE bildet invers hexagonale non-bilayer Strukturen und bewirkt die Fusion von Membranen, wodurch eine Freisetzung der Gentransfersysteme aus dem Endosom stattfinden kann und die Transfektionseffizienz erhöht wird (Farhood et al. 1995; Wasan et al. 1999). Zudem bewirkt DOPE auch eine Erniedrigung der Toxizität kationischer Lipide (Ciani et al. 2004).

Weiterhin wird Cholesterol als Helferlipid eingesetzt. Es bewirkt, wie bereits erwähnt, eine Erhöhung der Stabilität von Membranen und trägt zusätzlich zur Verhinderung der Aggregation von Lipoplexen mit Serumbestandteilen bei (Wiethoff et al. 2001).

### 1.2.1. HERSTELLUNG LIPOSOMALER GENTRANSFERSYSTEME

Das am häufigsten beschriebene Verfahren zur Herstellung von Lipoplexen ist das Mischen einer DNA-Lösung mit kationischen Liposomen durch Pipettieren. Die Liposomendispersionen werden im allgemeinen durch Hydratisierung von Lipidfilmen mit Puffern gewonnen (Torchilin und Weissig 2003), wodurch Vesikel entstehen, die meist sehr heterogen in Größe und Lamellarität sind. Teilweise werden die Dispersionen vor der Herstellung der Lipoplexe durch Polycarbonatmembranen mit definierter Porengröße extrudiert, um eine Homogenisierung zu bewirken.

Positiv geladene Liposomen binden die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA durch elektrostatische Interaktionen, wodurch Komplexe zwischen DNA und kationischen Liposomen, sogenannte Lipoplexe (Felgner et al. 1997) gebildet werden. Zahlreiche Faktoren nehmen Einfluss auf die entstehenden Lipoplexe und deren physikochemische Eigenschaften (Bally et al. 1999; Rakhmanova et al. 2004), wie z.B. (I) die Art des kationischen Lipids, (II) Art und Menge von zusätzlichen Lipiden wie DOPE oder Cholesterol, (III) die Zusammensetzung von Puffern und Lösungen, die zur Verdünnung verwendet werden, (IV) die Methode, Geschwindigkeit und Reihenfolge des Mischens von Lipid und DNA, (V) die Mischtemperatur, (VI) die Reinheit der DNA und schließlich die Inkubationszeit nach der Bildung der Lipoplexe. Nicht zu vernachlässigen ist ebenso der personelle Aspekt, denn Kraft und Geschwindigkeit des Pipettierens lassen sich schlecht für verschiedene Anwender vereinheitlichen.

Dies verdeutlicht, dass das Mischverfahren durch Pipettieren im kleinen Maßstab zu sehr großen Schwankungen führt, welche eine wohldefinierte Produktion von Lipoplexen erschweren und die Voraussage der Effizienz der gebildeten Gentransfersysteme fast unmöglich machen (Bally et al. 1999). Die frische Herstellung der Lipoplexe kurz vor der Applikation ist zudem sehr zeit- und arbeitsaufwändig. Dies bestätigen klinische Studien, die mit frisch hergestellten Lipoplexen durchgeführt wurden (Nabel et al. 1993).

Aus diesen Gründen wurden Anstrengungen unternommen, Lipoplexe in größerem Maßstab unter automatisierten Bedingungen herzustellen, um die Einflüsse des

Herstellverfahrens durch Pipettieren zu umgehen (Zelphati et al. 1998; Hirota et al. 1999). Die Verfahren, welche beide auf dem Zusammenmischen von Liposomen und DNA durch die Verwendung von Spritzen beruhen, sind auf verhältnismäßig kleine Volumina beschränkt und die Lagertemperatur von  $-70\text{ °C}$  bei Zelphati et al. erschwert die Handhabung zusätzlich.

Die Gewährleistung gleichbleibender biologischer und physikochemischer Eigenschaften ist generell problematisch. In kleinem Maßstab hergestellte Lipoplexe wiesen eine hohe Neigung zu Instabilität auf. Die Lagerung von Lipoplexdispersionen in flüssiger Form kann zu einer Abnahme der Transfektionseffizienz sowie zu einer Zunahme der Aggregatgröße führen (Gustafsson 1995; Lai und van Zanten 2002). Bessere Ergebnisse wurden mit sprühgetrockneten Produkten erzielt (Seville et al. 2002). Auch Gefriertrocknung wurde zur Verbesserung der Lagerfähigkeit von nicht-viralen Gentransfersystemen eingesetzt (Anchordoquy et al. 1997; Talsma et al. 1997; Cherng et al. 1999; Cherng et al. 1999; Allison und Anchordoquy 2000; Li und Huang 2000; Molina et al. 2001; Tranchant et al. 2004). Es wurde in einer Studie berichtet, dass durch den Lyophilisationsprozess sehr große, unregelmäßig geformte Aggregate erhalten wurden (Seville et al. 2002). Jedoch scheint generell die Gefriertrocknung ein geeigneter Prozess für die Erhöhung der Lagerfähigkeit zu sein, durch den Partikel- und Transfektionseigenschaften erhalten werden können (Cherng et al. 1999; Molina et al. 2001; Clement et al. 2005).

Da gentherapeutische Arzneimittel in Deutschland den Anforderungen des Arzneimittelgesetzes (AMG) und den darauf basierenden Folgebestimmungen, wie z. B. der Betriebsverordnung für Pharmazeutische Unternehmer (PharmBetrV) genügen müssen, ist es essentiell, dass die Ausgangssubstanzen zur Herstellung der Gentransfersysteme nach den GMP-Richtlinien (GMP-Leitfaden) produziert werden, um Sicherheit und Reproduzierbarkeit zu gewährleisten (Werner et al. 2001).

### 1.2.2. BIOLOGISCHE AKTIVITÄT UND PHYSIKALISCHE STABILITÄT LIPOSOMALER GENTRANSFERSYSTEME

Die Zielvorstellungen der Transfektion mit liposomalen Gentransfersystemen sind das Erreichen einer möglichst hohen biologischen Aktivität, verbunden mit möglichst niedrigen zytotoxischen Auswirkungen. Physikochemische Eigenschaften wie Morphologie, Partikelgröße, Oberflächenladung und DNA-Zugänglichkeit nehmen

hierauf einen deutlichen Einfluss. Daher ist die Charakterisierung hinsichtlich dieser Eigenschaften bedeutend für eine Optimierung der Gentransfersysteme. Im folgenden Teil wird auf diese Punkte näher eingegangen.

Die Transfektionseffizienz von liposomalen Gentransfersystemen wurde in zahlreichen Studien *in vitro* und *in vivo* untersucht. Die Korrelation zwischen den *in vitro* und *in vivo* ermittelten Ergebnissen ist allerdings zumeist unzureichend (Li und Huang 2000; Audouy und Hoekstra 2001; Loisel 2001). Hierfür kommen mehrere Gründe in Frage. Die Zellen, die *in vitro* zur Ermittlung der biologischen Aktivität herangezogen werden, unterscheiden sich in ihren Eigenschaften deutlich von den *in vivo* erreichbaren Zellen. Dies sind häufig ausdifferenzierte Zellen, die nur eine geringe Proliferationsrate aufweisen. In mehreren Studien wurde herausgefunden, dass die Transfektionseffizienz liposomaler Gentransfersysteme von der Rate der Zellteilung abhängt (Pelisek et al. 2002). Weiterhin sind *in vivo* andere äußere Bedingungen vorhanden als *in vitro*. Im lebenden Organismus kommen die Lipoplexe in Kontakt mit Serumbestandteilen, welche die Struktur der Lipoplexe bedeutend verändern und somit die Transfektionseffizienz erheblich beeinflussen können (Li et al. 1999; Carriere et al. 2002). Durch das Retikuloendotheliale System (RES) bzw. mononukleäre Phagozytensystem (MPS) werden Lipoplexe mitunter so schnell aus der Zirkulation entfernt, dass es nicht zur Transfektion kommen kann (Maurer et al. 1999).

Die Assoziation von DNA mit kationischen Lipiden zu Lipoplexen wurde an vielen Stellen beschrieben (Gershon et al. 1993; Sternberg et al. 1994; Mok und Cullis 1997; Templeton et al. 1997). Es konnten multilamellare Strukturen gefunden werden (Gustafsson 1995; Huebner 1999), ebenso wie Strukturen ohne Bilayer-Elemente (Mok und Cullis 1997). Aus dieser Vielfalt an Strukturen geht hervor, dass die Aggregate teilweise erheblich unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Abhängig davon, ob DNA in Lipidlayer eingeschlossen wird, oder ob die DNA an der Außenseite der Aggregate anhaftet, weisen diese ein unterschiedliches Oberflächenpotential auf. Zur Beeinflussung der Transfektionseffizienz durch die Vorzeichen der Oberflächenladung gibt es verschiedene Aussagen. Meist wird davon ausgegangen, dass positiv geladene Gentransfersysteme zu einer besseren Transfektionseffizienz führen als negativ geladene, da sie aufgrund der elektrostatischen Anziehung besser mit der negativ geladenen Plasmamembran assoziieren und demnach effektiver in die Zelle aufgenommen werden (Pires et al.

1999). Andere Studien beschrieben hingegen eine höhere Effizienz durch negativ geladene Transfektionssysteme (Son et al. 2000; Wiethoff et al. 2004).

Auch die Größe spielt bei der Transfektion eine bedeutende Rolle. Erneut finden sich auseinandergelungene Meinungen betreffs der idealen Größe. In vielen Studien erwiesen sich große Lipoplexe effektiver gegenüber kleineren (Kawaura et al. 1998; Ross und Hui 1999; Almofti et al. 2003a). Kennedy et al. und Rakhmanova et al. beschreiben Partikel im Bereich von 650-1520 nm als effiziente Systeme (Kennedy et al. 2000; Rakhmanova et al. 2004). Eine höhere Transportkapazität für genetisches Material oder die Tatsache, dass große Partikel sich eher auf Zellen absetzen, könnten mögliche Gründe für bessere Transfektionsraten sein. Weiterhin werden aber auch kleinere Partikel als effektiver diskutiert (Akao et al. 1991; Templeton et al. 1997; Tranchant et al. 2004), aber auch eine Unabhängigkeit der Transfektionsrate von der Partikelgröße wurde beschrieben (Stegmann und Legendre 1997).

Das Ladungsverhältnis (+/-) der Lipoplexe, welches durch die Kombination von kationischem Lipid und DNA bedingt wird, gilt als eine wichtige Einflussgröße auf Partikelgröße und Ladung und dementsprechend auch auf die Transfektionseffizienz. Das Ladungsverhältnis lässt sich aus der Anzahl der Ladungen pro Molekül berechnen (Congiu et al. 2004). Bei der gleichen Anzahl von negativ und positiv geladenen Gruppen beträgt das berechnete Verhältnis 1:1 (+/-) und die Aggregate liegen theoretisch in ungeladenem Zustand vor. In einigen Studien konnte durch Ermittlung des Zetapotentials diese Theorie bestätigt werden (Almofti et al. 2003a). Andere Studien belegen hingegen, dass bei einem berechneten Ladungsausgleich Lipoplexe nicht ungeladen vorliegen (Faneca et al. 2002; Ciani et al. 2004). Nach Untersuchungen von Son et al. ist bei Variierung des Ladungsverhältnisses sogar keine Veränderung des Zetapotentials feststellbar (Son et al. 2000). Literaturangaben belegen die Abhängigkeit der Größe von der Ladung der Partikel. Lipoplexe mit ausgeglichenem Ladungsverhältnis aggregieren aufgrund fehlender elektrostatischer Abstoßung zu verhältnismäßig größeren Partikeln als solche mit unausgeglichenem Ladungsverhältnis (Wasan et al. 1999; Almofti et al. 2003a). Andere Untersuchungen der Größe von Aggregaten mit unterschiedlichen Ladungsverhältnissen (+/-) erbrachten, dass ein berechneter Überschuss an positiver Ladung zu den größten Partikeln führte (Xu et al. 1999; Faneca et al. 2002).

Diese Vielfalt der Aussagen bezüglich der Eigenschaften von Lipoplexen belegen, dass eine generelle Einordnung von Gentransfersystemen äußerst schwierig ist. Im

Gegenteil, jedes System muss einzeln charakterisiert werden, um eine Vorhersage über das Verhalten des Systems treffen zu können.

### **1.3. METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG UND ANALYTIK VON LIPOPLEXEN**

#### **1.3.1. TRANSFEKTIONSEFFIZIENZ UND ZYTOTOXIZITÄT**

Die Methode zur Bestimmung der Transfektionseffizienz ist abhängig von der Art des verwendeten Plasmides. Nur selten werden die Gene, welche für therapeutische Zwecke eingesetzt werden sollen, auch für den experimentellen Teil verwendet, da ein positives Ergebnis oft nur schwer zu erfassen ist. Meist werden Reportergene wie Galactosidase oder Luciferin eingesetzt, welche zur Expression von kolorimetrisch oder luminometrisch leicht erfassbaren Proteinen führen (Ferrari et al. 2001; Congiu et al. 2004; Wiethoff et al. 2004). Häufig werden auch GFP (green fluorescent protein) exprimierende Markerplasmide wie pGFP oder pEGFP verwendet. Diese führen bei positiver Transfektion zur Expression von Proteinen, welche die Visualisierung im Fluoreszenzmikroskop und die Quantifizierung per Durchflusszytometrie ermöglichen können (Pelisek et al. 2002).

Für die Bestimmung der Auswirkung der Transfektion auf die Zellvitalität gibt es eine Vielzahl verschiedener Methoden. Zum einen werden die während des Transfektionsprozesses abgestorbenen Zellen erfasst. Hierfür werden meist die toten Zellen durch die Zugabe von Fluorochromen markiert. Die Farbstoffe können die permeable Membran der toten Zellen durchdringen, sich in zelluläre Bestandteile einlagern und so zu einer detektierbaren Fluoreszenz der Zellen führen. Hierzu zählen 7-AAD, Ethidiumbromid und Propidiumiodid (Dodds et al. 1998). Die markierten Zellen können dann mittels Durchflusszytometrie, auf welche im folgenden Teil noch genauer eingegangen wird, quantifiziert werden. Die Erfassung der Freisetzung von Lactat-Dehydrogenase ist ein weiteres Verfahren zur Ermittlung des Grades der Zellschädigung (Uchida et al. 2002).

Weiterhin können die lebenden Zellen nach erfolgter Transfektion bestimmt werden. Zur Quantifizierung des Zellwachstums dient die radioaktive <sup>3</sup>H-Thymidin-Inkorporations-Methode (Keogh et al. 1997). Tritium-markierte Nukleotide werden zum Ansatz hinzugegeben und die Strahlung der entstandenen Zellen wird im Szintillationszähler bestimmt. Den gleichen Mechanismus verfolgt der BrdU-Assay



(Pelisek et al. 2002), bei dem ebenfalls ein Thymidin-Analogon in die DNA eingebaut wird. Eine Detektion erfolgt hier über die Markierung mit monoklonalen Antikörpern, welche spezifisch an die eingebauten Analoga binden und eine Fluoreszenz- oder Chemilumineszenz-Reaktion bewirken. Viele Firmen bieten Tetrazolium-Assays an, die auf der häufig angewandten MTT-Methode beruhen (Obika et al. 1999; Axel et al. 2000; Uchida et al. 2002). Nur die vitalen Zellen reduzieren mit ihrem Succinat-Tetrazolium-Reductase-System den MTT-Ring zu blauem Formazan.

Eine weitere Methode zur Erfassung metabolisch aktiver Zellen, ist der CellTiter-Glo™ Test (CTG-Test). Der zum Zeitpunkt des Testes vorhandene ATP-Gehalt wird ermittelt, welcher auf die Anzahl der metabolisch aktiven Zellen schließen lässt. Ein Testreagenz wird zu den Zellen zugegeben, welches Lyse der Zellen und somit Freisetzung des ATP bewirkt. Dieses wird in einer Luziferase-Reaktion mit Luziferin zu Oxyluziferin umgesetzt und bewirkt die Bildung eines Lumineszenzsignals, welches mit einem Luminometer erfasst und quantifiziert werden kann. Die Reaktion ist in Abbildung 1.3.1-1 wiedergegeben.

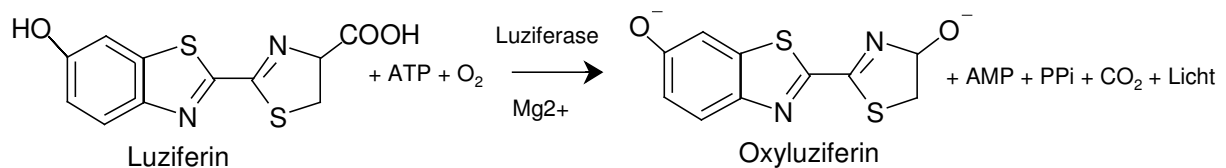


Abbildung 1.3.1-1 Reaktionsmechanismus, welcher der Quantifizierung von metabolisch aktiven Zellen durch Umsetzung mit Luziferin zugrunde liegt

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur automatisierten Differenzierung und Zählung von Zellen und Mikropartikeln. Dabei passieren die Zellen in Suspension in einem engen Strom eine Durchflussküvette und werden dort von einem fokussierten Laserstrahl angeregt. Das resultierende Fluoreszenz- und Streulicht kann von verschiedenen Lichtdetektoren aufgefangen und nach Intensität und Farbe getrennt registriert werden.

Die wichtigsten Komponenten eines Durchflusszytometers sind in Abbildung 1.3.1-2 dargestellt. In einem Flüssigkeitssystem werden die zu analysierenden Zellen aus dem Probenröhrchen durch hydrodynamische Fokussierung in einem Mantelstrom in eine Kapillare einer Flusszelle aus Quarzglas überführt. Der Probenstrom wird so auf einen Durchmesser von ca. 5 µm reduziert, dass die Zellen einzeln durch die Foki mehrerer Laserstrahlen treten. Das von den Zellen in Richtung des Laserstrahls

gestreute Licht wird dann vom FSC-Detektor (Forward-Scatter) detektiert und ist proportional zur Zelloberfläche und Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (SSC, Sideward-Scatter), welches der Zellgranularität entspricht, und verschiedene Fluoreszenzfarben werden rechtwinklig zum Laserstrahl aufgenommen. Durch ein Objektivsystem werden verschiedene Farbfilter und Teilerspiegel auf Photomultiplier gelenkt. Die erhaltenen Signale können nach Verstärkung im Computer dargestellt und ausgewertet werden.

Die Lichtquelle des FACS-Calibur™ (Becton Dickinson) besteht aus einem Argonlaser ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ) und einem roten Diodenlaser ( $\lambda = 635 \text{ nm}$ ), der bei Bedarf zugeschaltet werden kann. Somit können Fluorochrome bei verschiedenen Wellenlängen angeregt werden. Die Fluoreszenzemission kann aus der Eigenfluoreszenz der Zelle bestehen oder aus produzierten oder exogen zugeführten Fluorochromen resultieren. Eine Unterscheidung ist möglich, wenn bei den durch das Gerät festgelegten Wellenlängen angeregt werden kann und die Emissionsspektren sich hinreichend unterscheiden. Auf diese Weise können verschiedenste Zellparameter detektiert und analysiert werden.

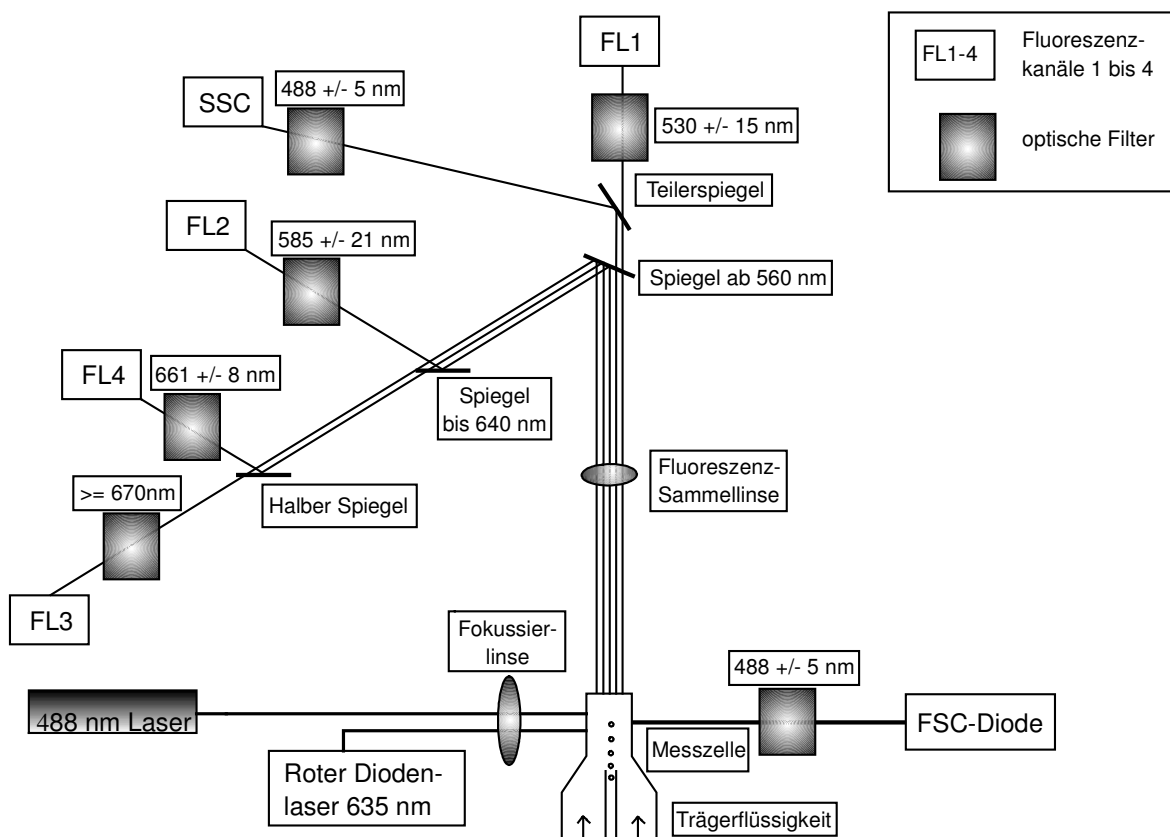


Abbildung 1.3.1-2 Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers

### 1.3.2. PARTIKELGRÖSSE UND STRUKTUR

Bildgebende Verfahren zur Untersuchung der Struktur von Lipoplexen sind aufgrund der geringen Partikelgrößen, welche die normale Lichtmikroskopie ausschließen, die Elektronen- (Huebner 1999; Xu et al. 1999; Simberg et al. 2001; Smisterova et al. 2001) oder Rasterkraft-Mikroskopie (Almofti et al. 2003a; Almofti et al. 2003b). Mit der konfokalen Mikroskopie lässt sich der intrazelluläre Verbleib der Partikel bestimmen (Kamiya et al. 2002; Almofti et al. 2003a).

Unter Verwendung der Photonenkorrelations-Spektroskopie (PCS) lassen sich Teilchengrößen im kolloiddispersen Bereich bestimmen. Grundlegendes Prinzip ist dabei die Erfassung der Streulichtintensität, die von Partikeln durch Bestrahlung mit einem Laser hervorgerufen wird. Die freie Diffusion der Teilchen resultiert in der Brownschen Molekularbewegung. Abhängig von der Größe der Partikel ist die Bewegung schneller (kleine Partikel) oder weniger schnell (größere Partikel). Die größeren Partikel passieren demnach weniger oft den Laserstrahl und die Zahl der emittierten Streulichtsignale fällt geringer aus. Dementsprechend nehmen die Viskosität des Lösungsmittels und die Temperatur einen bedeutenden Einfluss auf die Beweglichkeit der Teilchen.

Die Signale werden in einem Photomultiplier verstärkt und mit Hilfe eines Korrelators in eine zeitabhängige Autokorrelationsfunktion überführt, deren Steilheit mit dem Diffusionskoeffizienten korreliert wird. Die Stokes-Einstein-Beziehung dient zur Ermittlung des hydrodynamischen Durchmessers der Teilchen.

$$d(H) = \frac{k * T}{3 * \pi * \eta * D}$$

d(H)	hydrodynamischer Durchmesser
k	Boltzmann-Konstante [N * m * K <sup>-1</sup> ]
T	Temperatur [K]
η	Viskosität [N * s * m <sup>-2</sup> ]
D	Diffusionskoeffizient [m <sup>2</sup> * s <sup>-1</sup> ]

Sind unterschiedlich große Partikel in einer Probe enthalten, kann sich dies störend auf das Ergebnis auswirken. Das Streulicht der größeren Partikel überdeckt das der

kleineren, da die Intensität des Lichtes sich proportional zur sechsten Potenz des Radius verhält.

Die Agarosegel-Elektrophorese ist ursprünglich eine Methode zur Trennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten mit 0,5-25 kb Länge. Durch Anlegen einer Spannung läuft die DNA, je nach Größe, mehr oder weniger weit durch die Poren eines Agarosegels. Kleineren Fragmenten wird dabei weniger Widerstand geboten als größeren. Die DNA wird durch Interkalation eines Fluorophors (z.B. EtBr) in die DNA sichtbar gemacht (Geall und Blagbrough 2000). Der Farbstoff kann entweder direkt zu dem Gel hinzu gegeben wird, oder das Gel wird nach der Elektrophorese in ein Färbebad eingetaucht.

Die Intensität der Bindung oder Komplexierung von DNA durch kationische Lipide kann mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert werden. Dabei kann einerseits untersucht werden, wie die Mobilität der DNA im Gel, abhängig vom Verhältnis Lipid/DNA (+/-), beeinflusst wird. Zahlreiche Literaturstellen belegen, dass mit zunehmendem Ladungsverhältnis die DNA stärker in den Ausgangstaschen zurückgehalten wird und demnach DNA und Lipid stärker miteinander assoziiert sind (Xu et al. 1999; Lleres et al. 2004). Für verschiedene kationische Transfektionsreagenzien wurden unterschiedliche Ausprägungen bezüglich der Assoziation von DNA und Lipid in den gleichen Ladungsverhältnissen (+/-) ermittelt (Arigita et al. 1999). Zusätzlich kann durch enzymatische Behandlung der Lipoplexe mit DNase vor dem Auftragen auf das Gel untersucht werden, ob die DNA frei zugänglich ist und abgebaut werden kann, oder ob die DNA durch die kationische Komponente vor dem Abbau geschützt wird (Xu et al. 1999; Faneca et al. 2002).

Das gleiche Prinzip kommt bei der Untersuchung der Bildung und der Struktur von Lipoplexen durch Ermittlung der DNA-Integrität mittels fluorimetrischer Verfahren zum Tragen. Fluoreszenzfarbstoffe wie DAPI, Hoechst 33258 (Wiethoff et al. 2003) oder EtBr (Geall und Blagbrough 2000; Wiethoff et al. 2003), die mit DNA wechselwirken und dadurch ihre Fluoreszenzintensität verändern, werden direkt zur DNA vor der Bildung der Lipoplexe oder zu den bereits gebildeten Lipoplexen hinzu gegeben. Es kann festgestellt, in welchem Maße der Farbstoff durch die kationische Komponente aus der Bindung mit der DNA verdrängt wird.

### 1.3.3. PARTIKELLADUNG

Über die Wanderungsgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld lässt sich das Zetapotential (Potential eines diffundierenden Teilchens) bestimmen. An die Oberfläche von in flüssigem Medium dispergierten Teilchen können Moleküle und Ionen adsorbieren. Das Sternsche Modell beschreibt die Ausbildung der Sternschicht durch die Anlagerung von Elektrolyten auf der Partikeloberfläche. Bewegen sich die Teilchen durch Migration oder Gravitation, wird ein Teil der Schicht mitgerissen und es kommt zur Ausbildung einer Scherebene. Daran grenzend ist die Verteilung der Ladungsträger diffus. Die Potentialdifferenz, die zwischen der Scherebene und der umgebenden elektrisch neutralen Zone ausgebildet wird, wird als Zetapotential bezeichnet. Mit zunehmendem Zetapotential nimmt die Stabilität eines Systems aufgrund der abstoßenden Kräfte zu.

Ein Verfahren zur direkten Ermittlung der Oberflächenladung ist die Ausnutzung der Fluoreszenzaktivität des Farbstoffes TNS (2-(p-Toluidinyl)naphthalin-6-sulfonsäure) welche stark von der Polarität der Umgebung abhängig ist. In apolaren Medien und bei Einlagerung in Membranen ist ein deutlicher Fluoreszenzanstieg zu verzeichnen, in Wasser gelöstes TNS weist praktisch keine Fluoreszenz auf (Kachel et al. 1998). Die Tendenz des Farbstoffes, sich nach Zugabe von außen in Abhängigkeit von der Menge positiv geladener Lipide in den hydrophilen Kopfgruppenbereich des äußeren Layers membranärer Systeme einzulagern, kann zur Ermittlung der Oberflächenladung solcher Systeme ausgenützt werden (Eisenberg et al. 1979; Cocera et al. 2001; Cocera et al. 2003). TNS ist lediglich in geringem Maße membrangängig und somit werden nur die negativen Ladungen auf der Außenseite erfasst (Cevc 1990; Eastman et al. 1991; Eastman et al. 1992).

### 1.3.4. LIPIDANALYTIK

Für die Quantifizierung von Lipiden kommt eine Vielzahl an Methoden in Frage. Jedoch sind nicht alle gleichermaßen für die Bestimmung von Lipidbestandteilen in Lipoplexen geeignet.

Nasschemische Methoden wie der Bartlett-Assay (Bartlett 1959) oder der Stewart-Assay (Stewart 1980) werden zur Quantifizierung von Phospholipiden eingesetzt.

Die Lipidanalytik mittels NMR (nuclear magnetic resonance spectroscopy) ist ein schnelles Verfahren zur Quantifizierung. Allerdings werden sehr große Mengen, bis in den mg-Bereich benötigt, und die Methode ist sehr störanfällig gegen

Begleitsubstanzen in der Probe. HPLC-Analytik (high performance liquid chromatography) ist eine gängige Technik zur Lipidquantifizierung. Die Methode ist jedoch durch die Detektionsmöglichkeiten limitiert. Die meisten Lipide können nur eingeschränkt durch die hauptsächlich verwendeten UV-Detektoren detektiert werden, da ihnen chromophore Gruppen fehlen und die Detektionswellenlängen im extremen UV-Bereich von 190-210 nm liegen. Anstatt dessen müssen temperatur- und lösungsmittelanfällige Refraktionsdetektoren oder teure ELS-Detektoren (evaporative light-scattering detector) verwendet werden. Es gibt einige Veröffentlichungen zur Quantifizierung von kationischen Liposomen in Lipoplexpräparationen. Zumeist ist eine Separierung von Lipid und DNA vor der Chromatographie notwendig (Felgner 1997; Smith et al. 1998). Meyer et al. berichteten von einer direkten Methode zur Lipidquantifizierung ohne vorherige Aufarbeitung mittels UV-Detektion (Meyer et al. 2000).

Ein einfaches Verfahren, welches ebenfalls der Quantifizierung von Phospholipiden dient, ist die Umsetzung mit der Fluoreszenzsonde Fluorescamin zu einem fluoreszierenden Produkt (Udenfriend et al. 1972). Von Ferrari et al. wurde Fluorescamin zur Quantifizierung von Phospholipidbestandteilen in Lipoplexen verwendet (Ferrari et al. 1998).

Ein wesentlich sensitiveres Verfahren ist die HPTLC (Hochleistungsdünnschicht-Chromatographie), bei der es sich um eine weiterführende Entwicklung der Dünnschichtchromatographie handelt. Es können mehrere Lipide gleichzeitig aus einer Probe bis in den ng-Bereich bestimmt werden. Die Proben werden, wie in der normalen Dünnschichtchromatographie, als Punkte oder Banden auf Kieselgelplatten aufgetragen. Diese werden anschließend in einer geeigneten mobilen Phase entwickelt. Durch Kapillarkräfte getrieben wandert die mobile Phase über eine definierte Strecke durch die stationäre Phase. Dadurch werden in der Probe enthaltene Komponenten aufgetrennt und verbleiben an verschiedenen Stellen auf der stationären Phase. Nach der Entwicklung des Chromatogrammes können Komponenten, die nicht auf sichtbares oder UV-Licht ansprechen, derivatisiert werden, um sie so detektierbar zu machen. Als Derivatisierungsreagenzien für Lipide kamen beispielsweise  $\text{CuSO}_4$ , ANS (8-Anilino-1-naphthalin-sulfonat) oder Vanillin zum Einsatz (Aiken 1992; Dhanesar 1992; Maxwell 1992; Vuorela 1996; Ratz et al. 2001). Zahlreiche weitere Reagenzien sind möglich. Die Platten werden in einem

Scanner ausgewertet. Durch elektronische Bildbearbeitung und Dichtemessung kann eine quantitative Bestimmung der Komponenten durchgeführt werden.

### 1.3.5. DNA-ANALYTIK

Ein wenig aufwändiges Verfahren zur Quantifizierung von DNA ist die Konzentrationsbestimmung über die Messung der optischen Dichte. Sie ist anwendbar für Konzentrationsbereiche zwischen 5 und 50 µg/ml. Die Konzentration berechnet sich aus der Absorption bei 260 nm, der Verdünnung und einem für DNA, RNA bzw. Oligonucleotide spezifischen Verdünnungsfaktor. Zusätzlich erhält man aus dem Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm eine Aussage über die Proteinkontamination der Lösung.

Auch mittels fluorimetrischer Messverfahren ist eine Konzentrationsbestimmung von DNA möglich. Die DNA wird dabei mit einem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff vermischt und vermessen. Es gibt zahlreiche Farbstoffe, die hierfür in Frage kommen und auch zur Quantifizierung von DNA in Lipoplexten angewendet wurden, wie z. B. Hoechst 33258 oder Ethidiumbromid.

Die Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegel erlaubt die Detektion von sehr geringen Mengen, die Nachweisgrenze liegt bei ca. 5 ng. Wird die Probe gemeinsam mit einer Verdünnungsreihe von DNA bekannter Konzentration auf das Gel aufgetragen, lässt sich aus dem Vergleich der Bandenintensitäten die Konzentration abschätzen. Das Verfahren ist allerdings sehr aufwändig und mit einiger Unsicherheit behaftet, da ein Intensitätsunterschied oft nur sehr schwer zu erkennen ist. Die chromatographische Analytik von DNA mittels HPLC oder HPTLC wurde ebenfalls beschrieben, allerdings ist für die Dünnschichtmethode eine radioaktive Derivatisierung notwendig (Bergan et al. 2000).

### 1.3.6. METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG VON LYOPHILISATEN

#### 1.3.6.1. RESTFEUCHTEBESTIMMUNG

Die Gefriertrocknung ist ein potentielles Verfahren zur Gewährleistung einer ausreichenden Lagerstabilität liposomaler Gentransfersysteme. Da allgemein die Stabilität von Lyophilisaten entscheidend durch den Restfeuchtegehalt geprägt wird, ist seine Bestimmung ein wichtiger analytischer Aspekt.

Zur Ermittlung der Restfeuchte in Lyophilisaten eignet sich die Karl-Fischer-Methode zur Bestimmung des Wassergehaltes nach Ph. Eur., mit der selbst kleinste Wassermengen nachweisbar sind. Es wird sowohl freies Wasser, als auch gebundenes Wasser erfasst. In der Anwesenheit von Schwefeldioxid, Methanol und einer geeigneten Base wird Wasser durch die Zugabe von Jod stöchiometrisch umgesetzt (Bunsen-Reaktion).

#### 1.3.6.2. RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE

Die Struktur und Oberflächenbeschaffenheit von Lyophilisaten lässt sich mit modernen mikroskopischen Methoden wie der Rasterelektronenmikroskopie erfassen. Es werden scharfe, hoch auflösende Bilder durch Ausnutzung von Sekundär- und Rückstreuelektronen erzeugt (Meredith et al. 1996). Um die Oberfläche leitfähig zu machen, müssen die Proben mit Gold bedampft werden (Flegler et al. 1995).

### 1.4. ZIEL DER ARBEIT

Trotz ihres Potentials zum effektiven Gentransfer sind Lipoplexe, ebenso wie nicht-virale Gentransfersysteme allgemein, dynamische Systeme, die schwer zu erfassen und zu charakterisieren sind. Zudem ist die Produktion von Lipoplexen mit reproduzierbaren und vorhersagbaren Eigenschaften eine weitere Hürde. Dennoch ist es für einen potentiellen Einsatz als Arzneimittel unerlässlich, das Produkt einer eingehenden Charakterisierung und Analytik zu unterziehen, um die Sicherheit, Stabilität und Reproduzierbarkeit des Produktes zu gewährleisten bzw. um Änderungen der Produkteigenschaften verfolgen zu können. Ebenso wichtig für die Anwendbarkeit ist die Herstellung in großem Maßstab sowie die Möglichkeit zur längeren Lagerung der Produkte.

Das liposomale Transfektionsreagenz DAC-30, bestehend aus dem neutralen Helferlipid DOPE und dem kationischen Cholesterolderivat DAC-Cholesterol im Verhältnis 7:3 (w/w) (siehe Abbildung 1.2.1-2), hatte sich in Untersuchungen zur Transfektionseffizienz und Zytotoxizität aus einer Reihe weiterer kationischer Transfektionsreagenzien als das mit den besten Eigenschaften herausgestellt (Kiefer et al. 2004). Von weiterem Vorteil war die Möglichkeit des kommerziellen Erwerbs in GMP-Qualität. Mit DAC-30 und einem GFP-exprimierendem Plasmid war ein



kontinuierliches Verfahren zur Herstellung von Lipoplexen in großem Maßstab mit anschließender Lyophilisation zur Verlängerung der Lagerfähigkeit entwickelt worden (Clement et al. 2005). Die Auswirkung einzelner Herstellungsparameter des Verfahrens, wie Lipid/DNA-Verhältnis, Zusammensetzung des Transfektionsmediums, Vorbehandlung der Liposomen und Größe des Verbindungsstückes zur Mischung von Liposomen und DNA wurden hinsichtlich der Transfektionseffizienz und der Auswirkungen auf die Zellvitalität untersucht und optimiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, ausgehend von den Vorarbeiten zur Ermittlung eines geeigneten Transfektionsreagenzes mit guter biologischer Aktivität und zum Scale-up der Herstellung der Gentransfersysteme, Methoden für eine intensivere Charakterisierung der Produkte und der Herstellungsmethode zu erstellen und zu beurteilen. In diesem Rahmen ergaben sich folgende Aufgaben:

- Validierung eines robusten Bio-Assays zur Ermittlung der Transfektionseffizienz und der Auswirkung der Transfektion auf die Zellen;
- Untersuchungen der physikochemischen Eigenschaften der Lipoplexe mit Schwerpunkten auf Struktur, Größe, Ladung und Stabilität der Partikel;
- Erstellung von Methoden zur Quantifizierung von Lipid und DNA in lyophilisierten Lipoplexen;
- Einsatz der Methoden zur Ermittlung der Stabilität von in großem Maßstab hergestellten Lipoplexen;
- Einsatz der Methoden zur Beurteilung des Herstellungsverfahrens zur kontinuierlichen Produktion von Lipoplexen mit anschließender Lyophilisation.

Neben Lipoplexen aus DAC-30 wurden zusätzlich Lipoplexe aus dem ebenfalls liposomalen Transfektionsreagenz DC-30 vergleichend eingesetzt. DC-30 besteht im gleichen Verhältnis wie DAC-30 aus DOPE und einem kationischen Cholesterolderivat (DC-Cholesterol) (siehe Abbildung 1.2.1-2), welches sich von DAC-Cholesterol nur in der Stellung einer Methylgruppe unterscheidet. Es wurde in der Literatur bereits beschrieben (Gao und Huang 1995; Liu et al. 1996; Son et al. 2000; Ciani et al. 2004; Congiu et al. 2004).

Die Methoden wurden größtenteils mit in kleinem Maßstab durch Pipettieren hergestellten Lipoplexen erstellt und dann auf die lyophilisierten Lipoplexe übertragen. Teilweise wurden die lyophilisierten Lipoplexe auch direkt zur Erstellung der Methoden eingesetzt.

## 2. Material und Geräte

### 2.1. MATERIAL

#### 2.1.1. PLASMIDE

Plasmid	Bezugsquelle
pEGFP	BD, Clontech Germany, Heidelberg
pAH7-EGFP	Boehringer Ingelheim, Biberach

#### 2.1.2. LIPOSOMALE TRANSFEKTIONSREAGENZIEN

Transfektionsreagenz	Bestandteile	Bezugsquelle
DC-30 <sup>®</sup>	DC-Cholesterol (3 $\beta$ -N-[(N',N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]-Cholesterol-HCl + DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamin) 3:7 (w/w); lyophilisiert	Avanti Polar Lipids, Birmingham, USA
DAC-30 <sup>®</sup>	DAC-Chol (3 $\beta$ [N-(N,N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]-Cholesterol)-HCl + DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamin) 3:7 (w/w) ; lyophilisiert	G.O.T. Therapeutics, Berlin

#### 2.1.3. ZELLEN

Typ	Beschreibung	Kulturmedium und Zusätze	Bezugsquelle
A-10 SMC	Glatte Muskelzellen der Ratte, Zelllinie	DMEM + FCS <sup>1</sup> 20% + Natriumpyruvat <sup>2</sup> 1%	DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), Braunschweig

<sup>1</sup> FCS = Fetal Calf Serum (fötales Kälberserum)

<sup>2</sup> 100 mM Natriumpyruvat Stammlösung

## 2.1.4. ZELLKULTURREAGENZIEN

Bezeichnung	Bezugsquelle
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Biochrom KG, Berlin
FACSFlow®	Becton Dickinson, Heidelberg
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom KG, Berlin
Trypsin EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Biochrom KG, Berlin

## 2.1.5. CHEMIKALIEN

Bezeichnung	Molekulargewicht [g/mol]	Bezugsquelle
1 kb DNA Ladder	25	New England Biolabs, Beverly, USA
2-( <i>p</i> -Toluidinyl)-naphthalin-6-sulfonsäure Natriumsalz (TNS)	335,35	Fluka, Buchs, CH
7-Amino-Actinomycin D (7-AAD)		Becton Dickinson, Heidelberg
8-Anilino-1-naphthalen-sulfonat (ANS)	299,4	Fluka, Buchs, CH
Aceton, puriss p.a.	58,0	Roth, Karlsruhe
Agar		Difco, Detroit, Michigan USA
Agarose I		Amresco, Solon, Ohio, USA
Ammoniak, reinst	17,03	Roth, Karlsruhe
Ammoniumheptamolybdat	1235,9	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	670	Sigma-Aldrich, München
Chloroform p.a.	119,4	Roth, Karlsruhe
Citronensäuremonohydrat	210,1	Fluka, Buchs, CH
DAPI (4',6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid)	350,25	MoBiTec, Göttingen
Essigsäure	60,05	Fluka, Buchs, CH
Ethidiumbromid-Lösung 10 mg/ml		Amresco, Solon, Ohio, USA

<b>Bezeichnung</b>	<b>Molekulargewicht [g/mol]</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Fluorescamin (Floram <sup>®</sup> )	278,3	Fluka, Buchs, CH
FACSClean <sup>®</sup>		Becton Dickinson, Heidelberg
FACSFlow <sup>®</sup>		Becton Dickinson, Heidelberg
FACSRinse <sup>®</sup>		Becton Dickinson, Heidelberg
Fiske & Subbarow Reducer		Sigma, Deisenhofen
Glycerol	92,09	Sigma-Aldrich, München
Hydranal <sup>®</sup> -Solvent		Sigma-Aldrich, München
Hydranal <sup>®</sup> -Titrant		Sigma-Aldrich, München
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	Fluka, Buchs, CH
Methanol p.a.	32,0	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	82,03	Fluka, Buchs, CH
Natriumchlorid	58,44	Boehringer Ingelheim, Biberach
Natriumhydroxid	40,0	Merck, Darmstadt
Natriumtetraborat Decahydrat	381,37	Fluka, Buchs, CH
Saccharose	342,3	Boehringer Ingelheim, Biberach
Sodium dodecyl sulfat (SDS)	288,4	Roth, Karlsruhe
Tromethamin (Tris)	121,14	Roth, Karlsruhe
Tryptone Peptone		Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, USA
Yeast Extract		Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, USA
Zwittergent 3-14 <sup>®</sup> 3-(N,N-Dimethylmyristylammonio)-propansulfonat	363,6	Merck Biosciences, Bad Soden

## 2.1.6. ENZYME UND BAKTERIENSTÄMME

Enzyme / Bakterien	Konzentration	Bezugsquelle
Bam H I (Restriktionsenzym)	10 U/ $\mu$ l	Promega, Madison, USA
Deoxyribonuclease I (DNAase I)	18,6 U/ $\mu$ g, 6,4 $\mu$ g/ $\mu$ l	Sigma-Aldrich, München
JM 109 Kompetente E. coli Zellen		Stratagene, Amsterdam, NL

## 2.1.7. LÖSUNGEN UND PUFFER

Bezeichnung	Substanzen	Molarität	Einwaage
ANS-Reagenz	<u>Lösung 1</u> ANS NaOH	8,4 mM 0,1 mM	2,5 g/l 4 g/l
	<u>Lösung 2</u> Citronensäuremonohydrat NaOH	0,1 mM 0,2 mM	21 g/l 8 g/l
	40 ml Lösung 1 und 57 ml Lösung 2 zusammengeben		
Boratpuffer pH 8,25	Natriumtetraborat Decahydrat	50 mM	19,1 g/l
	NaCl	150 mM	8,8 g/l
DNA Ladepuffer (in TE-Puffer)	Bromphenolblau Sucrose	3,7 mM 1,2 M	2,5 g/l 400 g/l
LB-Agarplatten	Trypton Hefeextrakt NaCl Bacto-Agar		10,0 g/l 5,0 g/l 10,0 g/l 14 g/l
LB-Medium pH 7,4 (steril)	Trypton Hefeextrakt NaCl		10,0 g/l 5,0 g/l 10,0 g/l
NaAc-Puffer (pH 6,0), 0,1% Zwittergent	Natriumacetat Zwittergent	20 mM 2,7 mM	1,6 g/l 1 g/l
„Obere Phase“ für Lipidextraktion	1 VT NaCl 36% (konzentriert) 1 VT CHCl <sub>3</sub> 1 VT Methanol		Nach intensivem Schütteln wurde die organische Phase verwendet

Bezeichnung	Substanzen	Molarität	Einwaage
SDS Ladepuffer	Bromphenolblau	3,7 mM	2,5 g/l
	Glycerol	4,9 M	450 g/l
	SDS	88 mM	30 g/l
TAE-Puffer pH 8,0	Tris	40 mM	4,85 g/l
	Essigsäure	20 mM	1,20 g/l
	EDTA	1 mM	0,37 g/l
TE-Puffer pH 7,4	Tris	10 mM	1,576 g/l
	EDTA	1 mM	0,372 g/l
Transfektionsmedium (TRM)	Natriumchlorid	25 mM	85,58 g/l
	Saccharose	250 mM	1,46 g/l
Tris-Puffer pH 7,0	Tris-HCl	10 mM	1,58 g/l
Tris-Puffer pH 7,0, 0,26% Zwittergent	Tris-HCl	10 mM	1,58 g/l
	Zwittergent	7,2 mM	2,6 g/l

Die Lösungen wurden, wenn nicht anders beschrieben, in Millipore-Wasser hergestellt. Der pH-Wert der Lösungen wurde, wenn nötig, mit 1 N Salzsäure bzw. 1 N Natronlauge auf den Sollwert eingestellt.

### 2.1.8. COMMERCIAL KITS

Bezeichnung	Bezugsquelle
CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay	Promega, Mannheim
Endo Free® Plasmid Mega Kit	Qiagen, Hilden

## 2.1.9. VERBRAUCHSMATERIALIEN

Bezeichnung	Bezugsquelle
1,5 ml Halbmikroküvetten PMMA	Brand GmbH, Wertheim
Einmalpipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Greiner, Frickenhausen
FACS Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon® Röhrchen aus PP 15, 50 ml (steril)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kieselgelplatten WFR <sub>254</sub>	Merck, Darmstadt
Mikroreaktionsgefäße	Greiner, Frickenhausen
MultiWell-Platten (6-Well)	Becton Dickinson, Heidelberg
Pasteur-Pipetten (145 mm)	Braun, Melsungen
Petrischalen (100 x 200 mm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Polycarbonatmembran (Porenweite 800 nm, d = 4,7 mm)	Millipore Isopore, Schwalbach
Polystyrolröhrchen 3 ml	Sarsted, Nürnberg
Sterilfilter Sterivex, 0,22 µm	Millipore Isopore, Schwalbach
Stopfen Gusto V2-F210 3WRS D713	Boehringer Ingelheim, Biberach
Vials 2 R	Schott, Jena
Bördelkappen Kombika/Alu-Ku Natural 6007 (13 mm)	Boehringer Ingelheim, Biberach

## 2.1.10. SONSTIGE MATERIALIEN

Bezeichnung	Typ	Bezugsquelle
Mikroliterspritzen	10, 50, 100, 1000, 2500 µl	Hamilton, Bonaduz, CH
Neubauer Zählkammer		Multimed, Wicker GmbH, Kirchheim
Silikonschläuche I.D. 4,0 mm	ITE Sanitech	Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen
Y-Stück I.D. 3,0 mm	Hibiki Y-1	VWR International GmbH, Darmstadt



## 2.2. GERÄTE

Bezeichnung	Typ	Bezugsquelle
Agarosegel Elektrophoresekammer	Standardkammer mit Kühlung	Biometra, Göttingen
Analysenwaage	BP 301 S	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Tuttnauer Systec 3850 EL	Systec GmbH, Wettengel
Transmission-Elektronen- mikroskop Cryo-Präparationsbox Cryo-Transfersystem	Leo 912 Omega	Zeiss, Oberkochen
Durchflusszytometer Software	FACSCalibur® CellQuest Pro®	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 25 CFL	Zeiss, Jena
Heizblock	Liebisch SON/D A	Gebr. Liebisch, Bielefeld
HPTLC-Anlage Auftragegerät Entwicklungskammer  Tauchkammer Scanner Software	Linomat IV Horizontale Entwicklungskammer Camag Tauchkammer Camag TLC Scanner II WinCats 4	Camag, Muttenz, CH
Inkubator	APT Line CB	Binder, Tuttlingen
Laborschüttler	Vibramax 100, Heidolph Instruments	Neo Lab, Heidelberg
Microplate Luminometer Software	Microlumat Plus LB 96 V WinGlow	EG & G Berthold, Bad Wildbad
Minishaker (Vortex)	MS1	IKA, Staufen
Karl-Fischer-Automat	KFS Titrino 720, Ti-Stand 703 Titrationsgefäß Magnet-rührer	Metrohm, Herisau
Laborwaage	LP 3200 D	Sartorius, Göttingen
Lumineszenz-Spektrometer Software	LS 50B	Perkin-Elmer, Überlingen
pH-Meter		Schott, Mainz

<b>Bezeichnung</b>	<b>Typ</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Photonenkorrelations- spektrometer	Nicomp 380 BI-90 Plus Zetamaster S	Nicomp, Santa Barbara, CA, USA BIA-Brookhaven Instruments GmbH, Wien, Österreich Malvern Instruments, Malvern, GB
Pipetten	Pipetman, Gilson	Laborshop Neolab <sup>®</sup> , Freiburg
Rasterelektronenmikroskop	Zeiss DSM 960	Zeiss, Oberkochen
Schlauchpumpe	Hundt PM	TechnoPack Hundt GmbH, Karlsruhe
Schlauchpumpe		Filtron, Karlstein
Schüttelwasserbad	GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Sicherheitswerkbank	Herasafe	Heraeus Instruments, Fellbach
Tischlyophilisator	Alpha 2-4 Christ	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode
Ultrazentrifuge Rotoren	Avanti J-20 XP JA-10 JA-25.50	Beckman, München
UV/VIS-Spektrophotometer	Ultrospec 1000 Uvikon 933 A	Pharmacia Biotech (Biochrom), Cambridge, GB Kontron Instruments, Mailand, I
Wasseraufbereitung	Millipore Simplicity 185	Millipore GmbH, Schwalbach
Wasserbad	Haake W 26	Haake, Karlsruhe
Zentrifuge	Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg

### 3. Methoden

#### 3.1. HERSTELLUNG DER LIPOPLEXE

##### 3.1.1. HERSTELLUNG DER LIPOPLEXE IM KLEINEN MASSSTAB DURCH PIPETTIEREN

Lyophilisiertes DC-30 oder DAC-30 wurden mit sterilem Millipore-Wasser aufgenommen und 30 min quellen lassen. Anschließend wurde zur vollständigen Redispergierung des Lipids mehrere Male auf- und abpipettiert. (Ausgangskonzentration:  $c = 1 \text{ mg/ml}$ ).

Zur Herstellung der Lipoplexe wurden zwei Ansätze gleicher Volumina hergestellt:

Ansatz A: In TRM verdünntes DAC-30 ( $V_A$ )

Ansatz B: In TRM verdünntes Plasmid ( $V_B$ )

$V_A$  wurde in  $V_B$  überführt, durch auf- und abpipettieren gemischt und 20 min bei RT stehen gelassen. Die verwendeten Konzentrationen können den weiteren Kapiteln entnommen werden.

Da für die einzelnen Untersuchungen unterschiedliche Mengen an Lipoplexen nötig waren, wurden entsprechend verschiedene Volumina hergestellt. Die Herstellung der Lipoplexe mit verschiedenen Gewichtsverhältnissen erfolgte ausgehend von einer gleichbleibenden Plasmidkonzentration, die Lipidmengen wurden entsprechend variiert. Aus den Massenverhältnissen und den molaren Massen der Substanzen wurden die entsprechenden Ladungsverhältnisse errechnet. Dabei wurde von einer mittleren molaren Masse der DNA-Nukleotide von  $325 \text{ g/mol}$  pro Ladung ausgegangen. DC-Cholesterol und DAC-Cholesterol sind monovalente Lipide mit einem Molekulargewicht von  $500 \text{ g/mol}$ . Das Verhältnis von ungeladenem DOPE zu geladenem Cholesterolderivat in DC-30 und DAC-30 ist 7:3 (w/w). Aus diesen Angaben ließen sich die Ladungsverhältnisse der Lipoplexe von verschiedenen Massenverhältnissen nach Gleichung 1 berechnen.

$$\text{Lipid/DNA(+/-)} = \frac{m_{\text{Lipid}} * 0,3 / 500}{m_{\text{DNA}} / 325} \quad \text{Gleichung 1}$$

$m_{\text{Lipid}}$	Gesamtlipid [ $\mu\text{g}$ ]
$m_{\text{Lipid}} * 0,3$	Masse kationisches Lipid [ $\mu\text{g}$ ]
$m_{\text{DNA}}$	Masse DNA [ $\mu\text{g}$ ]

#### 3.1.1.1. LIPOPLEXE FÜR TNS-ASSAY

Für die Untersuchungen mittels TNS–Assay (siehe 3.4.3.2) wurden Lipoplexe in verschiedenen Verhältnissen mit unterschiedlichen Plasmidmengen und gleichbleibenden Lipidmengen hergestellt. Die Herstellungsweise der Lipoplexe erfolgte wie unter 3.1.1. beschrieben.

#### 3.1.2. KONTINUIERLICHE HERSTELLUNG DER LIPOPLEXE IM GROSSMASSTAB MIT ANSCHLIESSENDE LYOPHILISATION

##### 3.1.2.1. KONTINUIERLICHE HERSTELLUNG DER LIPOPLEXE

Die kontinuierliche Herstellung der Lipoplexe aus DAC-30 bzw. DC-30 und einem GFP-exprimierenden Plasmid in großem Maßstab mit anschließender Lyophilisation erfolgte, wie bereits publiziert, für beide Lipide analog (Clement et al. 2005). Es wurden Lipoplexe mit einem Lipid/DNA-Verhältnis von 5:1 (w/w) hergestellt. Der Herstellungsprozess ist schematisch in Abbildung 3.1.2-1 wiedergegeben.

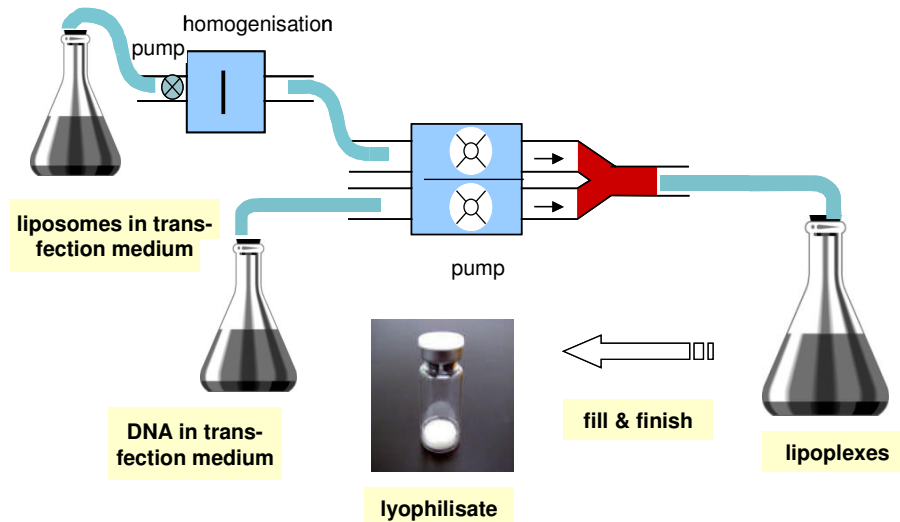


Abbildung 3.1.2-1 Schematische Darstellung des Prozesses zur Herstellung von Lipoplexen in großem Maßstab (Clement et al. 2005)

Lyophilisiertes Lipid wurde in sterilem TRM aufgenommen ( $c = 1 \text{ mg/ml}$ ) und eine halbe Stunde quellen lassen. Die Liposomen wurden auf eine Konzentration von  $250 \text{ }\mu\text{g/ml}$  mit sterilem TRM verdünnt und vor der Lipoplexbildung einmal durch eine Polycarbonatmembran mit  $800 \text{ nm}$  Porenweite extrudiert. Das ebenfalls in sterilem TRM verdünnte Plasmid ( $50 \text{ }\mu\text{g/ml}$ ) und die verdünnte, extrudierte Liposomendispersion wurden über ein Y-Verbindungsstück ( $3 \text{ mm}$  Durchmesser) mit gleichbleibender Flussrate zusammengepumpt. Die erhaltenen Lipoplexdispersionen wurden für  $30 \text{ min}$  stehen lassen, um die vollständige Bildung der Lipoplexe zu gewährleisten. Anschließend wurden je  $1 \text{ ml}$  der sterilen Dispersionen in  $2 \text{ ml}$  Lyophilisationsvials transferiert und gemäß 3.1.2.2 lyophilisiert. Alle Arbeiten erfolgten unter der Sterilbank. Es wurden die in Tabelle 3-1 aufgeführten Chargen hergestellt.

Charge	Lipid/DNA (w/w)	DC-30 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	DAC-30 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	pEGFP [ $\mu\text{g/ml}$ ]
E06103dc	5:1	125		25
E11015dc	5:1	125		25
E18015dc	5:1	125		25
E25015dc	5:1	125		25
E06103dac	5:1		125	25
E11015dac	5:1		125	25
E18015dac	5:1		125	25
E25015dac	5:1		125	25

Tabelle 3-1 Durch kontinuierliches Mischen und anschließende Lyophilisation hergestellte Lipoplexchargen

Weiterhin wurden teilweise Chargen eingesetzt, die in vorausgehenden Arbeiten auf die gleiche Art hergestellt worden waren. Die Formulierungen sind den einzelnen Kapiteln zu entnehmen.

### 3.1.2.2. LYOPHILISATION

Die Vials mit den abgefüllten Lipoplexdispersionen wurden auf der Stellfläche eines Tischlyophilisators (Alpha 2-4 Christ) platziert. Der Gefriertrocknungsprozess wurde gemäß des folgenden Zyklusses durchgeführt: Die Proben wurden bei  $-50\text{ °C}$  und 1000 mbar Kammerdruck für 3 h eingefroren. Für die Haupttrocknung wurde der Kammerdruck auf 0,05 mbar reduziert, die Durchführung erfolgte bei  $-20\text{ °C}$  für 42 h und  $30\text{ °C}$  für 6 h. Abschließend wurden die Proben auf  $5\text{ °C}$  abgekühlt, welches auch die endgültige Lagertemperatur war. Vor dem Herausnehmen wurden die Vials unter Vakuum verschlossen und anschließend verbördelt.

## 3.2. AUFARBEITUNG DER LIPOPLEXE FÜR ANALYTISCHE ZWECKE

Die durch Pipettieren hergestellten Lipoplexe wurden in dieser Form direkt verwendet. Die Lyophilisate mussten aufgearbeitet werden, um sie für die Untersuchungen einsetzen zu können.

### 3.2.1. AUFARBEITUNG DER LYOPHILISATE

Für einen Teil der durchgeführten Charakterisierungsmethoden war es essentiell, dass die Lipoplexe in intakter Form vorlagen. Für andere Untersuchungen jedoch mussten die Lipoplexe zerstört werden, damit Lipid und DNA getrennt analysiert werden konnten, bzw. es musste so aufgearbeitet werden, dass DNA und andere wasserlösliche Anteile abgetrennt wurden und das Lipid in organischer Lösung vorlag.

#### 3.2.1.1. HERSTELLUNG VON LIPOPLEXDISPERSIONEN

Die Lyophilisate wurden mit 1,0 ml Millipore-Wasser redispergiert und vor weiterer Verarbeitung 30 min stehen lassen. Es wurden konzentrierte Lipoplexdispersionen erhalten, die, je nach Bedarf, in dieser Form oder zusätzlich verdünnt eingesetzt wurden. Die Konzentrationen sind den einzelnen Kapiteln zu entnehmen.

#### 3.2.1.2. HERSTELLUNG VON DISPERSIONEN MIT FREIEM LIPID UND DNA

Die Lyophilisate wurden mit NaAc-Puffer (pH 6,0) mit 0,1% Zwittergent aufgenommen. Durch das enthaltene Zwittergent wurden die Lipoplexe zerstört, und Lipid sowie DNA lagen in nicht komplexierter Form für die Untersuchungen vor.

#### 3.2.1.3. EXTRAKTION DER LYOPHILISATE

Die Lyophilisate wurden modifiziert nach der von Bligh und Dyer beschriebenen Methode aufgearbeitet (Bligh und Dyer 1959). Hierzu wurden die Proben mit 1 ml Methanol aufgenommen und mit 1 ml  $\text{CHCl}_3$  ausgeschüttelt. Anschließend wurde zur Phasentrennung 1 ml 18%ige wässrige NaCl-Lsg zugegeben und nochmals geschüttelt. Die obere wässrige Phase wurde abgetrennt und es wurde zweimal mit der oberen Phase einer Mischung aus gleichen Volumenteilen MeOH,  $\text{CHCl}_3$  und konzentrierter NaCl-Lsg (siehe.2.1.7) gewaschen. Die am Ende resultierende organische Phase enthielt die Lipidbestandteile.

## 3.3. ZELLEN UND PLASMID

### 3.3.1. KULTIVIERUNG

Glatte Rattenmuskelzellen (A-10 SMC) wurden als Monolayer in 100 mm Petrischalen im Inkubator bei 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$  und 95% Luftfeuchte mit DMEM

(Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 1 mM Natriumpyruvat und 20% FCS (Fötale Kälberserum) kultiviert.

### 3.3.2. VORBEREITUNG DER ZELLEN ZUR TRANSFEKTION

Ein Tag vor Versuchsbeginn wurde in 6-Well-Platten eine Zellzahl von ungefähr  $7 \times 10^4$  Zellen pro 6-Well ausplattiert.

### 3.3.3. PLASMIDGEWINNUNG

#### 3.3.3.1. TRANSFORMATION

Die Aufnahme externer DNA in Bakterienzellen wurde von Mandel und Higa beschrieben (Mandel und Higa 1970).

Ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit kryo-konservierten kompetenten JM 109 E.coli Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 5 ng der herzustellenden Plasmid-DNA (Kanamycin-resistentes GFP-exprimierendes Plasmid) inkubiert. Die Suspension wurde für weitere 30 min auf Eis und anschließend 10 min ohne Schütteln im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Durch diesen Prozess kann die DNA ins Zellinnere wandern. Danach wurde die Suspension mit einem Drygalski-Spatel auf eine kanamycinhaltige LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 3.3.3.2. PLASMIDISOLIERUNG

Von den gewachsenen Kolonien auf der LB-Agarplatte wurden ca. 3 ml Vorkulturen in kanamycinhaltigem LB-Medium (50 µg/ml) durch Beimpfung des Mediums mit einer Kolonie hergestellt. Die Vorkulturen wurden bei 37 °C für 8 h im Inkubator kräftig geschüttelt und anschließend in Erlenmeyerkolben mit 500 ml LB-Medium überführt, wo sie bei 37 °C unter Schütteln über Nacht wachsen konnten. Zur Gewinnung der Plasmid-DNA aus den gewachsenen Bakterienzellen wurde der Endofree Plasmid Mega Kit von Qiagen® verwendet. Die Aufarbeitung erfolgte nach Herstellerangaben. Sie beruht auf einer alkalischen Lyse, gefolgt von einer chromatographischen Aufreinigung der DNA über Ionenaustauschersäulen. Die DNA wird bei niedriger Salzkonzentration und geeignetem pH-Wert an die Säule gebunden. Proteine, RNA und weitere niedermolekulare Verunreinigungen können durch Waschen abgetrennt werden. Anschließend wird die DNA von der Säule eluiert



und mit Isopropanol präzipitiert, bevor sie mit autoklaviertem TE-Puffer (pH 7,4) aufgenommen wird.

### 3.3.3.3. BESTIMMUNG DER PLASMIDKONZENTRATION

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Plasmid-DNA mit TE-Puffer (pH 7,4) 1:100 verdünnt und spektroskopisch bei 260 und 280 nm vermessen. Unter Anwendung von Gleichung 2 konnte die Konzentration der Plasmid-Lösung bestimmt werden.

$$c_{\text{DNA}} [\text{mg / ml}] = A_{260} * 0,05 * \text{Verdünnungsfaktor} \quad \text{Gleichung 2}$$

$c_{\text{DNA}}$	Konzentration DNA [mg/ml]
$A_{260}$	Absorption bei 260 nm

Aus dem Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm lässt sich der Reinheitsgrad der Plasmid-Lsg bestimmen. Ein Verhältnis  $A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0$  bedeutet das Vorliegen einer weitgehend proteinfreien Lösung (Mülhardt 2003).

### 3.3.3.4. AGAROSEGEL-ELEKTROPHORESE

Zur Überprüfung des hergestellten Plasmids wurde ein analytisches Agarosegel (0,8%) eingesetzt. Zur Herstellung des Gels wurde die Agarose eingewogen, mit TAE-Puffer (pH 8,0) aufgefüllt und in der Mikrowelle zum Sieden erhitzt, bis sich eine klare Lösung bildete. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurde EtBr-Lösung hinzugefügt (10 µl/l einer 10 mg/ml Lösung). Anschließend konnte ein ca. 0,5 cm dickes Gel gegossen werden. Die hergestellten Plasmidproben wurden zusammen mit dem Ausgangsplasmid aufgetragen. Dazu wurde ca. 0,5 µg Plasmid mit Ladepuffer versetzt (Verhältnis Probe/Ladepuffer ca. 3/1 (V/V)) und in die vorgeformten Taschen des Gels einpipettiert. 1 kb DNA-Ladder diente als Marker. Die Entwicklung des Gels erfolgte bei 100 V während 30 min. Nach erfolgter Elektrophorese konnten die Banden des Gels unter UV-Licht ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) sichtbar gemacht und somit Ausgangsplasmid und hergestelltes Plasmid miteinander verglichen werden.

### **3.4. METHODEN ZUR ANALYTIK UND CHARAKTERISIERUNG VON LIPOPLEXEN**

#### **3.4.1. TRANSFEKTIONSEFFIZIENZ UND ZYTOTOXIZITÄT**

##### **3.4.1.1. TRANSFEKTION**

Etwa 30 min vor Beginn des Experimentes wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Das überstehende Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit ca. 2 ml auf 37 °C erwärmtem PBS pro 6-Well gewaschen. Anschließend wurde 1 ml serumhaltiges Medium pro 6-Well aufgegeben.

Zur Transfektion mit pipettierten Lipoplexen erfolgte die Herstellung der Lipoplexe wie unter 3.1.1 beschrieben. Ein ml der Lipoplexe wurde langsam pro 6-Well auf die Zellen aufgegeben. Die DNA-Endkonzentration betrug 2 µg/ml, die Lipidmengen wurden entsprechend variiert. Die Zellen wurden für 5 h mit den Lipoplexen bei 37 °C, 5%CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das überstehende Medium abgesaugt und 2 ml neues serumhaltiges Zellkulturmedium pro 6-Well zupipettiert, ohne die Zellen zu waschen. Die Auswertung erfolgte nach 48-stündiger Inkubation (Gesamtzeit) bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte.

Die konzentrierten redispergierten lyophilisierten Lipoplexe wurden mit sterilem TRM auf eine Konzentration von 2 µg/ml Plasmid und 10 µg/ml Lipid verdünnt. Wenn nicht anders beschrieben, wurde 1 ml der verdünnten Lipoplexe langsam pro 6-Well auf die Zellen aufgegeben. Das weitere Verfahren erfolgte analog der Transfektion mit pipettierten Lipoplexen.

##### **3.4.1.2. DURCHFLUSSZYTOMETRIE**

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz und der Anzahl der durch die Transfektion abgetöteten Zellen wurden die transfizierten Zellen 48 h nach Versuchsbeginn mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Zuerst wurden die Zellen einer optischen Kontrolle im Fluoreszenzmikroskop unterzogen um sicherzustellen, dass die Kontrollzellen keine bzw. nur eine sehr geringe Eigenfluoreszenz aufweisen und um ein positives Transfektionsergebnis (grüne Fluoreszenz der exprimierten GFP-Proteine) sicherzustellen.

Sowohl die Zellen, als auch das überstehende Kulturmedium wurden für die Auswertung verwendet, um auch möglicherweise abgelöste Zellen zu erfassen. Der

Überstand wurde in FACS-Röhrchen pipettiert. Die Zellen wurden mit 1 ml/Well PBS gewaschen, welches ebenfalls in die Röhrchen überführt wurde. Nach Ablösen der Zellen mit 0,5 ml Trypsin/EDTA/Well, Abstoppen der Enzymreaktion mit serumhaltigen Medium und Vereinzelung durch Auf- und Abpipettieren, wurde die Zellsuspension zum entsprechenden Röhrchen zugegeben. Das komplette Volumen aus Medium, PBS und Zellsuspension wurde bei 218 g und 20 °C 4 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml PBS gewaschen. Nach Resuspension und erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurden unbehandelte Kontrollzellen mit 300 µl PBS aufgenommen. Zur Überprüfung der Kontrollzellen auf tote Zellen wurden diese mit 296 µl PBS und 4 µl 7-AAD-Lösung aufgenommen, ebenso wie die zu analysierenden Zellen. Nach kurzem Vortexen und 10 minütiger Inkubation im Dunkeln, um die Anreicherung des 7 AAD-Farbstoffes in der DNA der Zellen zu gewährleisten, wurden im FACS 10.000 Zellen unter „High-Flow“-Einstellung gezählt und analysiert. Das durch die Transfektion exprimierte Protein GFP wurde im Fluoreszenzkanal 1 bei 530 nm erfasst, die toten Zellen wurden im Fluoreszenzkanal 3 bei >670 nm detektiert. Die erhaltenen Daten wurden mit CellQuest Pro<sup>®</sup>-Software ausgewertet.

#### 3.4.1.3. CELLTITER-GLO<sup>™</sup> TEST

Im CellTiter-Glo<sup>™</sup>-Test-Kit sind ein lyophilisiertes Testsubstrat und ein Lysepuffer enthalten. Das Testreagenz wurde nach Vorschrift durch die Zugabe von 10 ml Puffer zum Substrat hergestellt. 48 h nach Beginn der Transfektion wurde das überstehende Zellkulturmedium abgesaugt und 500 µl frisches Zellkulturmedium und 500 µl des hergestellten Testreagenzes aufgegeben. Die Platten wurden 2 min auf einem Laborschüttler geschüttelt. Nach anschließender 10-minütiger Inkubation bei RT ohne Schütteln wurden die Inhalte der 6-Wells (1000 µl je 6-Well) in eine 96-Well Platte überführt (3 Messwerte à 200 µl). Die 96-Well Platte wurde umgehend in ein Luminometer eingebracht und mit einer Integrationszeit von 0,5 s vermessen.

Die Integrationszeit ist proportional zur Anzahl der gemessenen Relative Light Units (RLU). Aus den 3 Messwerten, die für jedes Well erhalten wurden, konnte der Mittelwert bestimmt werden. Je nach Anzahl der Wells für ein Testmedium wurde aus diesen zur Auswertung ebenfalls der Mittelwert bestimmt. Es besteht eine direkte Beziehung zwischen der Lumineszenz und der Anzahl der metabolisch aktiven Zellen in Kultur (siehe Abbildung 3.4.1-1).

Die Auswertung erfolgte im Vergleich zu Kontrollwerten, welche aus Zellen bestimmt wurden, die nur mit Kulturmedium, ansonsten aber gleich den transfizierten Zellen behandelt wurden. Diese Kontrollwerte wurden gleich 100% gesetzt.

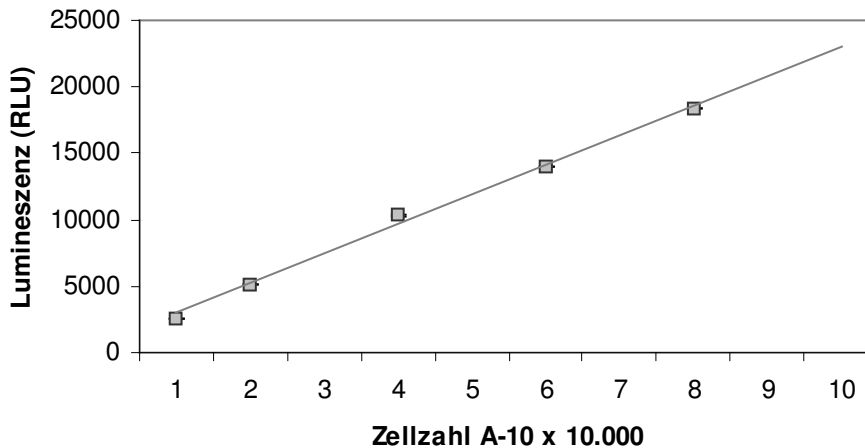


Abbildung 3.4.1-1 Korrelation zwischen Zellzahl und Lumineszenzsignal

## 3.4.2. PARTIKELGRÖSSE UND STRUKTUR

### 3.4.2.1. PHOTONENKORRELATIONS-SPEKTROSKOPIE (PCS)

Die Bestimmung der Teilchengröße und der Breite der Größenverteilung der Liposomen- und Lipoplex-Dispersionen wurden in TRM als Dispersionsmedium durchgeführt. Da TRM deutlich viskoser ist als ein wässriges Lösungsmittel und einen geringeren Brechungsindex aufweist, wurden die Werte für die Messungen angepasst. Die Durchführung erfolgte bei einem Viskositätswert von 1,2032 Pas und einem Brechungsindex von 1,3455. Das Probenvolumen für die Messung betrug ca. 300 µl, welches in eine kleine Glasküvette gefüllt wurde. Die Frequenz der Streulichtsignale am Detektor betrug idealerweise 200-800 kHz, teilweise musste aufgrund der geringen Lipoplexkonzentrationen auch in etwas niedrigeren Bereichen gemessen werden. Die Streulichtmessung erfolgte in einem konstanten Winkel von 90°. Es wurden drei Messungen mit jeweils 5 min Messdauer pro Probe durchgeführt. Der mittlere hydrodynamische Durchmesser ergab sich aus dem Mittelwert der drei Hauptmessungen. Aus diesen Werten wurde ebenfalls die Standardabweichung bestimmt, um die Breite der Verteilung zu ermitteln.

### 3.4.2.2. CRYO-TRANSMISSIONS-ELEKTRONENMIKROSKOPIE (CRYO-TEM)

Pipettierte und lyophilisierte Proben wurden zur Strukturanalyse im Cryo-TEM analysiert. Um eine genügend hohe Konzentration an Lipoplexen in der Probe zu erhalten, wurden lyophilisierte Proben in der Hälfte des sonst verwendeten Volumens Millipore-Wasser redispergiert. Es resultierte eine Endkonzentration von 250 µg/ml DAC-30 und 50 µg/ml Plasmid. Pipettierte Lipoplexe wurden in gleichen Konzentrationen nach 3.1.1 mit DAC-30 und GFP-exprimierendem Plasmid in TRM hergestellt.

Ein Tropfen der jeweiligen Proben wurde auf ein mit einem Kohlefilm nach Fukami präpariertes Kupfernetz aufgetragen (Fukami und Adachi 1965). Überschüssiges Probenvolumen wurde mit einem Filterpapier abgesaugt, das probenhaltige Netz sofort in flüssigem Ethan schockgefroren und anschließend mit einem Cryo-Transfersystem in das Mikroskop eingebracht und untersucht. Eine beliebige Anzahl von Probenausschnitten konnte in verschiedenen Vergrößerungen online abgespeichert werden. Die Bilder wurden von Frau Dr. Andrea Kimpfler und Andreas Neub, Pharmazeutisches Institut, am Institut für Biophysik der Albert-Ludwigs-Universität aufgenommen.

### 3.4.2.3. FLUORESZENZMESSUNG VON DNA DURCH AUSSCHLUSS UND VERDRÄNGUNG AUS LIPOPLEXEN

Die Fluoreszenzmessungen wurden im „read“-Modus ( $\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$ , Spaltbreiten 2,5 nm) in einer Quarz-Mikrofluoreszenzküvette durchgeführt. Zur Ermittlung der benötigten Farbstoffkonzentration wurde DNA mit 4',6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) gesättigt. Hierzu wurde zu einem Ansatz von DNA in TRM (10 µg/ml) der Farbstoff in kleinen Schritten im µl-Bereich so lange zupipettiert, bis die Fluoreszenzintensität ein Plateau erreichte. Aus diesem Versuch wurde eine Arbeitskonzentration von 2 µM DAPI ermittelt (siehe Abbildung 3.4.2-1). Die Konzentration der DAPI-Ausgangslösung betrug 100 µM DAPI in Millipore-Wasser.

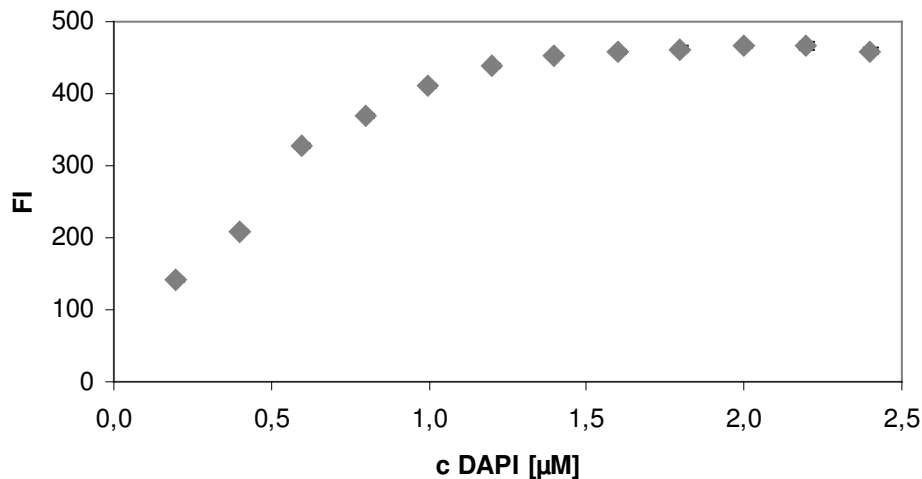


Abbildung 3.4.2-1 Sättigung der Fluoreszenz von DNA (10 µg/ml) mit DAPI

Zur Berechnung des prozentualen Anteils der DNA-Phosphatgruppen in den Proben (FI%), der mit dem Farbstoff interagieren kann, wurden der Leerwert  $F_0$  von 2 µM DAPI in Transfektionsmedium, sowie der Referenzwert der DNA (10 µg/ml) mit 2 µM DAPI ( $F_{DNA}$ ) ebenfalls in TRM, bestimmt. Aus diesen Werten und den gemessenen Fluoreszenzen der Proben ( $F_{PR}$ ) erfolgte die Berechnung der prozentualen Fluoreszenzintensität FI% nach Gleichung 3.

$$FI[\%] = \frac{F_{PR} - F_0}{F_{DNA} - F_0} * 100 \quad \text{Gleichung 3}$$

FI[%]	prozentualer Anteil der DNA-Phosphatgruppen, der mit Farbstoff interagieren kann
$F_0$	Leerwert von 2 µM DAPI in TRM
$F_{DNA}$	Referenzwert DNA (10 µg/ml) mit 2 µM DAPI
$F_{PR}$	Fluoreszenz der Probe

### 3.4.2.3.1. AUSSCHLUSSVERFAHREN

Für das Ausschlussverfahren wurden Lipoplexe in kleinem Maßstab nach 3.1.1 mit DC-30 und GFP-exprimierendem Plasmid in verschiedenen Verhältnissen Lipid/DNA (w/w) hergestellt (1:1-49:1), was den Ladungsverhältnissen (+/-) von 0,2:1-9,6:1 entsprach (zur Berechnung der Ladungsverhältnisse siehe 3.1.1). Die DNA-Konzentration blieb in den verschiedenen Verhältnissen gleich (10 µg/ml), die DC-30-

Mengen wurden entsprechend der gewünschten Verhältnisse gewählt. Der Farbstoff wurde unmittelbar vor der Messung zu den bereits gebildeten Lipoplexen zugegeben, so dass eine Endkonzentration an DAPI von 2  $\mu\text{M}$  erreicht wurde. Der Gesamtansatz betrug 1,5 ml.

#### 3.4.2.3.2. VERDRÄNGUNGSVERFAHREN

Die Herstellung der Lipoplexe für das Verdrängungsverfahren erfolgt ebenfalls wie unter 3.1.1 beschrieben, der Fluoreszenzfarbstoff DAPI wurde jedoch der DNA-Ausgangslösung zugefügt. Nach erfolgter 20-minütiger Inkubation bei RT wurde sofort vermessen.

Konzentrationen und Verhältnisse wurden entsprechend 3.4.2.3.1 gewählt.

#### 3.4.2.4. AGAROSEGEL-ELEKTROPHORESE

Der Einfluss der Komplexierung der DNA durch die kationischen Lipide DAC-30 und DC-30 auf das Verhalten der DNA im elektrischen Feld sowie der Einfluss einer Nucleasebehandlung wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese untersucht. Die Agarosegele (0,8%) wurden wie unter 3.3.3.4 beschrieben hergestellt. Folgende Proben wurden analysiert:

- Mit Millipore-Wasser redispergierte lyophilisierte Lipoplexe mit DAC- und DC-30 (siehe 3.2.1.1) mit und ohne DNase-Behandlung ( $c_{\text{Lipid}} = 125 \mu\text{g/ml}$ ,  $c_{\text{DNA}} = 25 \mu\text{g/ml}$ )
- Mit NaAc-Puffer (pH 6,0), 0,1% Zwittergent, redispergierte lyophilisierte Lipoplexe mit DAC- und DC-30 (siehe 3.2.1.2) mit und ohne DNase-Behandlung ( $c_{\text{Lipid}} = 125 \mu\text{g/ml}$ ,  $c_{\text{DNA}} = 25 \mu\text{g/ml}$ )
- Durch Pipettieren hergestellte Lipoplexe mit DAC- und DC-30 (siehe 3.1.1) mit und ohne DNase-Behandlung ( $c_{\text{Lipid}} = 125 \mu\text{g/ml}$ ,  $c_{\text{DNA}} = 25 \mu\text{g/ml}$ )

Für die DNase-Behandlung erfolgte der Zusatz von 15 U/ $\mu\text{g}$  DNA RNase freier DNase A und es wurde im Wasserbad bei 37 °C für 15 min inkubiert. Danach wurde die Enzymreaktion mit SDS-haltigem Ladepuffer abgestoppt (Verhältnis Probe/Ladepuffer 3:1). Die Proben ohne Nucleasebehandlung wurden direkt mit Ladepuffer im Verhältnis Probe/Ladepuffer 3:1 versetzt. Nach Einpipettieren der Proben (0,3  $\mu\text{g}$  DNA) in die Geltaschen wurde bei 100 V für ca. 30 min entwickelt.

Danach wurden die Gele unter UV-Licht bei 254 nm sichtbar gemacht und abfotografiert.

### 3.4.3. PARTIKELLADUNG

#### 3.4.3.1. ZETAPOTENTIAL

Für die Messung im Malvern Zetamaster S wurden die Proben mit partikelfreiem TRM verdünnt, bis die Countrate des He-Ne Lasers ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) bei ca. 2000 kcps lag. Vor der Injektion der Proben in die auf 25 °C temperierte Messzelle wurde diese so lange mit entgastem Millipore-Wasser gespült, bis in der Messzelle keine Blasen mehr vorhanden waren und die Countrate unter 2000 cps lag. Anschließend wurden 8 Einzelmessungen zu je 20 s bei einer Zellspannung von 150 V, einer Modulatorfrequenz von 250 Hz und einer „Correlator sample time“ von 400  $\mu\text{s}$  durchgeführt. Es wurde der Mittelwert aus den Einzelmessungen gebildet, Messergebnisse mit mehr als einem Wert wurden im Ergebnis nicht berücksichtigt.

Die Messungen im Brookhaven BI 90 plus wurden unverdünnt durchgeführt. Die Proben wurden in Einwegküvetten eingefüllt, in welche die Elektrode zur Erzeugung des elektrischen Feldes eingesetzt wurde. Vor der Messung wurden die Proben im Gerät auf 25 °C temperiert. Die Messungen erfolgten bei einer Frequenz von 2,0 Hz und einer Elektrodenspannung von 5,0 V. Die Referenz-Countrate des Lasers (658 nm) betrug ca. 1500 kcps, die Countrates der Proben lagen bei ca. 500 kcps.

Die Durchführung erfolgte mit beiden Geräten bei einem Viskositätswert von 1,2032 Pas.

#### 3.4.3.2. OBERFLÄCHENLADUNG MITTELS 2-(P-TOLUIDINYL) NAPHTHALIN-6-SULFONSÄURE (TNS)-ASSAY

Die Eigenschaft des Farbstoffes TNS, sich in Membranen einzulagern wurde zur Bestimmung der Oberflächenladung von Lipoplexen ausgenutzt. In der Literatur beschriebene Anregungs- und Emissionswellenlängen ( $\lambda_{\text{exc}} = 321 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 445 \text{ nm}$ ) wurden für die Untersuchungen übernommen, die Spaltweiten betragen 2,5 nm. Ebenfalls ausgehend von Literaturwerten (Eisenberg et al. 1979; Momm 2004), wurde eine TNS-Arbeitskonzentration von 3  $\mu\text{M}$  gewählt. Zur Ausschaltung von Temperatureinflüssen wurde das Lumineszenz-Spektrometer (Perkin-Elmer LS 50B) auf 25 °C temperiert. Die Lipoplexe wurden für die Untersuchungen der Auswirkung des Ladungsverhältnisses (+/-) auf die Fluoreszenzintensität wie unter 3.1.1.1



hergestellt. Lyophilisierte Lipoplexe wurden nach 3.2.1.1 mit Millipore-Wasser redispergiert, die Endkonzentration betrug 125 µg/ml Lipid. Die Lipidkonzentration im Assay betrug konstant 10 µg/ml. Die Messungen wurden in einer Quarz-Mikrofluoreszenzküvette durchgeführt, die Messwerte wurden 2 min nach TNS-Zugabe zu den Lipoplexen ermittelt. Der Gesamtansatz betrug 1,0 ml.

Zur Berechnung des prozentualen Anteils der Fluoreszenzintensität in den Lipoplexproben (FI%) im Vergleich zur Fluoreszenzintensität der reinen Liposomen mit TNS, wurden der Leerwert  $F_0$  von 3 µM TNS in TRM, sowie der Referenzwert der Liposomen (10 µg/ml) mit 3 µM DC-30 ( $F_{DC-30}$ ), ebenfalls in TRM, bestimmt. Aus diesen Werten und den gemessenen Fluoreszenzen der Proben ( $F_{PR}$ ) erfolgte die Berechnung von FI% nach Gleichung 4.

$$FI[\%] = \frac{F_{Pr} - F_0}{F_{DC-30} - F_0} * 100 \quad \text{Gleichung 4}$$

$FI[\%]$	prozentualer Anteil der Fluoreszenz in Lipoplexproben
$F_0$	Leerwert von 3 µM TNS in TRM
$F_{DC-30}$	Referenzwert Liposomen (10 µg/ml) mit 2 µM DAPI
$F_{PR}$	Fluoreszenz der Probe

### 3.4.4. LIPIDQUANTIFIZIERUNG

#### 3.4.4.1. HOCHLEISTUNGSDÜNNNSCHICHT-CHROMATOGRAPHIE (HPTLC)

Proben, Standardsubstanzen und Kalibratoren für die HPTLC wurden aus organischem Lösungsmittel aufgetragen, um die Verbreiterung der Auftragespots zu verhindern. Der Auftrag auf die Platten erfolgte mit dem automatischen Auftragegerät Linomat IV. 10 mm breite Banden mit einem Abstand von 5 mm zwischen den einzelnen Banden wurden mit einer Sprühdose von 1 µl/15s aufgesprüht. Der Abstand der Startlinie vom Plattenrand betrug 10 mm.

Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden DAC-30 bzw. DC-30 in MeOH oder  $CHCl_3$  aufgenommen und direkt auf jede Platten mit aufgetragen. Die Lyophilisate wurden zum einen in MeOH aufgenommen und direkt eingesetzt oder zur Abtrennung der wasserlöslichen Bestandteile nach Bligh-Dyer extrahiert (siehe 3.2.1.3) und aus der organischen  $CHCl_3$ -haltigen Phase aufgetragen. Da durch den Prozess des Ausschüttelns eine quantitative Wiederfindung der  $CHCl_3$ -Phase und

somit des eingesetzten Lipids nicht gewährleistet werden konnte, wurde ein Standard mit bekannter Konzentration auf identische Weise extrahiert und aufgetragen. Jede Probe wurde auf einer Platte mindestens zweimal aufgetragen.

Die Entwicklung der Platte erfolgte in einer horizontalen Entwicklungskammer über eine Laufstrecke von 8 cm. Es wurde zuerst eine 10-minütige Sättigung der Kammer mit dem Fließmittel durchgeführt, währenddessen die Platte schon aufgelegt wurde. Die Zusammensetzung der mobilen Phase war  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_3:\text{H}_2\text{O}$  18,75:6,9:0,15:0,35 (v/v/v/v). Im Anschluss an die Entwicklung wurde die Platte kurz unter den Abzug gelegt, um das Fließmittel abdampfen zu lassen, und dann für 10 min auf einem Heizblock bei 100 °C getrocknet.

Vor der Detektion wurde die Platte abgekühlt. Anschließend wurde sie für 5 s in eine mit ANS-Detektionsreagenz (siehe 2.1.7) gefüllte Tauchkammer eingetaucht. Nach Abtropfen und Entfernung von überschüssigem Reagenz mit einem Papiertuch wurde die Platte sofort in den Camag TLC Scanner II eingelegt. Der Scan erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, nach 15-minütiger Inkubation im Dunkeln bei einer Messgeschwindigkeit von 10 mm/s. Die Wellenlänge der Deuteriumlampe betrug  $\lambda = 366$  nm. Zur Erhöhung der Genauigkeit wurde nicht der gesamte Fleck, sondern nur das Mittelstück gescannt (siehe Abbildung 3.4.4-1).

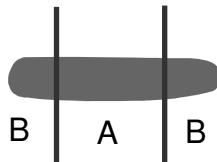


Abbildung 3.4.4-1 Schematische Darstellung des detektierten Bereiches (A) und der ausgelassenen Bereiche (B) der Probenflecken auf einer HPTLC-Platte

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von WinCats4-Software. Auf jede Platte wurden 4 Kalibrationswerte für die Erstellung einer Kalibrierfunktion aufgetragen. Die Wiederfindung des Lipids in den lyophilisierten Lipoplexen ergab sich aus dem Vergleichswert  $V$  der Verhältnisse von eingesetzten Standard- und Probenmengen ( $\text{St}_{\text{einges}}$ ,  $\text{Pr}_{\text{einges}}$ ), sowie von ermittelten Standard- und Probenmengen ( $\text{St}_{\text{erm}}$ ,  $\text{Pr}_{\text{erm}}$ ), siehe Gleichung 5.

$$V = \frac{St_{\text{einges}} / Pr_{\text{einges}}}{St_{\text{erm}} / Pr_{\text{erm}}} \quad \text{Gleichung 5}$$

$S_{\text{teinges}}$	eingesetzte Standardmenge [ $\mu\text{g}$ ]
$S_{\text{term}}$	ermittelte Standardmenge [ $\mu\text{g}$ ]
$Pr_{\text{einges}}$	eingesetzte Probenmenge [ $\mu\text{g}$ ]
$Pr_{\text{erm}}$	ermittelte Probenmenge [ $\mu\text{g}$ ]

Die Abweichung des Wertes  $V$  von 1 war ein Maß für die Wiederfindung des eingesetzten Lipids in den Lipoplexen.

#### 3.4.4.2. BARTLETT-ASSAY

Der Bartlett-Assay wurde mit phosphatfrei gespülten Gefäßen durchgeführt, da etwaige Phosphatreste das Ergebnis der Analyse verfälschen können. Zur Ermittlung des Gehaltes wurde eine Kalibrierfunktion mit verschiedenen Volumina einer 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Standardlösung erstellt. Die Probenmengen wurden eingewogen und so gewählt, dass die Phosphatkonzentrationen innerhalb der Kalibriergeraden lagen. Es wurden lyophilisierte Lipoplexe untersucht, die unterschiedlich aufgearbeitet wurden. Die Lyophilisate wurden einerseits in Millipore-Wasser bzw. NaAc-Puffer (pH 6,0), 0,1 % Zwittergent aufgenommen und direkt eingesetzt. In diesem Falle wurde nicht nur der Phosphor aus DOPE erfasst, sondern auch der Phosphor aus der DNA. Weiterhin wurden die Lyophilisate nach dem Bligh-Dyer-Verfahren extrahiert (siehe 3.2.1.3) und komplett in die Röhrchen überführt. In diesem Fall wurde nur der Phosphor aus dem Lipid erfasst.

Die Ansätze zur Kalibration und die Probenansätze wurden mit 500  $\mu\text{l}$  10 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  versetzt, kurz gevortext und dann auf 160 °C hochgeheizt und 3 h verascht. Alle Proben wurden in den kalten Trockenschrank gestellt. Dieser Schritt war notwendig, da die in großen Mengen in den Proben enthaltene Saccharose zu starkem Verspritzen führte, wenn die Proben in den heißen Schrank eingebracht wurden. Nach Hinzufügen von je 140  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung (30% v/v) wurden die Proben weitere 2 h bei gleicher Temperatur inkubiert. Anschließend wurden je 4,6 ml einer frisch hergestellten 0,22%igen (m/m) Ammoniummolybdat-Lösung und 200  $\mu\text{l}$  Fiske-Subbarow Reducer-Lösung (14,8% m/V), ebenfalls frisch hergestellt, zupipettiert. Die Gefäße wurden mit Murmeln abgedeckt und 10 min bei 95 °C im Heizblock erhitzt. Die Intensität der Farbreaktion wurde nach Abkühlung auf RT photometrisch bei 830

nm gegen den Leerwert ermittelt. Der Phosphatgehalt der Proben, der gleich dem Phospholipidgehalt in den Proben ist, wurde aus der ermittelten Kalibrierfunktion errechnet.

#### 3.4.4.3. FLUORESCAMIN-ASSAY

Primäre Amingruppen von Phospholipiden reagieren mit Fluorescamin (Floram<sup>®</sup>) unter Bildung eines fluoreszierenden Produktes. Über die Intensität der Fluoreszenz kann der DOPE-Gehalt bestimmt werden.

Da Fluorescamin Membranen nicht zu durchdringen vermag, mussten die Lipoplexe vor der Reaktion durch Zwittergent zerstört werden. Die Reaktionsbedingungen des Assays wurden bereits in vorangehenden Arbeiten untersucht (Wieland-Berghausen 1999; Momm 2004) und für diese Arbeit angepasst. Als Arbeitspuffer wurde 50 mM Boratpuffer pH 8,25 mit 0,1% Zwittergent verwendet. Die Konzentration der verwendeten Fluorescaminlösung betrug 1,2 mM Fluorescamin in wasserfreiem Aceton, die Arbeitskonzentration betrug 0,3 mM. Aufgrund der hydrolytischen Zersetzung von Fluorescamin durch Wasser und Alkohole wurde Aceton als Lösungsmittel verwendet. Die Messungen wurden im Lumineszenz-Spektrometer (Perkin-Elmer LS 50B) im „read“ Modus bei  $\lambda_{exc} = 480$  nm und  $\lambda_{em} = 392$  nm durchgeführt, die Spaltbreiten betragen 2,5 nm.

Zur Ermittlung der Linearität des Assays und des Gehaltes wurden Kalibrierfunktionen mit verschiedenen Volumina einer 1,54 mM DAC-30 bzw. DC-30-Dispersion (entspricht 0,94 mM DOPE) erstellt.

Für einen Teil der Untersuchungen wurden die genauen DOPE-Konzentrationen der Kalibrierlösungen mittels Bartlett-Assay bestimmt. Die lyophilisierten Lipoplexe wurden mit Millipore-Wasser redispergiert. Die DOPE-Endkonzentration war 8,8  $\mu$ M, das Probenendvolumen betrug 2 ml. Zur Herstellung sämtlicher Analysen wurde Boratpuffer pH 8,25 mit 0,1% Zwittergent vorgelegt und die Probe zupipettiert. Im Fall der redispergierten lyophilisierten Lipoplexe wurde die Probe 10 s gevortext und 15 min stehen lassen, um die Zerstörung des Komplexes und die Freisetzung des DOPE-Anteils zu bewirken. Anschließend wurde unter Vortexen die Fluorescaminlösung mit einer Multipette zupipettiert, die Lösung in eine Einmalküvette eingebracht und diese sofort in das Fluorimeter überführt. Die Messwerte wurde abgelesen, nachdem sich die Anzeige am Gerät stabilisiert hatte, spätestens jedoch nach 2 min.

### 3.4.5. DNA-QUANTIFIZIERUNG

#### 3.4.5.1. UV-MESSUNG

Zur UV-spektroskopischen Analyse (Ultrospec 1000) wurden die Lyophilisate mit NaAc-Puffer (pH 6,0), 0,1% Zwittergent aufgenommen und für mindestens 30 min stehen lassen um zu gewährleisten, dass die Komplexe vollständig zerstört wurden und keine Blasen mehr vorhanden waren. Es wurde eine völlig klare Lösung erhalten. Der Nullabgleich wurde mit einer Lösung aus 20 mM NaAc und 0,1 % Zwittergent in TRM durchgeführt. Aus der ermittelten Absorption wurde die DNA-Konzentration wie unter 3.3.3.3 beschrieben nach Gleichung 2 berechnet.

#### 3.4.5.2. PICOGREEN-ASSAY

Die Untersuchungen zur Quantifizierung der DNA mittels Pico Green-Assay wurden fluorimetrisch im „read“ Modus bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{exc} = 480$  nm und einer Emissionswellenlänge von  $\lambda_{em} = 520$  nm und 2,5 nm Spaltbreiten in Einwegmikroküvetten durchgeführt. Als Puffer wurde Tris-Puffer (pH 7,0) mit 0,26% Zwittergent (siehe 2.1.7) verwendet (Endkonzentration im Assay 0,1 % Zwittergent), um die Lipoplexe zu zerstören und die DNA für den Farbstoff zugänglich zu machen. Zur Herstellung der PicoGreen-Lösung wurde PicoGreen-Konzentrat nach Herstellerangaben mit TE-Puffer (pH 7,0) 1:20 verdünnt.

Zur Konzentrationsbestimmung wurden Kalibrationsgeraden aus verschiedenen Volumina einer 4  $\mu\text{g/ml}$  DNA-Lösung (1, 6, 4, 8, und 24  $\mu\text{l}$ ) erstellt. Die Herstellung der Kalibratoren und der Analysen erfolgte wie in Tabelle 3-2 beschrieben; das Probenendvolumen betrug 1000  $\mu\text{l}$ .

Standard-DNA bzw. Probe [ $\mu\text{l}$ ]	TRM [ $\mu\text{l}$ ]	2xTris [ $\mu\text{l}$ ]	Pico-Green-Lsg [ $\mu\text{l}$ ]
x	250-x	250	500

Tabelle 3-2 Schema zur Herstellen von Kalibratoren und Analysen für den PicoGreen-Assay

Nach der Zugabe von zwittergenthaltigem Tris-Puffer (pH 7,0) wurden die Proben 10 s gevortext und anschließend 10 min stehen lassen, um die Zerstörung der Komplexe zu gewährleisten. Danach wurde die PicoGreen-Lösung zupipettiert und die Proben genau 5 min im Dunkeln bis zur Messung inkubiert.

### **3.5. CHARAKTERISIERUNG DER LYOPHILISATE**

#### **3.5.1. ERMITTLUNG DER MORPHOLOGIE DURCH RASTER-ELEKTRONENMIKROSKOPIE (REM)**

Die REM-Untersuchungen (Zeiss DSM 960) der Lyophilisate wurden im Vakuum durchgeführt, die Beschleunigungsspannung betrug 15 kV. Die Proben wurden zuvor in einem Mörser leicht zerstoßen und anschließend mit Gold bedampft (2 min bei 20 mA, 15-20 nm Schichtdicke) um die Oberfläche leitfähig zu machen.

#### **3.5.2. ERMITTLUNG DER RESTFEUCHTE DURCH KARL-FISCHER-TITRATION**

Die Restfeuchte der Lyophilisate wurde mittels Karl-Fischer-Titration nach Methode A, Ph. Eur. 2.5.12, mit dem Karl-Fischer-Automat, bestehend aus KFS-Titrino 720 und Ti-Stand 703 der Firma Metrohm, Herisau, durchgeführt. Zu Beginn der Messreihen wurde der Titer der Maßlösung (Hydranal<sup>®</sup> Titrant, methanolische Jodlösung mit einem exakt eingestellten Titer von  $5,00 \pm 0,02$  mg H<sub>2</sub>O/ml) bestimmt. Die Proben wurden geöffnet und für verschieden lange Zeiträume im Raum stehen gelassen. Anschließend wurden die Proben aus den Vials entnommen und in das Titrationsgefäß überführt, in welchem Hydranal<sup>®</sup> Solvent (vorgetrocknete Lösung mit maximal 0,005% Wasser, die Schwefeldioxid und geruchloses Amin, in MeOH gelöst, enthält) vorgelegt wurde. Über Rückwägung wurde die exakt überführte Masse ermittelt. Die Titration wurde sofort gestartet. Aus dem ermittelten Titer und dem Verbrauch an Maßlösung wurde der Restfeuchtegehalt ermittelt.

## **4. Ergebnisse und Diskussion**

### **4.1. METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG UND ANALYTIK LYOPHILISierter DC-30- UND DAC-30/DNA-LIPOPLEXE**

In vorausgehenden Arbeiten war das liposomale Transfektionsreagenz DAC-30 aus einer Reihe weiterer kationischer Transfektionsreagenzien als das am besten geeignete bezüglich Effizienz und Auswirkung auf die Zellviabilität zur Transfektion von humanen Aorta-Endothel und glatten Muskelzellen ermittelt worden (Kiefer et al. 2004).

Mit diesem Transfektionsreagenz als liposomaler Ausgangskomponente und einem GFP-exprimierendem Plasmid war ein kontinuierliches Verfahren zur Herstellung von Gentransfersystemen mit anschließender Lyophilisation entwickelt und hinsichtlich der Herstellungsparameter optimiert worden, um eine Produktion von Lipoplexen in großem Maßstab mit verlängerter Lagerzeit zu ermöglichen (Clement et al. 2005).

Ausgehend von diesen Grundlagen war es das Ziel dieser Arbeit, Methoden zur eingehenderen Charakterisierung von Lipoplexen zu erstellen, die es ermöglichen sollten, die biologischen und physikochemischen Eigenschaften der lyophilisierten Lipoplexe, sowie die Produkteigenschaften nach der Herstellung hinsichtlich der Ausgangskomponenten Lipid und DNA genauer zu untersuchen und einzuordnen. Die Methodenentwicklung erfolgte hauptsächlich ausgehend von Lipoplexen, die in kleinem Maßstab durch Pipettieren hergestellt wurden und wurde dann für die lyophilisierten Lipoplexe angepasst.

Vergleichend wurde zur Herstellung der Lipoplexe für die Untersuchungen neben DAC-30 das strukturähnliche liposomale Transfektionsreagenz DC-30 eingesetzt (Abbildung 1.2.1-2). Die Methoden zur Untersuchung der biologischen Aktivität umfassten die Ermittlung der Transfektionseffizienz sowie die Auswirkungen der Gentransfersysteme auf die Zellvitalität. Weiterhin wurden Struktur, Partikelgröße und -ladung, sowie die Stabilität der Lipoplexe untersucht. Schließlich wurde der Gehalt an Lipid und DNA der Lipoplexe auf verschiedene Arten ermittelt.

Im folgenden Teil werden die Ergebnisse der Methoden vorgestellt.

#### 4.1.1. TRANSFEKTIONSEFFIZIENZ UND ZYTOTOXIZITÄT

Ein wichtiges Charakterisierungsmerkmal von Lipoplexen ist deren Vermögen, DNA in Zellen einzubringen, damit diese in das Genom der Zelle eingebaut und zur Expression gebracht wird. Zahlreiche Untersuchungen befassen sich mit der Erfassung der Transfektionseffizienz von Lipoplexen aus unterschiedlichen Lipid- und DNA-Komponenten in verschiedenen Zellarten (Zelllinien, menschliche Primärzellen) und unter verschiedenen Bedingungen (Transfektion in serumfreiem oder serumhaltigem Medium). Selten wird jedoch zusätzlich auf den Einfluss der Transfektion auf die Vitalität der Zellen eingegangen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung der Transfektion von A-10 SMC mit pipettierten Lipoplexen sowie mit redispergierten lyophilisierten Lipoplexen aus DAC-30 bzw. DC-30 und einem GFP-exprimierenden Plasmid durchflusszytometrisch untersucht, was die Kombination der Ermittlung von Transfektionseffizienz und Zytotoxizität erlaubte. Vergleichend wurde der CellTiter-Glo™ Test (CTG-Test) zur getrennten Erfassung der Zellviabilität durchgeführt.

##### 4.1.1.1. ERMITTLUNG DER TRANSFEKTIONSEFFIZIENZ UND ZYTOTOXIZITÄT MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die Durchflusszytometrie erlaubt die simultane Erfassung von Transfektionseffizienz und Zytotoxizität in einem Ablauf. Hierbei werden die durch die Transfektion abgestorbenen Zellen erfasst. Für die Markierung der toten Zellen wurde der Fluoreszenzfarbstoff 7-AAD verwendet, der in die DNA von abgestorbenen Zellen aufgrund der erhöhten Membranpermeabilität toter Zellen interkalieren kann.

##### 4.1.1.1.1. EINFLUSS UNTERSCHIEDLICHER LIPID/PLASMID VERHÄLTNISSE (W/W)

Die kombinierte Erfassung der Transfektionseffizienz und der Zytotoxizität von DAC-30- und DC-30-haltigen Lipoplexen in verschiedenen Masseverhältnissen Lipid/DNA (w/w) ( $c_{DNA} = 2 \mu\text{g/ml}$ , Lipidkonzentrationen wurden entsprechend angepasst) erbrachte übereinstimmende Ergebnisse mit vorausgehenden Arbeiten bezüglich der Transfektionseffizienz (Kiefer 2003). Die Effizienz der DC-30-haltigen Lipoplexe nahm bei steigenden Lipid/DNA Verhältnis zu, wohingegen bei den DAC-30-haltigen Lipoplexen nur ein deutlicher Anstieg vom Verhältnis 2:1 zu 4:1 (w/w) zu verzeichnen war (siehe Abbildung 4.1.1-1). Die Anzahl toter Zellen war nach Transfektion mit DC-



30-haltigen Lipoplexen insgesamt etwas geringer, es war kein Anstieg mit zunehmendem Verhältnis (w/w) zu erkennen. Besonders von 5:1 zu 10:1 Verhältnis mit DAC-30-haltigen Lipoplexen war jedoch ein deutlicher Anstieg der Toxizität zu verzeichnen.

Auffällig ist, dass trotz gleicher Herstellungsart und gleichen äußeren Bedingungen die Transfektionseffizienz der DAC-30-haltigen Lipoplexe wesentlich höher war, als die der DC-30-haltigen Lipoplexe. Lediglich im höchsten Verhältnis (10:1) glichen sich die Transfektionsresultate an, hier wiesen die DC-30-haltigen Lipoplexe jedoch eine wesentlich niedrigere Toxizität auf.

Obwohl die Transfektionsreagenzien DAC-30 und DC-30 in gleichen Verhältnissen DOPE und ein kationisches Cholesterolderivat enthalten, welches sich lediglich in der Stellung einer Methylgruppe unterscheidet (siehe Abbildung 1.2.1-2), scheint sich dieser Unterschied aber deutlich auf die biologische Aktivität der Lipoplexe auszuwirken.

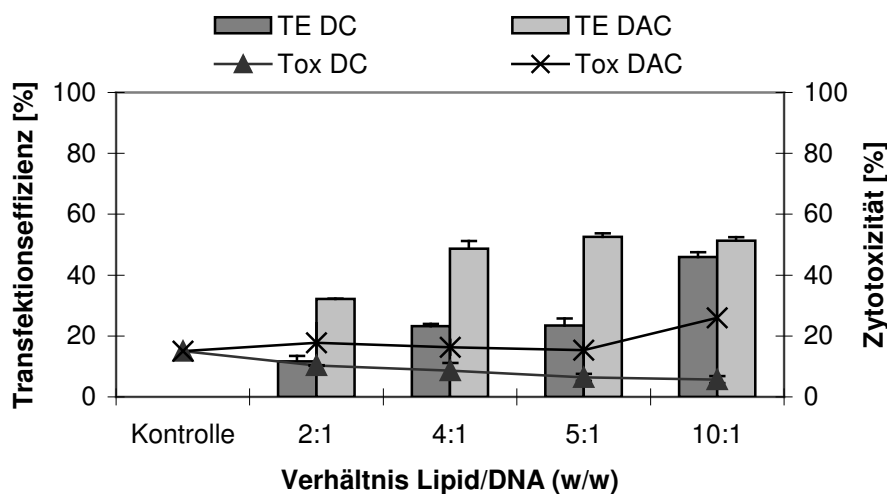


Abbildung 4.1.1-1 Durchflusszytometrische Erfassung der Transfektionseffizienz (TE) und Toxizität (Tox) von Lipoplexen aus DAC-30 (DAC) bzw. DC-30 (DC) und GFP-exprimierendem Plasmid in verschiedenen Verhältnissen (w/w) (2:1, 4:1, 5:1 und 10:1;  $c_{DNA} = 2\mu\text{g/ml/6-Well}$ ) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen

#### 4.1.1.1.2. EINFLUSS ZUNEHMENDER LIPID- UND PLASMIDMENGEN

Zur gleichzeitigen Bestimmung der Auswirkungen zunehmender Lipid- und Plasmidmengen auf Transfektionseffizienz und Zytotoxizität wurde eine Titration mit aufsteigenden Volumina (0,8; 1,0; 1,5; 2,0 ml) redispergierter lyophilisierter Lipoplexe

aus DAC-30 und GFP-exprimierendem Plasmid im Verhältnis 5:1 (w/w) ( $c_{\text{DNA}} = 2 \mu\text{g/ml}$ ,  $c_{\text{Lipid}} = 10 \mu\text{g/ml}$ ) durchgeführt (siehe Abbildung 4.1.1-2). Die Transfektionseffizienz stieg von 50% transfizierten Zellen mit  $1 \mu\text{g}$  Plasmid und entsprechend  $5 \mu\text{g}$  Lipid/6-Well auf eine Effizienz von etwa 70% mit  $4 \mu\text{g}$  Plasmid und  $20 \mu\text{g}$  Lipid/well. Die Toxizität hingegen blieb annähernd gleich bzw. nahm sogar leicht ab.

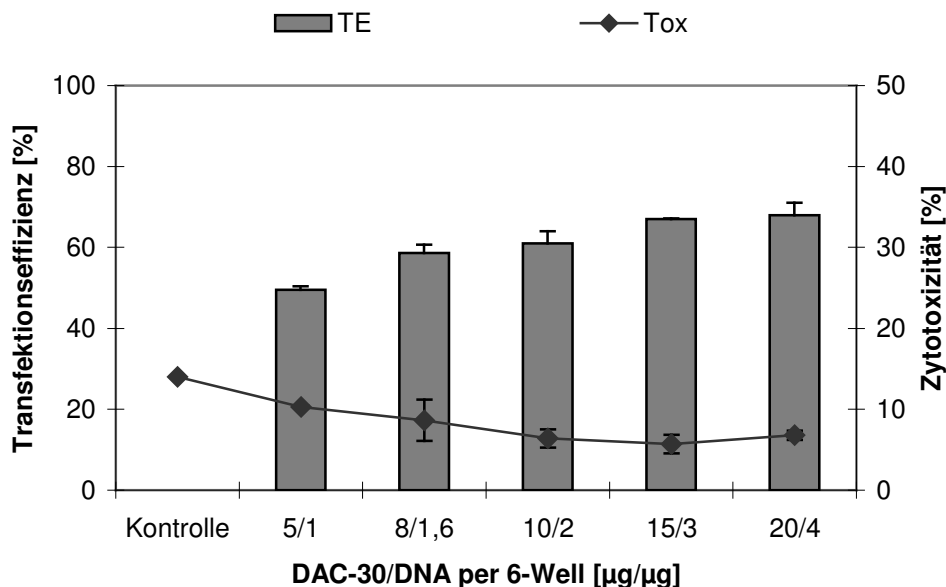


Abbildung 4.1.1-2 Durchflusszytometrische Erfassung der Effizienz (TE) und Toxizität (Tox) von zunehmenden Lipoplexkonzentrationen des gleichen Verhältnisses (DAC-30/DNA 5:1 (w/w)) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen

#### 4.1.1.2. ERMITTLUNG DER ZELLVIABILITÄT MITTELS CTG-TEST

Mit Hilfe des CellTiter-Glow-Test wurde derjenige Anteil der Zellen erfasst und quantifiziert, der nach Ablauf der Transfektion noch metabolisch aktiv war.

##### 4.1.1.2.1. EINFLUSS VON LIPOPLEXEN MIT UNTERSCHIEDLICHEN MASSE-VERHÄLTNISSEN

Aufgrund der unterschiedlichen Transfektionseffizienzen, die mit Lipoplexen mit verschiedenen DC-30 bzw. DAC-30 /DNA-Verhältnissen (w/w) (2:1, 4:1, 5:1, 10:1) in vorausgehenden Arbeiten erreicht wurden (Kiefer 2003), sollte untersucht werden, ob die unterschiedlichen Präparationen auch eine Auswirkung auf die resultierende Zellviabilität nach erfolgter Transfektion ausübten.

Transfizierte Zellen wurden mit nichtbehandelten Kontrollzellen verglichen, die gleich 100% gesetzt wurden. Die Behandlung der Zellen mit dem reinen Plasmid zeigte keine Auswirkung, wohingegen verschiedene Mengen reiner DAC-30-Liposomen zu einer Abnahme der metabolisch aktiven Zellen um ca. 15 bis 20% führte (Daten nicht gezeigt).

Bezüglich der Viabilität nach erfolgter Transfektion konnte festgestellt werden, dass mit DC-30-haltigen Lipoplexen verschiedener Masseverhältnisse nur eine sehr geringe bis gleichbleibende Abnahme der Zellviabilität, nicht unter 80% metabolisch aktive Zellen zu verzeichnen war. Die Ergebnisse nach Transfektion mit DAC-30-haltigen Lipoplexen in den Verhältnissen 2:1, 4:1 und 5:1 (w/w) sahen ähnlich aus, allerdings resultierte mit dem 10:1 Verhältnis eine deutliche Abnahme auf 60% lebensfähige Zellen (siehe Abbildung 4.1.1-3). Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass eine erhöhte Transfektionsrate zwar zu einer Zunahme der Toxizität führte. Der Anstieg der Toxizität fiel jedoch im Vergleich zum Anstieg der Effizienz nur relativ gering aus (siehe auch Abbildung 4.1.1-1).

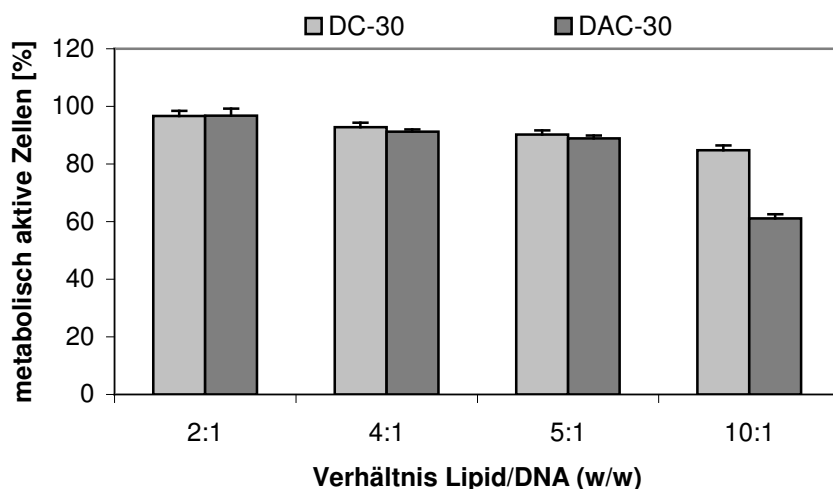


Abbildung 4.1.1-3 Auswirkung der Transfektion mit Lipoplexen aus DAC-30 und DC-30 und GFP-exprimierendem Plasmid in verschiedenen Masseverhältnissen Lipid/DNA (w/w) auf die Zellviabilität,  $c_{DNA} = 2 \mu\text{g}/6\text{-Well}$

#### 4.1.1.2.2. EINFLUSS ZUNEHMENDER LIPID- UND PLASMI DMENGEN

Die Auswirkung zunehmender Lipid- und Plasmidmengen auf die Vitalität der Zellen wurde mittels einer Titration mit aufsteigenden Mengen redispergierter lyophilisierter Lipoplexe durchgeführt. Es wurde eine Charge mit DAC-30 und GFP-exprimierendem Plasmid im Verhältnis 5:1 (w/w) verwendet. Bei gleichbleibendem

Verhältnis von Lipid zu Plasmid wurden zunehmende Mengen an Lipoplex auf die Zellen aufgegeben (0,8, 1,0, 1,5, 2,0 ml einer Lipoplexdispersion,  $c_{\text{DNA}} = 2 \mu\text{g/ml}$  und  $c_{\text{Lipid}} = 10 \mu\text{g/ml}$ ).

Die Vitalität der A-10 SMC nach erfolgter Transfektion lag zwischen 80 und 90%, eine Beeinflussung durch die ansteigenden Aggregat-Konzentrationen war nicht erkennbar (siehe Abbildung 4.1.1-4). Eine Zunahme der Toxizität schien demnach eher durch ein zunehmendes Masse- und demnach auch Ladungsverhältnis (siehe Abbildung 4.1.1-2), als durch zunehmende Mengen Lipoplex des gleichen Masseverhältnisses bedingt zu sein.

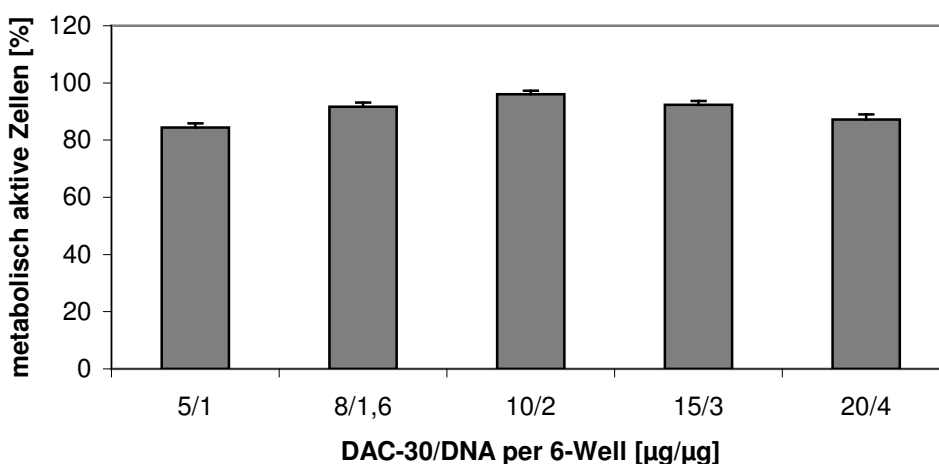


Abbildung 4.1.1-4 Ermittlung der Auswirkung zunehmender Aggregatkonzentrationen bei gleichbleibendem Verhältnis (DAC-30/DNA 5:1 (w/w))

#### 4.1.1.3. VERGLEICH DER METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER TOXIZITÄT

Direkt ließen sich die Methoden zur Bestimmung der Toxizität nicht vergleichen, da mit dem CTG die metabolisch aktiven ermittelt wurden, wohingegen der Fluoreszenzfarbstoff 7-AAD in der durchflusszytometrischen Analyse die toten Zellen markierte. Jedoch konnte durch Ermittlung der Zu- oder Abnahme der Viabilität bzw. Toxizität auf das entsprechend andere geschlossen werden. In Abbildung 4.1.1-5 wurde die prozentuale Viabilität bzw. Toxizität, welche durch die Transfektion mit pipettierten Lipoplexen aus DAC-30 und DC-30 und GFP-exprimierendem Plasmid in verschiedenen Verhältnissen (w/w) ( $c_{\text{DNA}} = 2 \mu\text{g/ml/6-Well}$ ) hervorgerufen wurde, dargestellt. Eine Korrelation zwischen der Viabilität und der Toxizität ist erkennbar. Die Bereiche der Viabilitäts- und Toxizitätswerte von ca. 80 bzw. 10%, die mit DC-30 haltigen Lipoplexen erzielt wurden, änderten sich mit den verschiedenen

Verhältnissen kaum. Mit den DAC-30-haltigen Lipoplexen war im Verhältnis 10:1 (w/w) ein deutlicher Abfall der prozentualen Viabilität, sowie ein etwas weniger signifikanter Anstieg der prozentualen Toxizität zu erkennen.

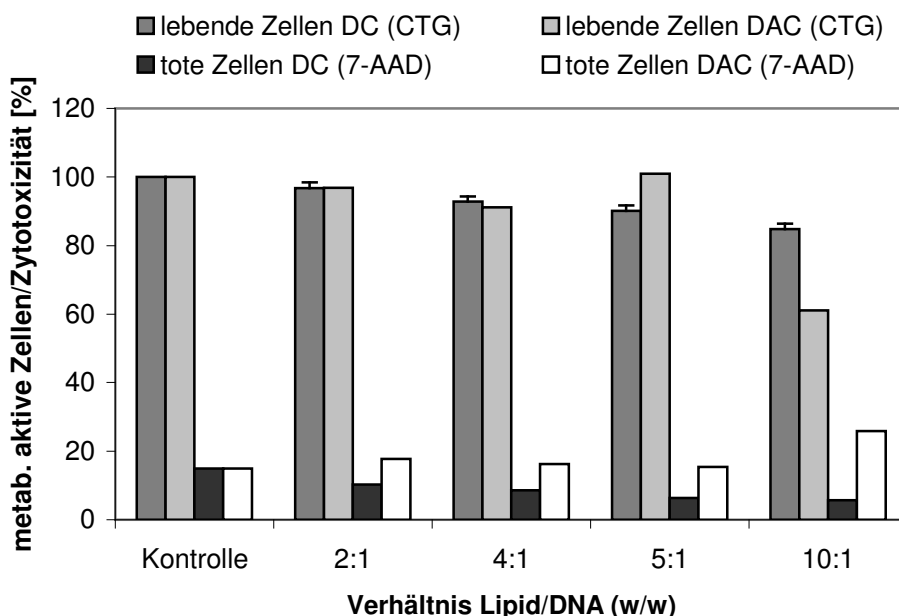


Abbildung 4.1.1-5 Einfluss der Transfektion mit Lipoplexen verschiedener Verhältnisse bestehend aus DAC-30 bzw. DC-30/DNA (w/w) ( $c_{DNA} = 2 \mu\text{g/ml/6-Well}$ ) auf die Zellvitalität im Vergleich zu nicht behandelten Kontrollzellen, Vergleich der metabolisch aktiven (CTG) und toten Zellen (Durchflusszytometrie, 7-AAD)

Ähnliche Ergebnisse erbrachte der Vergleich der Ergebnisse der Auswirkung aufsteigender redispergierter lyophilisierter Lipoplexmengen des gleichen Verhältnisses DAC-30/DNA 5:1 (w/w) mit beiden Methoden. Auch hier korrelierte eine hohe Zellviabilität mit niedriger Toxizität (siehe Abbildung 4.1.1-6).

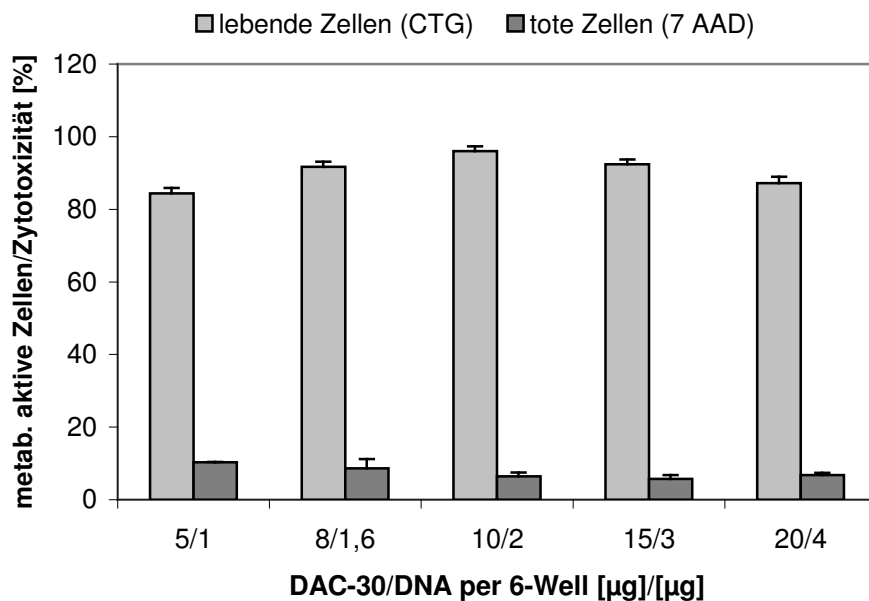


Abbildung 4.1.1-6 Einfluss der Transfektion mit aufsteigenden redispergierten lyophilisierten Lipoplexmengen des gleichen Verhältnisses DAC-30/DNA 5:1 (w/w) auf die Zellvitalität, Vergleich der metabolisch aktiven (CTG) und toten Zellen (Durchflusszytometrie, 7-AAD)

Die Verfahren zur Bestimmung der Auswirkung der Transfektionseffizienz auf die Zellvitalität scheinen bezüglich der Genauigkeit der Ergebnisse gleichermaßen geeignet zu sein. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass mit den beiden Verfahren unterschiedliche Faktoren erfasst werden. Mittels CTG-Test werden die metabolisch aktiven Zellen erfasst, mit der durchflusszytometrischen Analyse hingegen die toten Zellen. Sollen sowohl die Transfektionseffizienz, als auch die Zellvitalität bestimmt werden, so ist die Kombination im durchflusszytometrischen Verfahren wesentlich weniger aufwendig und kostengünstiger, da zur Durchführung des CTG-Testes alle Transfektionsexperimente doppelt gemacht werden müssen.

## 4.1.2. PARTIKELGRÖSSE UND STRUKTUR

### 4.1.2.1. PCS

#### 4.1.2.1.1. EINFLUSS DES LADUNGSVERHÄLTNISSES AUF DIE GRÖSSE

Eine homogene und stabile Partikelgröße ist Voraussetzung für die Herstellung reproduzierbarer Lipoplex-Formulierungen. Lipoplexdispersionen wiesen eine eher uneinheitliche Größenverteilung auf, dennoch ist die Bestimmung der

durchschnittlichen Partikelgröße durch PCS ein gängiges Verfahren zur Charakterisierung einer Lipoplexdispersion hinsichtlich Homogenität und Stabilität. Zur Untersuchung des Einflusses des Ladungsverhältnisses auf die Partikelgröße wurden die durchschnittlichen Größen von in kleinem Maßstab durch Pipettieren hergestellten Lipoplexen mit DC-30 und GFP-exprimierendem Plasmid mit den Ladungsverhältnissen von 0,2 – 9,8 (+/-) (entsprechend der Ladungsverhältnisse von 1:1 – 50:1 (w/w),  $c_{\text{DNA}} = 0,025 \text{ mg/ml}$ ) untersucht. Wie in Abbildung 4.1.2-1 zu erkennen, lagen die Größen in den Bereichen von 580-950 nm. Die Größen nahmen bis zu einem Minimum von 580 nm bei dem Ladungsverhältnis 4 (+/-) leicht ab. Lipoplexe mit deutlichem Überschuss an kationischem Lipid wiesen einen signifikanten Größenzuwachs auf. Die im Diagramm dargestellten Messwerte sind Mittelwerte, die aus mehreren Proben erhalten wurden. Die mittleren Durchmesser der untersuchten Proben wichen nur wenig voneinander ab, wodurch die vergleichsweise geringen Standardabweichungen zustande kamen. Die aus den Einzelmessungen erhaltenen Polydispersitätsindices im Bereich von 0,3 für alle Messungen (nicht dargestellt) wiesen allerdings auf eine relativ inhomogene Partikelgrößenverteilung innerhalb einer Probe hin.

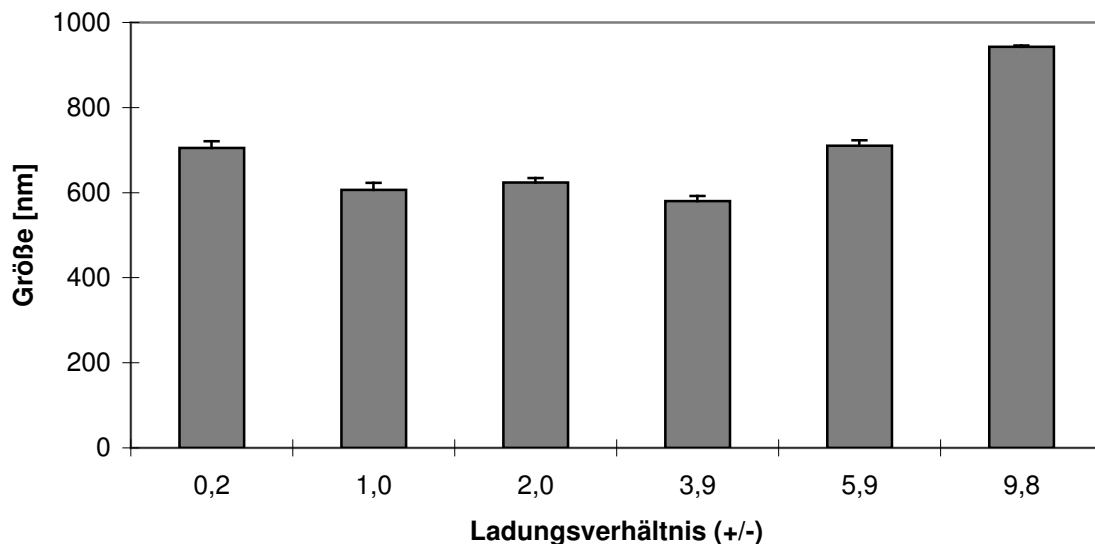


Abbildung 4.1.2-1 Größen von in kleinem Maßstab hergestellten Lipoplexen aus DC-30 und GFP-exprimierendem Plasmid in unterschiedlichen Ladungsverhältnissen (+/-),  $c_{\text{DNA}} = 0,025 \text{ mg/ml}$

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Angaben aus der Literatur, in denen ermittelt wurde, dass die Größe von Lipoplexen bis zu einem Ladungsverhältnis von 1:1 (+/-) deutlich zunimmt und mit höheren Ladungsverhältnissen wieder signifikant abnimmt (Wasan et al. 1999; Almofti et al. 2003b). Das Größenmaximum bei berechnetem Ladungsausgleich wird durch die erhöhte Tendenz zur Fusion der Lipoplexe mit neutraler Oberflächenladung durch fehlende abstoßende Kräfte erklärt. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings festgestellt, dass die in TRM hergestellten Lipoplexe aus DC-30 und dem GFP-exprimierenden Plasmid bei einem berechneten Ladungsausgleich keineswegs ein neutrales, sondern ein deutlich negatives Zetapotential aufwiesen. Trotz berechnetem Ladungsausgleich waren also Ladungen vorhanden, die zu einer Abstoßung der Partikel und somit zur Verhinderung des Größenzuwachses führen konnten. Bei einem Ladungsverhältnis von 4:1 (+/-) wurde die geringste Lipoplexgröße bei einem Zetapotential von etwa 0 festgestellt (siehe Abbildung 4.1.2-2).

Dies ist erklärbar durch den Mechanismus der Zetapotentialmessung, welches an der Scherebene und nicht direkt an der Oberfläche der Partikel gemessen wird. Durch adsorbierte Ionen oder DNA kann es demnach trotz berechnetem Ladungsausgleich zu dem Erhalt eines negativen Zetapotentials kommen bzw. ist das berechnete Ladungsverhältnis keine ausschlaggebende Größe für das Zetapotential oder die Partikelgröße. Die Tatsache, dass zwischen Größe und Zetapotential der Lipoplexe in den verschiedenen Ladungsverhältnissen keine direkte Korrelation gezeigt werden konnte, bestätigt diese Annahme. Weiterhin werden Zetapotential und Oberflächenladung im Abschnitt 4.1.3 ausführlicher diskutiert.



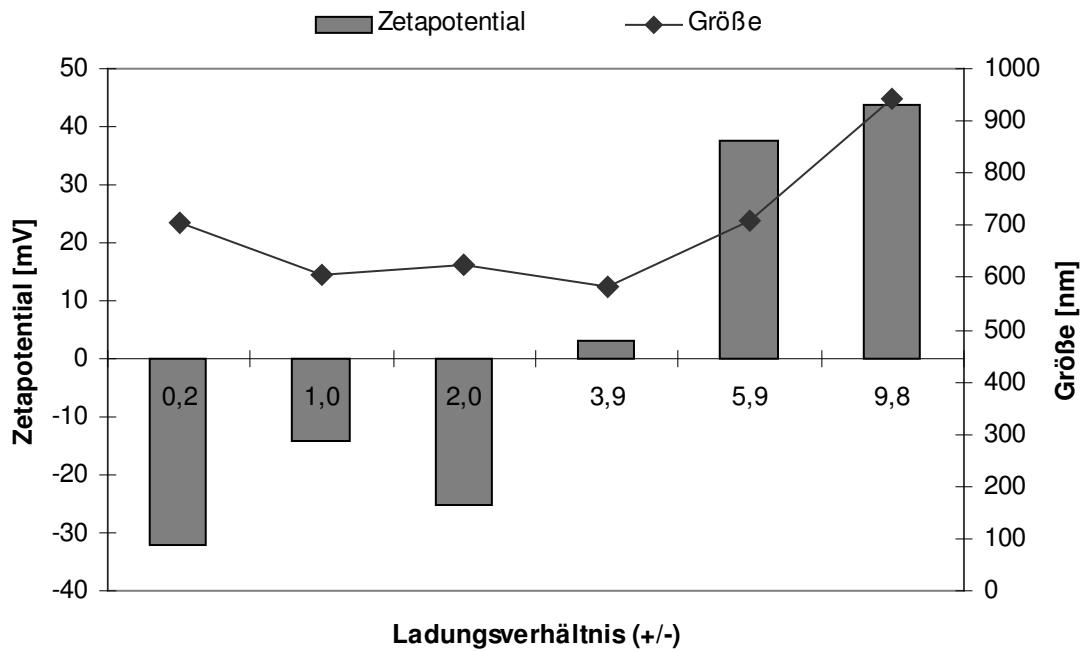


Abbildung 4.1.2-2 Vergleich von Größe und Zetapotential von Lipoplexen aus DC-30 und GFP-exprimierendem Plasmid in verschiedenen Ladungsverhältnissen (+/-)

#### 4.1.2.1.2. EINFLUSS DES HERSTELLUNGSVERFAHRENS

Um den Einfluss der Lagerzeit auf die Größenentwicklung von Partikeln in Liposomen- und Lipoplexdispersionen zu untersuchen, wurden extrudierte DAC-30-Liposomen (1 x 800 nm), sowie Lipoplexe aus extrudiertem DAC-30 und GFP-exprimierendem Plasmid im Verhältnis Lipid/DNA 5:1 (w/w) untersucht. Die Lipoplexe wurden einerseits in kleinem Maßstab durch Pipettieren, sowie im kontinuierlichen Verfahren produziert. Die Analytik erfolgte initial nach der Herstellung bzw. Redispergierung, nach 8 und nach 24 h. Abbildung 4.1.2-3 zeigt sehr deutlich den Unterschied zwischen den in verschiedenen Verfahren hergestellten Lipoplexen. Während die Größen der kontinuierlich hergestellten Lipoplexe sowohl vor der Lyophilisation als auch nach der Redispergierung der lyophilisierten Lipoplexe über einen Zeitraum von 24 h stabil blieben, nahm die Größe der durch Pipettieren hergestellten Lipoplexe deutlich zu. Die extrudierte (1 x 800 nm) reine Liposomendispersion wies eine stabile Größe über den untersuchten Zeitraum hinweg auf. Es zeigte sich also, dass das Herstellungsverfahren einen deutlichen Einfluss auf die Homogenität und Stabilität der Lipoplexe ausübte.

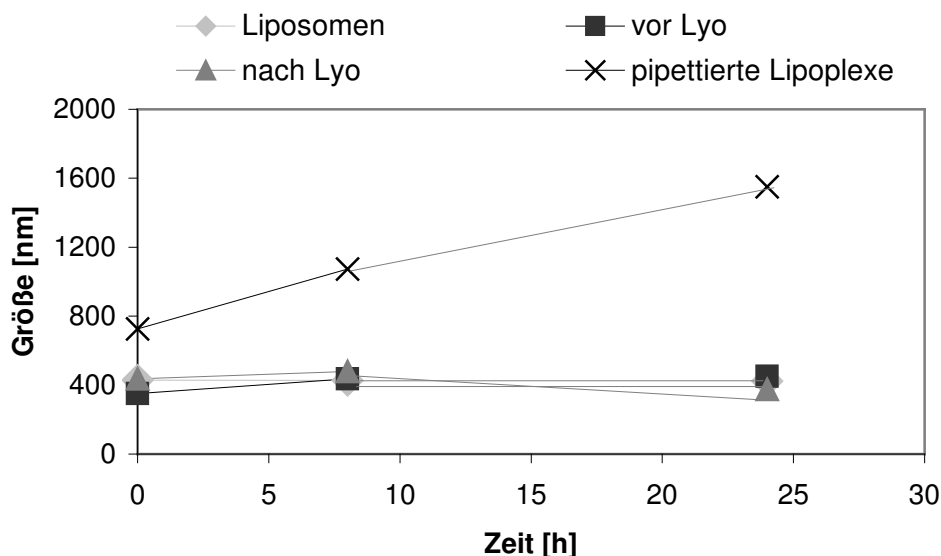


Abbildung 4.1.2-3 Größentwicklung von Liposomen und Lipoplexen innerhalb von 24 h Inkubation bei RT; extrudierte Liposomen (1x800 nm), kontinuierlich hergestellte Lipoplexe aus extrudierten Liposomen vor und nach Lyophilisation, in kleinem Maßstab durch Pipettieren hergestellte Lipoplexe mit unextrudiertem Lipid

#### 4.1.2.2. CRYO-TEM

Neben der PCS-Messung wurde die Cryo-TEM eingesetzt, um Informationen über die Größe und zusätzlich über die Morphologie von extrudierten Liposomen, von Lipoplexen, die im kleinen Maßstab durch Pipettieren hergestellt wurden, sowie von redispergierten lyophilisierten Lipoplexen zu erhalten.

Abbildung 4.1.2-4 zeigt die Aufnahme einer DAC-30 Dispersion ( $c = 1 \text{ mg/ml}$ ), die in TRM aufgenommen und einmal durch eine 800 nm Polycarbonatmembran extrudiert wurde. Es sind liposomale Strukturen zu erkennen, die Größenverteilung ist relativ uneinheitlich. Die geringfügige Abweichung von der üblichen runden Liposomenform könnte durch Verdunstung von Wasser des für die Aufnahme präparierten Filmes zustande kommen.

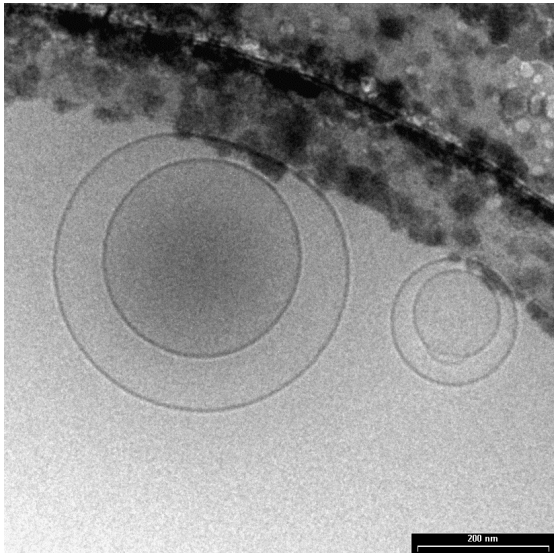


Abbildung 4.1.2-4 extrudierte DAC-30-Liposomen (1 x 800nm),  $c_{\text{DAC}} = 2,5 \text{ mg/ml}$ , Balken entspricht 200 nm

Die Struktur der Lipoplexe wurde durch die Herstellungstechnik nicht deutlich beeinflusst. Die Präparation der pipettierten Lipoplexe (DAC-30/DNA 5:1 (w/w), 250  $\mu\text{g/ml}$  Lipid, Abbildung 4.1.2-5) wies die gleichen multilamellaren Strukturen auf, wie die kontinuierlich im großen Maßstab hergestellten Lipoplexe (DAC-30/DNA 5:1, (w/w), 250  $\mu\text{g/ml}$  Lipid, hergestellt von Karin Kiefer wie in 3.1.2 beschrieben, Abbildung 4.1.2-6). Diese Strukturen, welche bereits in anderen Arbeiten beschrieben wurden (Gustafsson 1995; Huebner 1999; Schmutz et al. 1999; Wiethoff et al. 2002), werden aufgrund ihres Aussehens auch als „Fingerprint“ bezeichnet. Das lamellenartige Aussehen ergibt sich durch alternierend angeordnete Schichten von Lipid und DNA. Die DNA-Schichten haben eine wesentlich höhere Material- und damit Elektronendichte als die Lipidschichten und weisen so eine höhere Empfindlichkeit gegen den Elektronenstrahl des Mikroskops auf (Schmutz et al. 1999). Dies wird deutlich in der wesentlich dunkleren Erscheinung auf den Aufnahmen. Es zeigte sich also anhand dieser Untersuchungen, dass die Struktur der Lipoplexe im scale-up Prozess erhalten bleibt. Ebenso konnte die mit PCS gemessene Partikelgröße der redispergierten lyophilisierten Lipoplexe bestätigt werden.

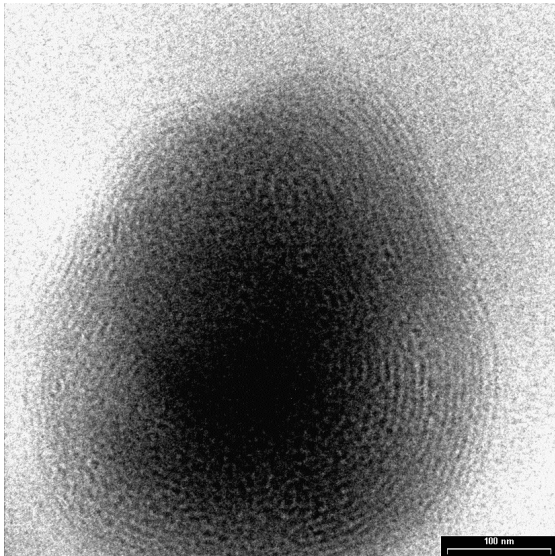


Abbildung 4.1.2-5 In kleinem Maßstab hergestellte DAC-30-haltige Lipoplexe, Lipid/DNA 5:1 (w/w),  $c_{\text{DAC}} = 0,25$  mg/ml, Balken entspricht 100 nm

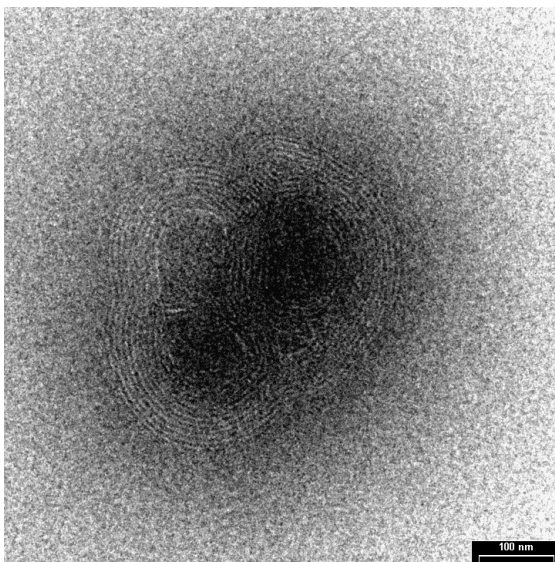


Abbildung 4.1.2-6 In großem Maßstab hergestellte redispergierte lyophilisierte DAC-30-haltige Lipoplexe, Lipid/DNA 5:1 (w/w),  $c_{\text{DAC}} = 0,25$  mg/ml, Balken entspricht 100 nm

#### 4.1.2.3. FLUORESZENZMESSUNG VON DNA DURCH AUSSCHLUSS UND VERDRÄNGUNG AUS LIPOPLEXEN

Der kationische Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) lagert sich in AT-reiche Sequenzen der DNA-Helix ein. Diese Eigenschaft wurde ausgenutzt um herauszufinden, ob die Komplexbildung von DNA mit kationischen Lipiden in unterschiedlichen Lipid/DNA-Verhältnissen (w/w) einen Einfluss auf die Zugänglichkeit der DNA hat. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob

Ausschluss oder Verdrängung von DAPI aus der Bindung mit der DNA sich unterschiedlich auf den Assay auswirkte. Dazu wurde DAPI einerseits zu bereits gebildeten DC-30-haltigen Lipoplexen verschiedener Ladungsverhältnisse (+/-) hinzugegeben (Ausschluss), sowie vor der Bildung der Lipoplexe mit der DNA gemischt (Verdrängung). Die Plasmidkonzentration der Lipoplexe betrug 10 µg/ml, die Lipidmengen wurden entsprechend angepasst.

In Abbildung 4.1.2-7 ist zu erkennen, dass die Ergebnisse der beiden Verfahren sich praktisch nicht voneinander unterschieden haben. Die Zugänglichkeit der DNA wurde also durch die zunehmende Komplexierung mit kationischem Lipid in höheren Ladungsverhältnissen durch beide Verfahren gleichermaßen erniedrigt.

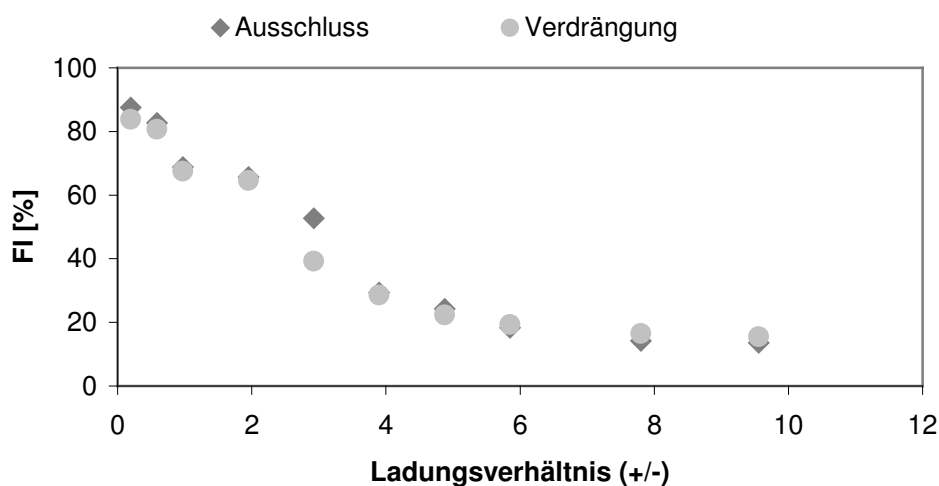


Abbildung 4.1.2-7 Ausschluss bzw. Verdrängung von DAPI aus Lipoplexen bestehend aus DC-30 und GFP-exprimierendem Plasmid in verschiedenen Ladungsverhältnissen (+/-)

Dies stimmt überein mit den Erkenntnissen von Geall und Blagbrough, die ebenfalls keinen Unterschied zwischen Ausschluss- und Verdrängungsmethode mit EtBr als Farbstoff feststellen konnten (Geall und Blagbrough 2000). Bis zu einer Sättigungserscheinung in sehr hohen Ladungsverhältnissen (ab 5:1 (+/-)) ist eine annähernd lineare Abnahme der Fluoreszenz zu verzeichnen. Ein möglicher Grund für die unvollständige Bindung des Farbstoffes ist die Anwesenheit von DOPE, welches in Untersuchungen von Wiethoff zu einer Abnahme der Verdrängung von DAPI im Vergleich zur reinen kationischen Lipidkomponente führte. Begründet wurde dies durch die somit erzeugte erniedrigte Ladungsdichte (Wiethoff et al. 2003).

Der fast identische Verlauf der Ausschluss- und Verdängungskurven lässt darauf schließen, dass die Bindung des kationischen Lipids an die DNA bei beiden Methoden ausgeprägter ist als die des Farbstoffes. In der Literatur wird weiterhin die Abnahme der DNA-Flexibilität neben der Konkurrenz um Bindungsstellen als möglicher Grund für die Abnahme der Interkalationsfähigkeit des Farbstoffes diskutiert (Geall und Blagbrough 2000; Wiethoff et al. 2003).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der pipettierten Lipoplexe im Verhältnis 5:1 (w/w) wurde auch mit redispergierten lyophilisierten Lipoplexen im Ausschlussverfahren ( $c_{DNA}$  im Assay 10 µg/ml) eine relative Fluoreszenz von ca. 76% erhalten (Daten nicht gezeigt). Dies bezeugt, dass die Lipoplexe durch die Herstellung im großen Maßstab mit anschließender Lyophilisation die Eigenschaften bezüglich der Assoziation von kationischem Lipid mit der DNA beibehalten.

#### 4.1.2.4. AGAROSEGEL-ELEKTROPHORESE

##### 4.1.2.4.1. LIPOPLEXE MIT VERSCHIEDENEN VERHÄLTNISSEN

Die Agarosegel-Elektrophorese ist ein weithin verwendetes Verfahren zur Ermittlung der Stabilität von Vektor-DNA-Komplexen. Ausgenutzt wird dabei die Retardierung der DNA im elektrischen Feld durch die Komplexbildung mit der kationischen Komponente.

Das Verhalten von pipettierten DC-30 und DAC-30-haltigen Lipoplexen in verschiedenen Masseverhältnissen (w/w) (2:1, 5:1, 10:1 und 20:1) wurde ermittelt. Zusätzlich wurde die Resistenz der gleichen Lipoplexe gegen eine Behandlung mit DNase untersucht.

Abbildung 4.1.2-8 zeigt das Elektrophoreseergebnis ohne (obere Reihe) und mit Nucleasebehandlung (untere Reihe).

Es ist deutlich erkennbar, dass zunehmende Mengen an kationischem Lipid sich verstärkt komplexierend auf die DNA auswirken bzw. die DNA in vermehrtem Maße binden durch den höheren Anteil der kationischen Bindungsstellen (obere Reihe). Während im niedrigen Masseverhältnis (2:1 (w/w)) der größte Teil der DNA durch das Gel lief (Bahn 4 DC-30 und Bahn 10 DAC-30-haltige Lipoplexe), wurde im höchsten Verhältnis die komplette DNA in den Taschen zurückgehalten (Bahnen 1 DC-30 und Bahn 7 DAC-30-haltige Lipoplexe). Auch die Enzymbehandlung belegte die zunehmende Bindung der DNA. Das reine Plasmid wurde vollständig verdaut

(Bahnen 5 und 11), die DNA in Lipoplexen mit zunehmenden Masseverhältnissen wurden während der Inkubationsperiode verzögert durch die DNase abgebaut und konnte sich so im elektrischen Feld bewegen. Zwischen DC-30 und DAC-30-haltigen Lipoplexen ließ sich kein deutlicher Unterschied feststellen. Die unterschiedliche Stellung der Methylgruppe in DAC-Cholesterol und DC-Cholesterol scheint sich auf der Komplexierungsfähigkeit von DNA nicht auszuwirken.

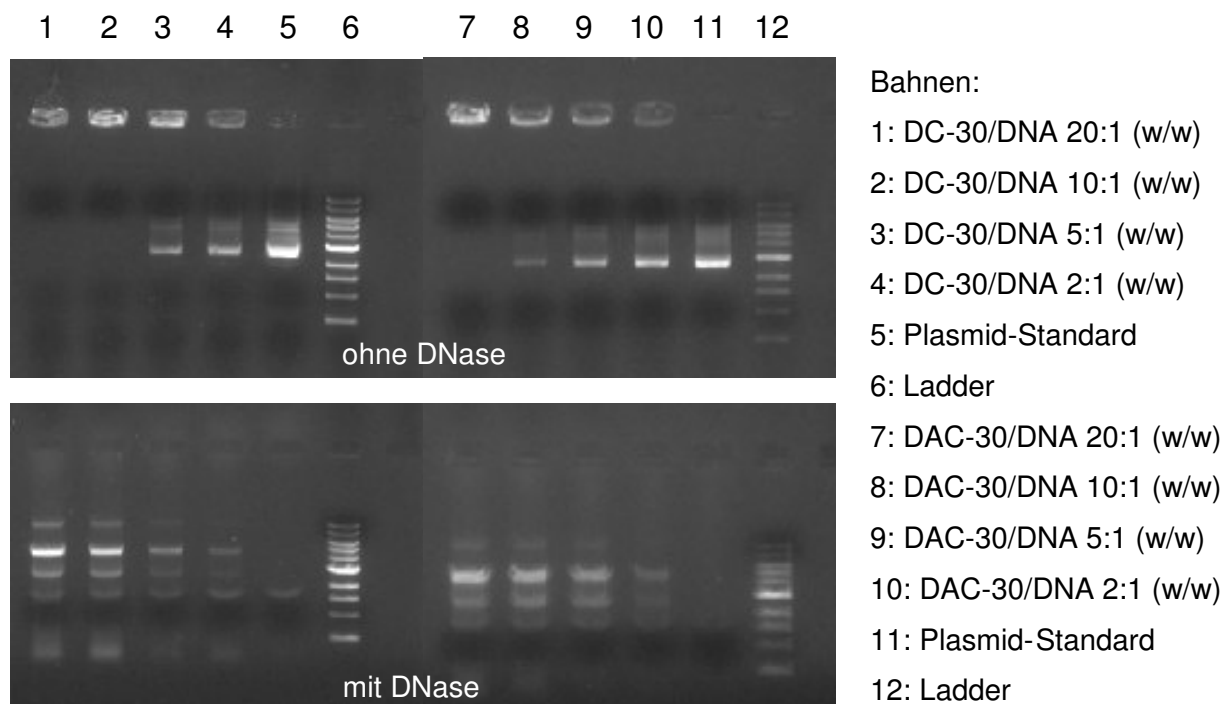


Abbildung 4.1.2-8 Agarosegel-Elektrophorese von Lipoplexen in verschiedenen Verhältnissen (w/w), mit (untere Reihe) und ohne (obere Reihe) Nucleasebehandlung.

#### 4.1.2.4.2. EINFLUSS DES HERSTELLUNGSVERFAHRENS

Ziel der Untersuchungen war es herauszufinden, ob sich das kontinuierliche Herstellungsverfahren mit anschließender Lyophilisation im Vergleich zum Herstellverfahren durch Pipettieren in kleinem Maßstab auf die Integrität der DNA in den resultierenden Lipoplexen auswirkte. Die Proben wurden wiederum mit und ohne Nucleasebehandlung untersucht (obere und untere Reihe).

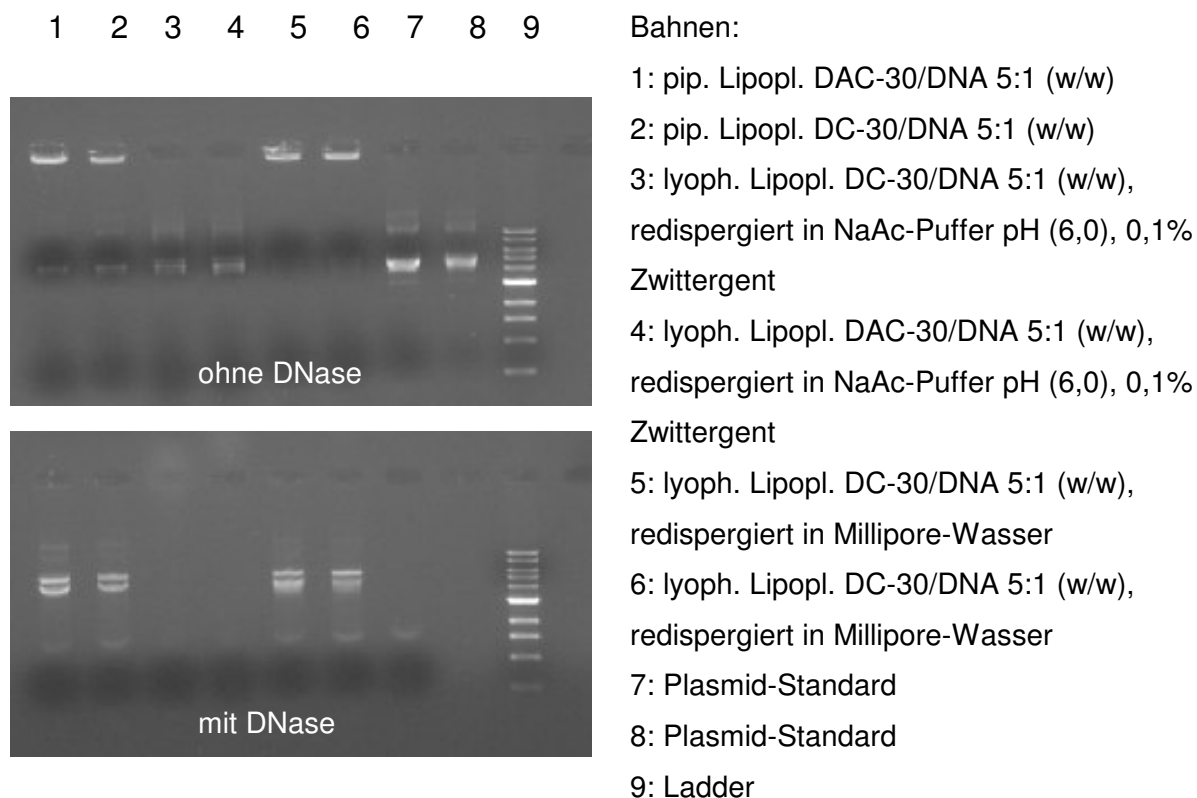


Abbildung 4.1.2-9 Agarosegel-Elektrophorese von in Millipore-Wasser bzw. NaAc-Puffer (pH 6,0), 0,1% Zwittergent redispergierten lyophilisierten Lipoplexen und pipettierten Lipoplexen (Lipid/DNA 5:1 (w/w)) mit (untere Reihe) und ohne (obere Reihe) Nucleasebehandlung.

Die mit Millipore-Wasser redispergierten Lyophilisate mit DAC-30 und DC-30 (Lipid/DNA 5:1 (w/w), 125 µg/ml Lipid, Bahnen 5 und 6) enthielten die unzerstörten Lipoplexe. Die DNA wurde durch die Komplexbildung mit den kationischen Lipiden in den Taschen des Gels zurückgehalten, war aber zugänglich für EtBr. Die DNA in den lyophilisierten Proben, welche mit NaAc-Puffer (pH 6,0), 0,1% Zwittergent redispergiert worden waren (Lipid/DNA 5:1 (w/w), 125 µg/ml Lipid), und so die Lipoplexe durch das Zwittergent zerstört wurden, lag frei vor und konnte durch die angelegte Spannung im Gel laufen (Bahn 3 DAC-30 und Bahn 4 DC-30-haltige Lipoplexe). Auf den Bahnen 1 und 2 wurden in kleinem Maßstab durch Pipettieren hergestellten Lipoplexe mit DAC-30 und DC-30 (Lipid/DNA 5:1 (w/w), 125 µg/ml Lipid) aufgetragen. Sie wiesen das gleiche Verhalten auf, wie die in Millipore-Wasser redispergierten Lyophilisate (Bahn 1 DAC-30 und Bahn 2 DC-30-haltige Lipoplexe). Allerdings wurde hier ein kleiner Teil der DNA nicht festgehalten und wanderte im Gel, während bei den lyophilisierten Lipoplexen fast alles zurückgehalten wurde



(siehe auch 4.1.2.4.1). Die Struktur der pipettierten Lipoplexe ist demnach etwas weniger fest, als die der kontinuierlich hergestellten.

Die DNasebehandlung der Proben zeigte, dass sowohl die in Millipore-Wasser redispergierten lyophilisierten Lipoplexe, sowie die durch Pipettieren hergestellten Lipoplexe gegen eine spontane Degradierung geschützt waren. Die unkomplexierte DNA (Bahnen 7 und 8) und die freie DNA in den mit zwittergenthaltigem NaAc-Puffer redispergierten lyophilisierten Lipoplexen wurde durch das Enzym komplett abgebaut.

Die strukturellen Eigenschaften der Lipoplexe wurden also durch den kontinuierlichen Herstellungsprozess nicht beeinträchtigt. Redispergierung der Lyophilisate führt zu stabilen Lipoplexen. Auch mit diesem Untersuchungsverfahren konnte kein offensichtlicher Unterschied zwischen DC-30 und DAC-30-haltigen Lipoplexen herausgefunden werden.

### 4.1.3. PARTIKELLADUNG

Ein weiteres wichtiges Merkmal zu Charakterisierung der Lipoplexe ist die Bestimmung der Oberflächenladung. Diese beeinflusst die Stabilität einer Dispersion und wirkt sie sich deutlich auf die Größe der in der Dispersion vorhandenen Partikel und damit auch auf die biologische Aktivität des Systems aus.

Die Oberflächenladung von Lipoplexen ist schwer zu erfassen, da es sich um dynamische Systeme handelt, deren Struktur veränderlich ist. Zudem kann sich das umgebende Medium deutlich auf die Ladung der Partikel auswirken.

Es wurden zwei unterschiedliche Verfahren zur Ermittlung der Partikelladung durchgeführt. Zum einen wurde die Wanderung der Partikel im elektrischen Feld untersucht und dadurch das Zetapotential bestimmt. Weiterhin wurde untersucht, inwieweit der fluoreszenzaktive Farbstoff TNS sich ladungsabhängig in die äußerste Lipidschicht der Lipoplexe einlagerte.

#### 4.1.3.1. ZETAPOTENTIAL

##### 4.1.3.1.1. EINFLUSS DES MEDIUMS AUF DAS ZETAPOTENTIAL PIPETTIERTER LIPOPLEXE

Wie bereits erwähnt werden die Lipoplexe in TRM hergestellt, welches in großen Mengen Saccharose (250 mM) und in kleineren Mengen NaCl (25 mM) enthält. Vor allem NaCl trägt zur Leitfähigkeit der Probe bei und kann durch Kompensation das

Zetapotential deutlich beeinflussen (Müller 1996). Um herauszufinden, wie sich die jeweiligen Komponenten des TRM auf die Leitfähigkeit und damit auch auf das Zetapotential auswirkten, wurden die Messungen nicht nur in TRM sondern auch jeweils in einer 250 mM Saccharose-Lsg und einer 25 mM NaCl-Lsg durchgeführt. Dazu wurden Lipoplexe aus DC-30 und GFP-exprimierendem Plasmid im kleinen Maßstab in verschiedenen Ladungsverhältnissen (+/-) durch Variation der Lipidmengen in den entsprechenden Medien hergestellt ( $c_{DNA} = 25 \mu\text{g/ml}$ ).

Abbildung 4.1.3-1 zeigt, dass alle Lipoplexe mit zunehmendem Ladungsverhältnis (+/-) vom negativen ins positive Potential übergingen. Die Zunahme an positiven Ladungen durch das Lipid schien also einen deutlichen Einfluss auf die Oberflächenladung und das Zetapotential und demnach auf die Komplexierung der negativ geladenen DNA durch das kationische Lipid zu haben. Die verschiedenen Medien wirkten sich unterschiedlich auf den Übergang und den Verlauf des Potentials vom negativen in den positiven Bereich aus. In 250 mM Saccharose hergestellte Lipoplexe gingen im Ladungsbereich (+/-) von 1:1, das heisst bei ausgeglichenem Ladungsverhältnis, vom negativen ins positive Oberflächenpotential über. Bis zu einem Ladungsverhältnis von ca. 4:1 (+/-) lagen die Werte über denen der mit Lipoplexen in NaCl oder TRM erhaltenen Werte (siehe Abbildung 4.1.3-1). Der Bereich, in dem sich die Potentiale der Lipoplexe mit verschiedenen Ladungsverhältnissen veränderten, war in Saccharose am geringsten (-13 bis +60 mV im Gegensatz zu -60 bis +60 mV in NaCl bzw. -40 bis + 40 mV in TRM). Dies ist damit zu erklären, dass in dem Medium bis auf die Gegenionen von Lipid und DNA keine Ionen vorhanden waren, die einen Einfluss auf die Oberflächenladungen der Lipoplexe ausüben konnten.

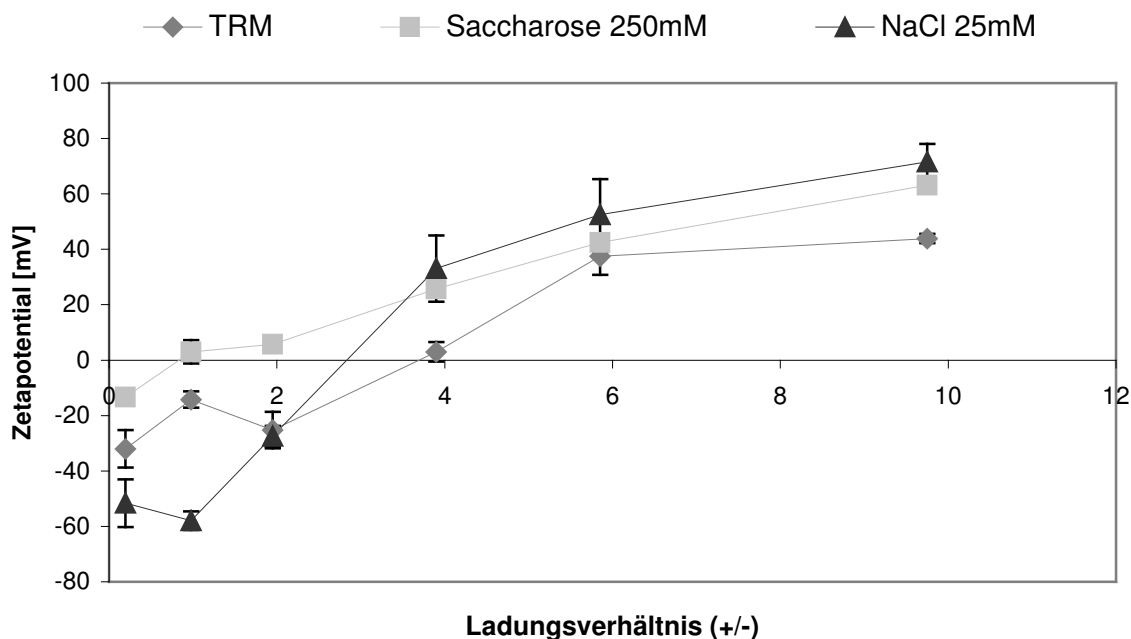


Abbildung 4.1.3-1 Zetapotentialverläufe von DC-30 haltigen Lipoplexen in verschiedenen Ladungsverhältnissen (+/-). Die Herstellung durch Pipettieren erfolgte in verschiedenen Medien (250 mM Saccharose, 25 mM NaCl und TRM (250 mM Saccharose + 25 mM NaCl))

Die in 25 mM NaCl hergestellten Lipoplexe gingen erst bei höheren Ladungsverhältnissen (3:1 (+/-)) in den positiven Bereich über. Demnach hatten die dissoziierten Ionen des hydratisierten NaCl eine signifikante Auswirkung auf das Zetapotential der Lipoplexe. Die Kurve wies den steilsten Verlauf auf. In den niederen Ladungsbereichen waren die gemessenen Werte am negativsten, nach dem Potentialwechsel in den positiven Bereich wurden die höchsten Potentiale gemessen.

In Kombination mit Saccharose im TRM flachte der Potentialverlauf wiederum ab. Der Übergang vom negativen ins positive Potential erfolgte bei dem höchsten Ladungsverhältnis, verglichen mit reinen Saccharose- und NaCl-Lösungen. Die Saccharose hemmt die Diffusion der  $\text{Cl}^-$  und  $\text{Na}^+$ -Ionen an die Lipoplexe bei elektrophoretischer Wanderung der Partikel und verschiebt so den Übergang in den höheren Ladungsbereich.

Das Zetapotential der Lipoplexe mit dem bei Transfektionsversuchen als das am effektivsten ermittelten Lipid/DNA-Verhältnisses von 5:1 (w/w) entsprechend einem Ladungsverhältnis von 1:1 (+/-) lag lediglich in 250 mM Saccharose im neutralen

Bereich. In 25 mM NaCl, sowie in TRM lagen die Potentiale der Lipoplexe mit diesem Verhältnis im deutlich negativen Bereich (-58 bzw. -14 mV).

#### 4.1.3.1.2. EINFLUSS DES HERSTELLUNGSPROZESSES

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der im kleinen Maßstab hergestellten Lipoplexen wurden mit redispergierten lyophilisierten Lipoplexen (DC-30 bzw. DAC-30/DNA 5:1, (w/w)) ebenfalls negative Zetapotentiale ermittelt (siehe Tabelle 4-1). Das Potential der DAC-30-haltigen Lipoplexe lag etwas niedriger als das der DC-30-haltigen.

Probe	Zetapotential [mV]	Abweichung (+/-)
E06103dc	-61,8	3,2
E06103dac	-79,3	1,9

Tabelle 4-1 Zetapotential von redispergierten lyophilisierten Lipoplexen mit DC-30 (E06103dc) und DAC-30 (E06103dac) und GFP-exprimierendem Plasmid im Verhältnis Lipid/DNA 5:1 (w/w)

Dies bedeutet, dass die tatsächliche Ladung bei einem Lipoplexverhältnis, das in vorausgehenden Arbeiten als das ideale Verhältnis für die Transfektion von humanen Primärzellen ermittelt wurde (Kiefer et al. 2004), im deutlich negativen Bereich liegt. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu denen zahlreicher Arbeiten, welche davon ausgehen, dass für ein effektives Transfektionsergebnis die Transfektionssysteme eine positive Nettoladung besitzen müssen, um erfolgreich die negativ geladene Zellmembran überwinden zu können. Allerdings wurde ebenso publiziert, dass eine effektive Transfektion mit negativ geladenen Transfektionssystemen besser erreicht wird als mit positiven (Son et al. 2000). Problematisch ist generell, dass in den Publikationen meist die Untersuchung der Oberflächenladung mit anderen Systemen stattfand, als den zur Transfektion der Zellen verwendeten. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass es durch Zusätze zum Zellkulturmedium und enthaltene Serumproteine bei der Transfektion durchaus möglich ist, dass die Ladung der Partikel sich durch die Mischung mit dem Zellkulturmedium verändert.

#### 4.1.3.2. OBERFLÄCHENLADUNG MITTELS TNS-ASSAY

Ein Verfahren zur Bestimmung der Oberflächenladung ist die Einlagerung des lipophilen Fluoreszenzfarbstoffes 2-(p-Toluidinyl)-naphthalin-6-sulfonsäure (TNS) in

Membranen. Die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes steigt mit zunehmender Einlagerung an. Diese vollzieht sich in Abhängigkeit von der Ladung der Oberfläche. Je stärker positiv die Oberfläche geladen ist, umso mehr lagert sich der Farbstoff ein. Die Einlagerung ist abhängig von der Konzentration des Farbstoffes im Medium sowie von der Lipidkonzentration, da es sich um ein Verteilungsgleichgewicht handelt.

#### 4.1.3.2.1. DNA

Um sicherzustellen, dass TNS mit DNA alleine nicht interagiert und es dadurch zu einer Erhöhung der Fluoreszenz kam, wurden aufsteigende DNA-Mengen in TRM (2-50  $\mu\text{g/ml}$ ) mit dem Farbstoff (3  $\mu\text{M}$  Arbeitskonzentration) versetzt. Wie aus Abbildung 4.1.3-2 ersichtlich, kam es zu keiner Erhöhung der Fluoreszenzintensität.

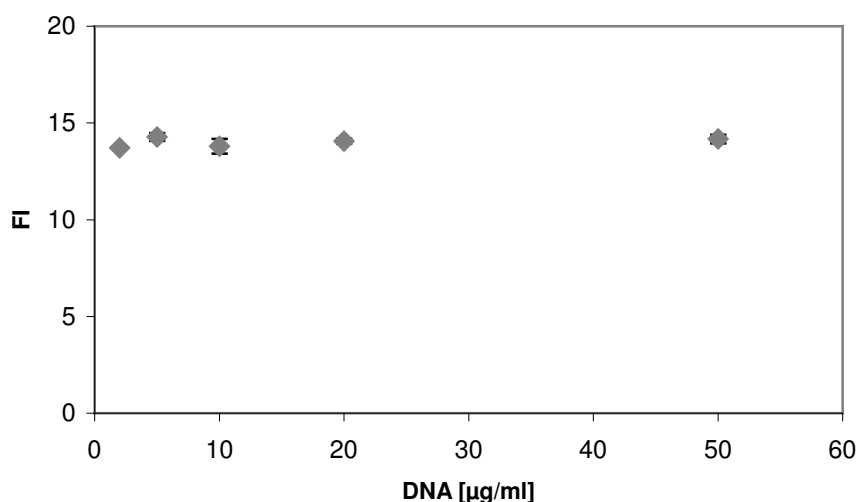


Abbildung 4.1.3-2 Fluoreszenzintensität zunehmender DNA-Konzentrationen mit TNS (3 $\mu\text{M}$ )

#### 4.1.3.2.2. LIPOSOMEN

Um die Linearität der Fluoreszenzintensität abhängig von der Liposomenkonzentration zu untersuchen, wurden aufsteigende Konzentrationen von DC-30-Liposomen in TRM (1,25-200  $\mu\text{g/ml}$ ) mit TNS versetzt. Die endgültige TNS-Konzentration im Ansatz blieb immer gleich (3  $\mu\text{M}$ ).

Aus Abbildung 4.1.3-3 wird ersichtlich, dass die Linearität bis zu einem Wert von ca. 13  $\mu\text{g/ml}$  DC-30-Liposomen gegeben war. Anschließend wurde die Fluoreszenz zunehmend gesättigt und die Kurve flachte deutlich ab, was zeigt, dass ein

Verteilungsgleichgewicht des Farbstoffes zwischen dem umgebenden Medium und der Membran besteht.

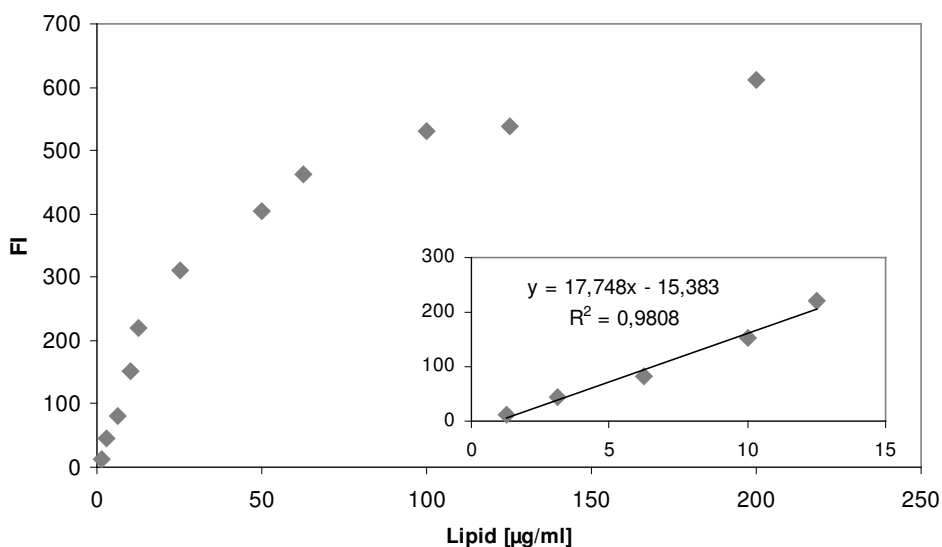


Abbildung 4.1.3-3 Fluoreszenzintensität zunehmender DC-30-Liposomen-Konzentrationen mit TNS (3 µM).

Insert: linearer Verlauf bei niedriger Lipidmenge

#### 4.1.3.2.3. LIPOPLEXE MIT UNTERSCHIEDLICHEN LADUNGSVERHÄLTNISSEN

Zur Untersuchungen des Einflusses der Oberflächenladung auf die Einlagerung von TNS wurden Lipoplexe mit unterschiedlichen Ladungsverhältnissen (0,2:1 - 9,8:1 (+/-)) im kleinen Maßstab durch Pipettieren hergestellt. Die Lipidkonzentration blieb gleich (10 µg/ml), die DNA-Konzentration wurde entsprechend angepasst (siehe 3.1.1.1). Dadurch konnte gewährleistet werden, dass die Veränderung der Fluoreszenz nicht durch eine Erhöhung des Lipidanteils, sondern durch eine Veränderung der Oberflächeneigenschaften zustande kam.

Abbildung 4.1.3-4 zeigt, dass die Fluoreszenzaktivität mit steigendem positiven Ladungsverhältnis deutlich zunahm. Im Bereich von 0,2:1 bis ca. 1:1 (+/-) blieb die Fluoreszenzintensität annähernd gleich, ab 1:1 (was einem Masseverhältnis von 5:1 (w/w) entspricht) war ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen. Der Farbstoff lagerte sich also vermehrt in die Membran ein, was offensichtlich durch die zunehmenden positiven Ladungsanteile der Partikeloberfläche hervorgerufen wurde.

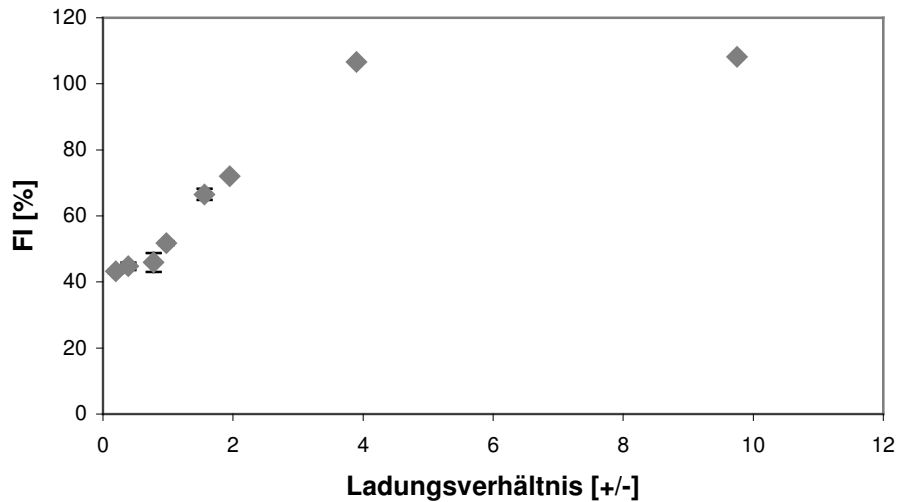


Abbildung 4.1.3-4 Zunahme der Fluoreszenzintensität durch die Einlagerung von TNS in DC-30 Lipoplexe zunehmender Ladungsverhältnisse (+/-) (0,2-9,8); Lipidkonzentration: 10  $\mu\text{g/ml}$

#### 4.1.3.2.4. LYOPHILISIERTE LIPOPLEXE

Zunehmende Konzentrationen eines redispergierten lyophilisierten DC-30-haltigen Lipoplexes in TRM wurden mit gleichbleibenden Konzentrationen TNS versetzt (Endkonzentration 3  $\mu\text{M}$ ). Der Vergleich mit reinen DC-30 Liposomen (siehe auch Abbildung 4.1.3-3) zeigt einen deutlich veränderten Kurvenverlauf (Abbildung 4.1.3-5). Durch die Komplexierung der kationischen Lipide mit DNA in den Lipoplexen verändert sich das Einlagerungsverhalten von TNS in die Membranen.

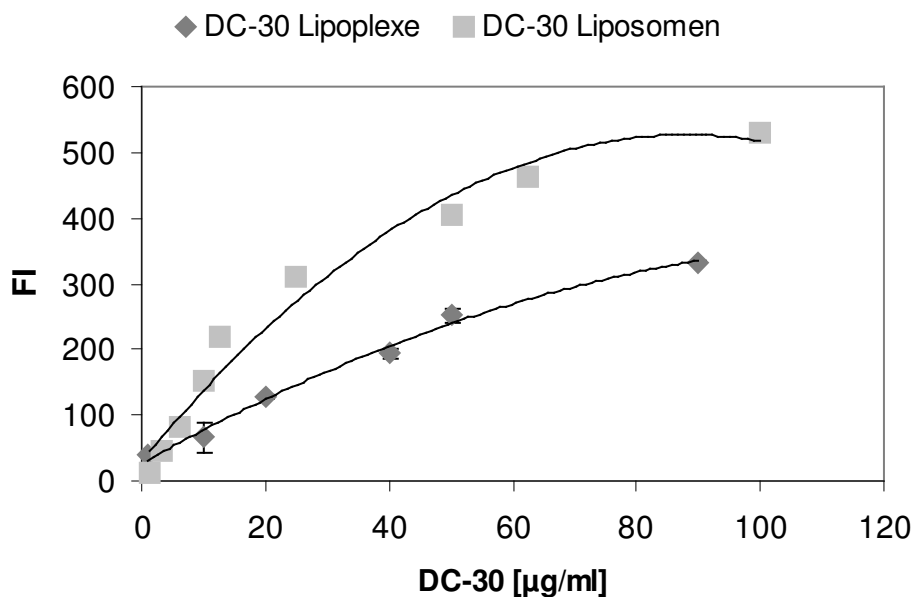


Abbildung 4.1.3-5 Zunahme der Fluoreszenzintensität durch die Einlagerung von TNS in DC-30 Lipoplexe zunehmender Konzentrationen (DC-30/DNA 5:1 (w/w)) und DC-30 Liposomen zunehmender Konzentrationen

#### 4.1.3.3. ZUSAMMENHANG VON ZETAPOTENTIAL UND TNS-ASSAY

Zwischen dem Zetapotential und dem Oberflächenpotential (TNS Fluoreszenz) von DC-30 Lipoplexen verschiedener Ladungsverhältnisse (+/-) bestand ein annähernd linearer Zusammenhang (Abbildung 4.1.3-6).

Da mit den beiden Methoden die Ladung an unterschiedlichen Stellen gemessen wird, besteht auch kein direkter Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Fluoreszenz im TNS-Assay und dem Wechsel vom negativen ins positive Zetapotential. Der Fluoreszenzanstieg fand deutlich ab einem Ladungsverhältnis von 1:1 (+/-) statt (siehe 4.1.3.2.3), wohingegen das Zetapotential erst ab einem Ladungsverhältnis von 4:1 (+/-) in den positiven Bereich wechselte (siehe 4.1.3.1.1).



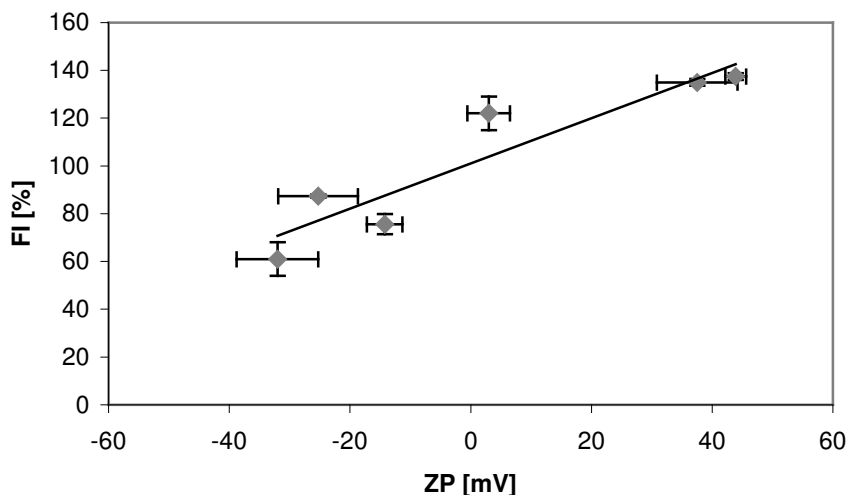


Abbildung 4.1.3-6 Relative Fluoreszenz von DC-30 Lipoplexen verschiedener Verhältnisse (1:1, 5:1, 10:1, 20:1, 30:1, 50:1 (w/w)) in Abhängigkeit vom Zetapotential der entsprechenden Lipoplexe

#### 4.1.4. LIPIDANALYTIK

##### 4.1.4.1. BARTLETT-ASSAY

Mit Hilfe der Phosphat-Quantifizierung nach Bartlett (Bartlett 1959) kann freies anorganisches Phosphat nach Veraschung von Phospholipiden und DNA mittels einer Farbreaktion bestimmt werden. Die Anwendbarkeit des Assays für lyophilisierte Lipoplexe wurde untersucht. Hierfür wurden die Proben unterschiedlich aufgearbeitet. Lyophilisierte Lipoplexe wurden einerseits mit Millipore-Wasser oder mit NaAc-Puffer pH 6, 0,1% Zwittergent redispergiert und direkt eingesetzt (siehe 3.2.1.1 bzw. 3.2.1.2). In diesen Proben war demnach der Phosphorgehalt aus DOPE- und DNA-Anteilen enthalten. Zusätzlich enthielten die Analysen noch die Saccharose- und NaCl-Bestandteile aus den Lyophilisaten.

Weiterhin wurden die Lipoplexe zur Abtrennung der wasserlöslichen Bestandteile (DNA, Saccharose, NaCl) extrahiert (siehe 3.2.1.3). Die organische Phase, welche die Lipidbestandteile enthielt, wurde komplett in das Untersuchungsgefäß überführt. Somit wurde mit diesen Proben der Phosphorgehalt aus dem DOPE-Anteil im Lipid erfasst, welcher in einem Vial enthalten war.

Abbildung 4.1.4-1 zeigt deutlich, dass die Wiederfindungsergebnisse sehr unterschiedlich ausfielen. Generell waren die Ergebnisse der mit Millipore-Wasser redispergierten Lipoplexe am niedrigsten. In NaAc-Puffer pH 6, 0,1% Zwittergent,

redispersierte Lipoplexe ergaben Phosphat-Wiederfindungen, die höher als die der mit Wasser redispersierten Proben lagen. Jedoch waren die Abweichungen sehr unterschiedlich ausgeprägt, sie lagen in Bereichen von 8-30%. Extrahierte Lipoplexe ergaben die höchsten Wiederfindungswerte.

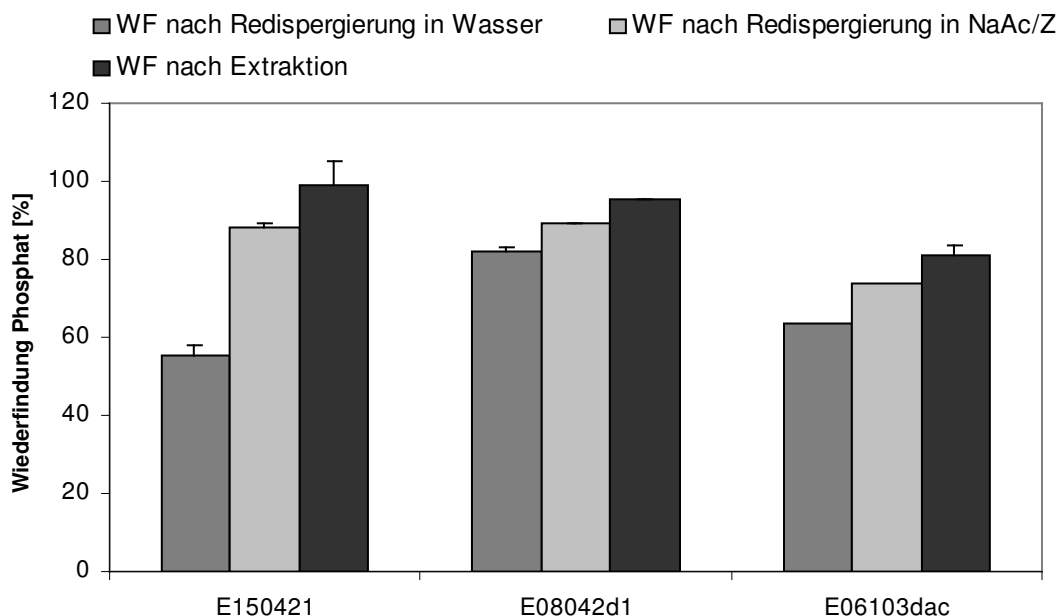


Abbildung 4.1.4-1 Phosphat-Wiederfindung durch Bartlett-Assay. Lyophilisierte Lipoplexe wurden in Millipore-Wasser oder NaAc-Puffer (pH 6,0), 0,1% Zwittergent redispersiert und direkt eingesetzt (Phosphatgehalt aus DNA und DOPE wurde ermittelt) oder sie wurden extrahiert und der Phosphatgehalt des DOPE-Anteils bestimmt. E150421: (DAC-30/DNA 4:1 (w/w), 150 µg DAC-30/Vial), E08042d1 (DC-30/DNA 4:1 (w/w), 150 µg DC-30/Vial), E06103dac (DAC-30/DNA 5:1 (w/w), 125 µg DAC-30/Vial)

Diese Untersuchungen zeigten, dass die Quantifizierung des Phosphatgehaltes in den redispersierten Proben deutlich beeinflusst wurde. Saccharose, die im großen Überschuss im Vergleich zu Lipid und DNA in diesen Proben enthalten war, führte wahrscheinlich zu einer Störung. Mit den extrahierten Proben, in denen keine störenden Begleitsubstanzen mehr vorhanden waren, wurden deutlich höhere Werte erhalten.

Da die Wiederfindungsraten auf die theoretisch und nicht auf die tatsächlich eingesetzten Ausgangskonzentrationen der Lipid- und DNA-Lösungen bezogen

wurden, erklären sich die Schwankungen zwischen den einzelnen Proben und die Abweichung vom 100%-Wiederfindungswert.

#### 4.1.4.2. HPTLC

Mit der HPTLC können Lipidmengen in sehr niedrigen Bereichen detektiert werden. Ein großer Vorteil der Methode ist, dass durch Verwendung eines geeigneten Fließmittels Lipidgemische aufgetrennt, und somit die Einzelsubstanzen bestimmt werden können. Problematisch kann allerdings sein, dass die Proben in einem leicht flüchtigen organischen Lösungsmittel vorliegen sollten, um exakt auf die Platten aufgetragen werden zu können. Dies ist vor allem ein Problem bei der Analytik der lyophilisierten Lipoplexe, die einen großen Anteil an wasserlöslichen Substanzen enthalten, die in organischen Lösungsmitteln nicht oder nur wenig löslich sind und so die Auftragung sowie die Analytik deutlich beeinflussen können.

Im folgenden Teil sollte ein Verfahren zur Quantifizierung von Lipidbestandteilen in lyophilisierten Lipoplexen entwickelt werden.

##### 4.1.4.2.1. AUFTRENNUNG DER LIPIDBESTANDTEILE

Zur Auftrennung der Transfektionsreagenzien DAC-30 und DC-30 in die Bestandteile DOPE und DAC-Cholesterol bzw. DC-Cholesterol in den lyophilisierten Lipoplexen wurde ein Fließmittelgemisch mit der Zusammensetzung  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_3:\text{H}_2\text{O}$  18,75:6,9:0,15:0,35 (v/v/v/v) verwendet. Wie aus Abbildung 4.1.4-2 ersichtlich konnte mit diesem Fließmittelgemisch eine hervorragende Auftrennung von Phospholipid und Cholesterolderivat erreicht werden.

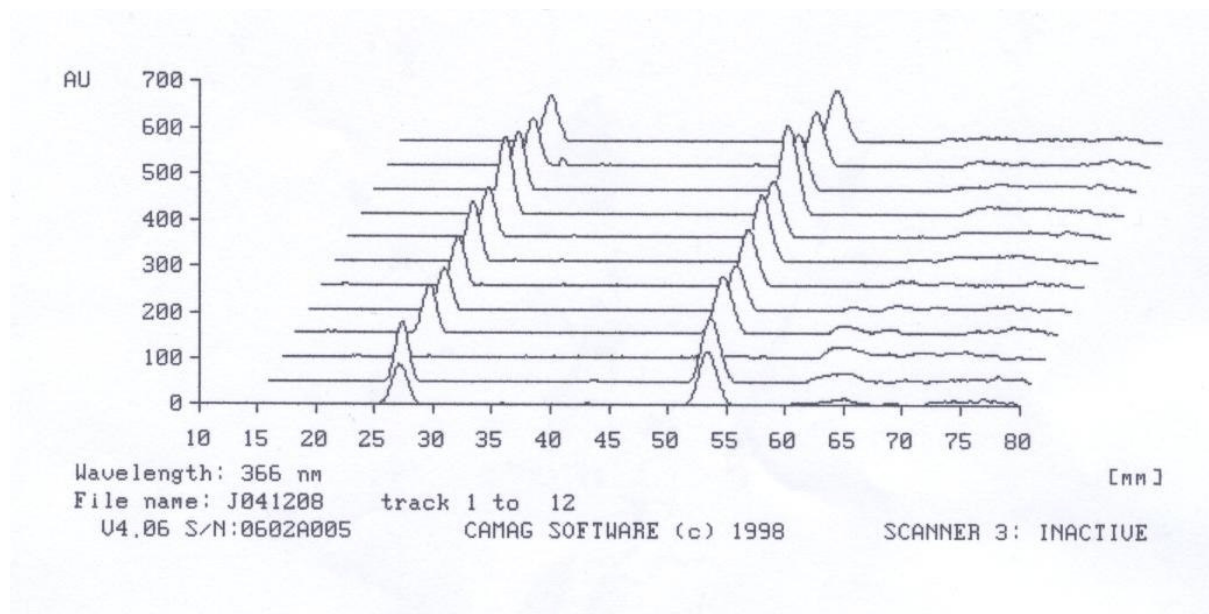


Abbildung 4.1.4-2 Auftrennung von 11 DC-30-haltigen Proben in die Bestandteile DOPE (ca. 26 mm Laufstrecke) und DC-Cholesterol (ca. 53 mm Laufstrecke) durch HPTLC

#### 4.1.4.2.2. DETEKTION

Für die Auswertung der Analysen kommen in der Literatur verschiedene Detektionsreagenzien und mathematische Auswertungsverfahren zum Einsatz. Vielfach wurde  $\text{CuSO}_4$ -Reagenz als Detektionsreagenz für Lipide eingesetzt (Dhanesar 1992; Vuorela 1996; Ratz et al. 2001). Dieses Verfahren ist sehr empfindlich und erlaubt eine Detektion bis in den ng-Bereich. Allerdings ist das Detektionsverfahren langwierig. Vor allem der Veraschungsschritt ist sehr anfällig gegen äußere Einflüsse und es kann leicht zum Verschmutzen der Platte und dadurch zu Fehlern in der Auswertung kommen, da die Verschmutzungen als Signale mit erfasst werden können. Zudem ist der lineare Auswertungsbereich nur sehr gering, teilweise werden polynominelle Kalibrierfunktionen zur Auswertung angewendet (Vuorela 1996). Die Detektion mit ANS ist wesentlich zeitsparender und unempfindlicher gegenüber äußeren Einflüssen, da vor dem Scannen nur das Eintauchen der Platte in die Detektionslösung erfolgen muss. Verschmutzungen, die eventuell auf die Platte gelangen können, werden durch ANS nicht erfasst und es ergibt sich eine wesentlich bessere Basislinie zur Integration der Peaks.

Zur Ermittlung des linearen Detektionsbereiches mit ANS wurde eine Kalibriergerade durch die Auftragung von 1-12  $\mu\text{l}$  einer 0,2 mg/ml DC-30-Lösung in MeOH erstellt.

Die Kurvenverlauf erfolgte über den gesamten erfassten Bereich linear, es konnte keine Sättigung erkannt werden (Abbildung 4.1.4-3).

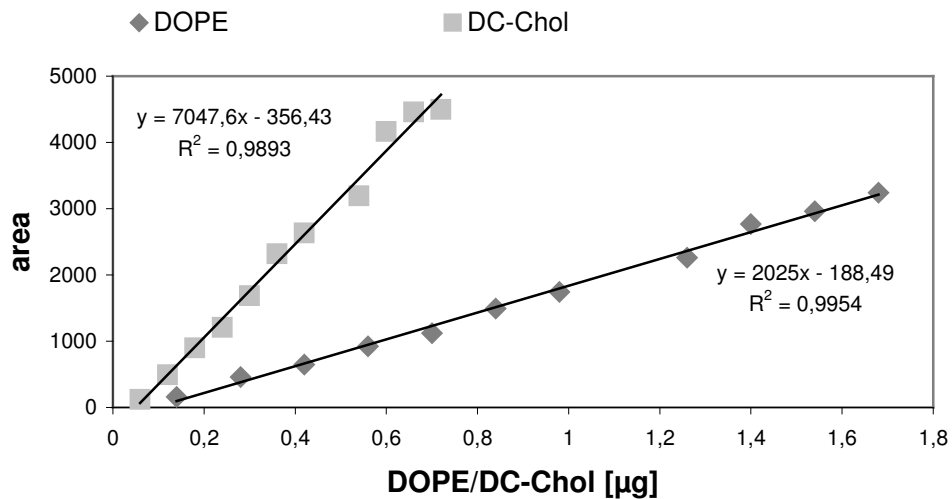


Abbildung 4.1.4-3 Linearität der Detektion der Bestandteile DOPE und DC-Cholesterol aus DC-30 mit ANS, es wurden 1-12 µl (1 µl Schritte) einer 0,2 mg/ml DC-30 Lösung in MeOH aufgetragen

Um die Entwicklung der Fluoreszenzintensität zu untersuchen wurde die Platte nach verschiedenen Zeitabständen gescannt (initial nach dem Eintauchen in die Detektionslösung, sowie nach 15, 30, 60, 120 min und 22 h). Die Fluoreszenz nahm mit zunehmender Zeit zu, die Linearität blieb erhalten (Abbildung 4.1.4-4 und Abbildung 4.1.4-5). Somit konnte der Zeitpunkt des Scannens willkürlich festgelegt werden, zur Vereinheitlichung der Auswertung wurde dennoch ein Zeitraum von 15 min vor dem Scan eingehalten.

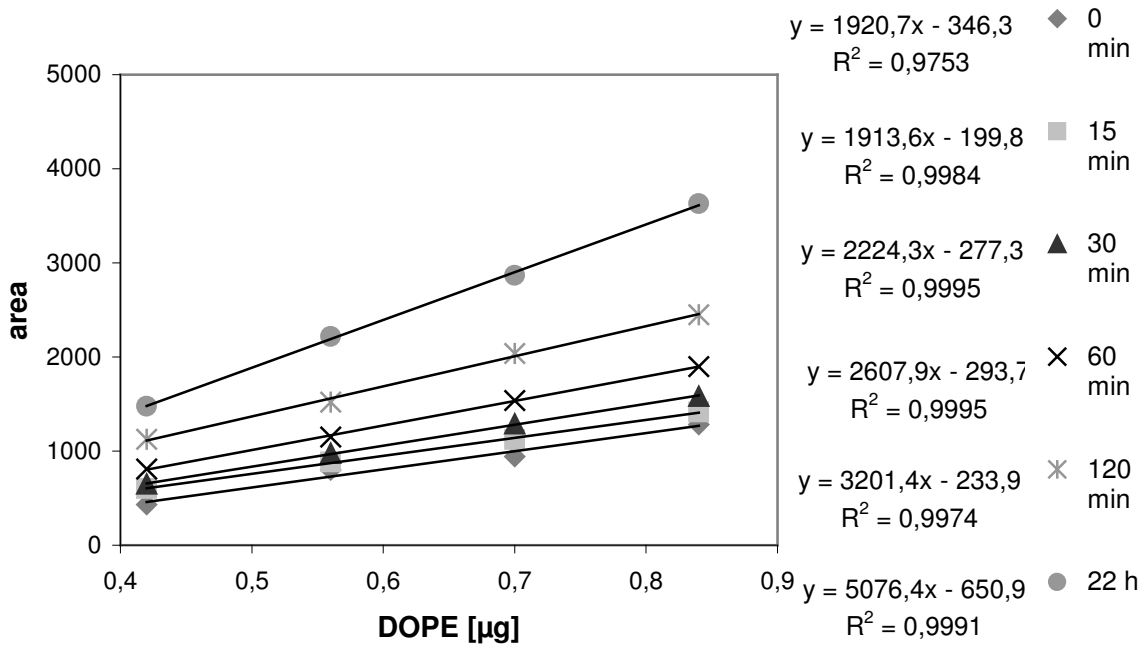


Abbildung 4.1.4-4 Entwicklung der Fluoreszenzintensität von DOPE, detektiert mit ANS; Scan erfolgte 0, 15, 30, 60, 120 min und 22 h nach Eintauchen der Platte in die Detektionslösung; es wurden 3, 4, 5 und 6 µl einer 0,2 mg/ml DC-30 Lösung in MeOH aufgetragen

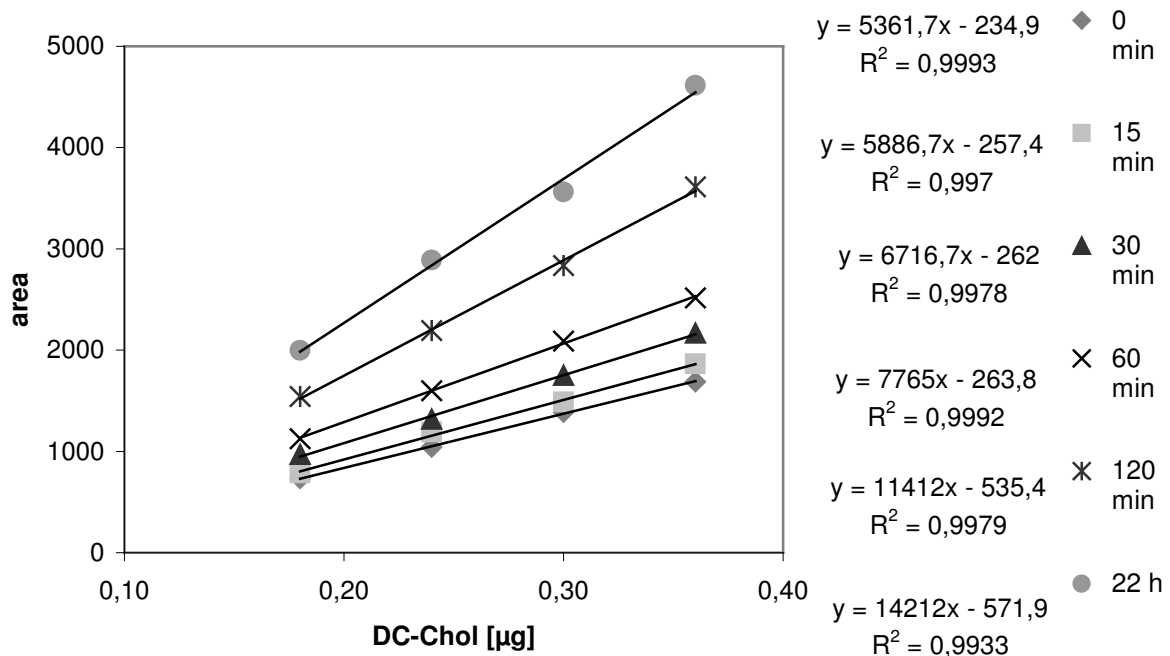


Abbildung 4.1.4-5 Entwicklung der Fluoreszenzintensität von DC-Cholesterol, detektiert mit ANS; Scan erfolgte 0, 15, 30, 60, 120 min und 22 h nach Eintauchen der Platte in die Detektionslösung; es wurden 3, 4, 5 und 6 µl einer 0,2 mg/ml DC-30 Lösung in MeOH aufgetragen

#### 4.1.4.2.3. WIEDERFINDUNG DER LIPIDBESTANDTEILE AUS LYOPHILISIERTEN LIPOPLEXEN

Wie schon erwähnt, müssen die Proben in einem organischen Lösungsmittel vorliegen, um exakt auf die Platte aufgetragen werden zu können. Da die Lyophilisate zu großen Teilen aus NaCl und vor allem Saccharose bestehen, war die Aufnahme aufgrund der schlechten Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln schwierig. Durch die große Oberfläche der lyophilisierten Produkte konnte eine schnelle Auflösung der Lyophilisate in MeOH erreicht werden, jedoch kam es teilweise wieder zu einer Auskristallisation der wasserlöslichen Bestandteile, was zum Verstopfen der Spritze und damit zu einer ungenauen bzw. unvollständigen Auftragung führte. In Tabelle 4-2 sind die Wiederfindungsraten von DOPE und DC-Cholesterol aus drei DC-30-haltigen Chargen wiedergegeben. Die Lyophilisate wurden in MeOH aufgenommen ( $c_{DC-30} = 0,15 \text{ mg/ml}$ ) aufgetragen. Aus Kalibrationsgeraden, die auf den gleichen Platten erstellt wurden, errechneten sich die DOPE- und DC-Cholesterol Mengen. Es wurde eine deutliche Abweichung der tatsächlich ermittelten Mengen von den theoretisch eingesetzten ermittelt. Dies könnte begründet sein durch die bereits erwähnte Ungenauigkeit des Auftragens durch Auskristallisation der wasserlöslichen Substanzen, was ebenfalls die teilweise deutlichen Abweichungen der Ergebnisse untereinander erklären würde.

Chargenbezeichnung	DOPE [ $\mu\text{g}$ ] theoretisch eingesetzt	DOPE [ $\mu\text{g}$ ] ermittelt	DC-Chol [ $\mu\text{g}$ ] theoretisch eingesetzt	DC-Chol [ $\mu\text{g}$ ] ermittelt
E09101	0,63	0,41	0,27	0,16
E09101	0,63	0,40	0,27	0,14
E09101	0,63	0,50	0,27	0,18

Tabelle 4-2 HPTLC: Wiederfindung von DOPE und DC-Cholesterol [ $\mu\text{g}$ ] aus DC-30-haltigen, in MeOH aufgenommenen lyophilisierten Lipoplexen ( $c_{DC-30} = 0,15 \text{ mg/ml}$ )

Um die störenden wasserlöslichen Bestandteile aus den Proben abzutrennen, wurden verschiedene DAC-30 und DC-30-haltige Chargen lyophilisierter Lipoplexe extrahiert (siehe 3.2.1.3) und die Lipidbestandteile aus der organischen Phase auf die HPTLC-Platten aufgetragen. Die Mengen an aufgetragenem DOPE und

Cholesterol-Derivat wurden wiederum über Kalibrationsgeraden, die auf den jeweils gleichen Platten erstellt wurden, bestimmt. Die ermittelten Probenmengen wurden mit Standardwerten ins Verhältnis gesetzt, die auf gleiche Weise wie die Proben extrahiert wurden (siehe 3.4.4.1). Dieses Auswertungsverfahren sollte etwaige Verluste bei der Extraktion berücksichtigen. Eine vollständige Wiederfindung im Verhältnis zum Standard würde den Vergleichswert 1,0 ergeben.

Es wurde eine Charge mit DAC-30 (DAC-30/DNA 4:1 (w/w)) und eine Charge mit DC-30 (DC-30/DNA 4:1 (w/w)) analysiert. Aus den Werten in Tabelle 4-3 ist zu erkennen, dass die Vergleichswerte  $V$  aller Bestandteile etwas größer als 1,0 waren und demnach die theoretisch eingesetzten Mengen nicht komplett wiedergefunden wurden. Die Abweichungen im Vergleich zum eingesetzten Standard waren jedoch nur sehr gering.

Chargenbezeichnung	$V_{\text{DOPE}}$	sd [+/-]	$V_{\text{DAC-Chol}}$	sd [+/-]	$V_{\text{DC-Chol}}$	sd [+/-]
E08042d1	1,07	0,12			1,14	0,07
E150421	1,02	1,11	1,08	0,0		

Tabelle 4-3 Vergleichswerte von DOPE und DC-Cholesterol bzw. DAC-Cholesterol. Extrahierte Proben wurden zweifach aufgetragen und mit ebenfalls extrahierten Standardwerten verglichen

Da bei beiden Methoden die Ausgangskonzentrationen oder Lipiddispersionen zur Herstellung der Lipoplexe nicht bekannt waren, konnten die ermittelten Werte nur auf die theoretisch eingesetzten Konzentrationen bezogen werden. Das Extraktionsverfahren ist sehr aufwändig und es musste zusätzlich ein Standard extrahiert und analysiert werden, was zu einer Ungenauigkeit der Analyse beitragen könnte. Die Tatsache, dass die in MeOH aufgenommenen Lyophilisate jedoch teilweise auskristallisierten und demnach mehrfach sehr uneinheitliche Ergebnisse erhalten wurden bzw. Platten überhaupt nicht ausgewertet werden konnten, führte zu der Überzeugung, dass die Methode mit den extrahierten Proben reproduzierbarer ist.



#### 4.1.4.3. FLUORESCAMIN-ASSAY

Mit dem Fluorescamin-Assay können Amine aufgrund der Reaktion mit Fluorescamin zu einem fluoreszierenden Produkt quantifiziert werden (Udenfriend et al. 1972; De Bernardo et al. 1974). Obwohl einige kationische Lipide, wie auch DAC-Cholesterol oder DC-Cholesterol keine Aminogruppe haben, kann die Quantifizierung über die reaktive Aminogruppe von DOPE durchgeführt werden. Ferrari et al. verwendeten Fluorescamin zu Quantifizierung des Phospholipid-Anteils in pipettierten Lipoplexen (Ferrari et al. 1998).

Verschiedene Chargen DAC- und DC-30-haltiger Lipoplexe wurden entweder mit Millipore-Wasser oder mit NaAC-Puffer pH 6, 0,1% Zwittergent aufgenommen, um herauszufinden, ob eine Zerstörung der Lipoplexe mit Zwittergent vor der Zugabe in den Reaktionsansatz einen Einfluss auf das Ergebnis hatte.

Die DOPE-Konzentration aus den redispergierten lyophilisierten Lipoplexen betrug im Probenendvolumen 8,8  $\mu\text{M}$ . Aufgrund der Untersuchungen von Ferrari et al., dass 0,1 mM Fluorescamin für eine vollständige Umsetzung von 10  $\mu\text{M}$  DOPE ausreichend sind, wurde mit einer Fluorescamin-Konzentration von 0,3 mM gearbeitet (Ferrari et al. 1998). Primäre Amine müssen zur Umsetzung mit Fluorescamin deprotoniert vorliegen, aus diesem Grund wurde ein Borat-Puffer pH 8,25 als Arbeitspuffer verwendet. Das zu 0,1% im Arbeitspuffer enthaltene Zwittergent wurde zugesetzt, um die Lipoplexstruktur zu zerstören.

Abbildung 4.1.4-6 zeigt, dass die Redispergierung in den unterschiedlichen Medien nicht zu einer signifikanten Veränderung des Ergebnisses führte. Generell lagen die Wiederfindungsraten sehr niedrig (75-80%). Da von den Lipid-Ausgangslösungen zur Herstellung der Lipoplexe allerdings der exakte Gehalt nicht bestimmt worden war, könnte dies ein Grund für die niedrigen Ergebnisse sein. Es mussten also weitere Chargen hergestellt werden, von deren Ausgangslösungen die genauen Konzentrationen bestimmt wurden (siehe 4.1.7).

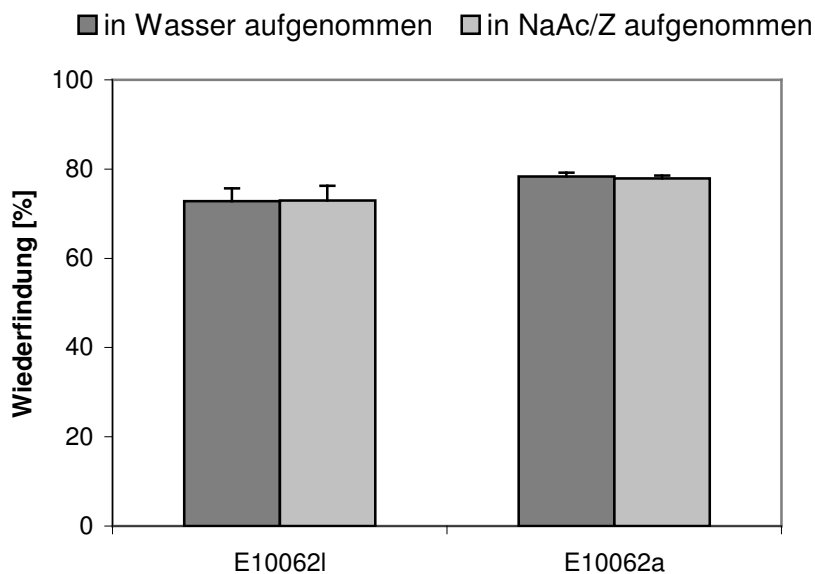


Abbildung 4.1.4-6 Wiederfindung von DOPE aus lyophilisierten Lipoplexen durch Umsetzung mit Fluorescamin nach Redispergierung mit Millipore-Wasser bzw. NaAc-Puffer (pH 6,0), 0,1% Zwittergent. Proben E10062l und E10062a: DAC-30/DNA 5:1 (w/w). Theoretische Ausgangskonzentration in redispergierten Lipoplexen 87,5 µg/ml DOPE

#### 4.1.4.4. BEWERTUNG DER METHODEN ZUR LIPID-QUANTIFIZIERUNG

Der Bartlett Assay zur Bestimmung des Phosphatgehaltes scheint sich bedingt zur Quantifizierung des Phospholipidanteils in lyophilisierten Lipoplexen zu eignen. Die Durchführung der Analyse mit den in Millipore-Wasser oder NaAc-Puffer (pH 6,0), 0,1% Zwittergent redispergierten lyophilisierten Lipoplexen ohne vorherige Extraktion, welche neben der DNA auch noch die Saccharose und NaCl-Bestandteile enthielten, führte zu sehr uneinheitlichen Ergebnissen. Die Phosphat-Wiederfindungsraten der extrahierten Proben jedoch lagen generell höher als die der nicht extrahierten, die Abtrennung der wasserlöslichen Bestandteile schien sich somit positiv auf die Wiederfindungsraten des Phosphatanteils auszuwirken.

Die Wiederfindung des Phospholipidanteils in redispergierten lyophilisierten Lipoplexen mittels Fluorescamin-Assay führte zu einheitlichen Ergebnissen. Die Art der Redispergierung (Millipore-Wasser oder NaAc-Puffer (pH 6,0), 0,1% Zwittergent) wirkte sich dabei nicht auf die Wiederfindungsraten aus. Von Vorteil ist zusätzlich die einfache Probenaufarbeitung und unkomplizierte Durchführung des Assays.

Mit der HPTLC lässt sich, im Gegensatz zu den bereits erwähnten Methoden, neben dem DOPE-Anteil auch das im Lipidanteil der Lipoplexe enthaltene kationische Cholesterolderivat bestimmen. Problematisch ist allerdings, dass eine sehr aufwändige Probenaufarbeitung und der Einsatz eines Standards notwendig ist und zudem die Durchführung relativ lange dauert.

#### 4.1.5. DNA-QUANTIFIZIERUNG

##### 4.1.5.1. UV-MESSUNG

Die Konzentration einer DNA-Lösung bei einer Absorption von 1 und einer Wellenlänge von 260 nm beträgt 50 µg/ml (Mülhardt 2003).

Um die DNA-Konzentration in redispergierten lyophilisierten Lipoplexen zu bestimmen, wurden die Lyophilisate mit Zwittergent-haltigem NaAc-Puffer (pH 6,0) aufgenommen. Eine Endkonzentration von 0,1% Zwittergent ist ausreichend, damit die DNA frei vorliegt und eine Beeinflussung der UV-Messung durch die Lipidkomponenten verhindert wird (Ferrari et al. 1998). Die theoretische Endkonzentration in den redispergierten Lipoplexen betrug 25 µg/ml DNA.

Die DNA-Gehalte wurden von mehreren Chargen bestimmt, um herauszufinden, ob das Verfahren zu einheitlichen Ergebnissen führte und sich somit für die Konzentrationsermittlung von DNA in lyophilisierten Lipoplexen eignete. Wie aus den geringen Standardabweichungen in Abbildung 4.1.5-1 zu erkennen lässt sich der DNA-Gehalt in den Lipoplexen reproduzierbar bestimmen. Allerdings fällt auch hier auf, dass die ermittelten Werte teilweise erheblich von den theoretisch eingesetzten Konzentrationen abwichen. Dies bestätigt, dass zur genauen Gehaltsbestimmung der Komponenten in den Lipoplexen der exakte Ausgangsgehalt der Lösungen zur Herstellung der Lipoplexe bekannt sein muss.

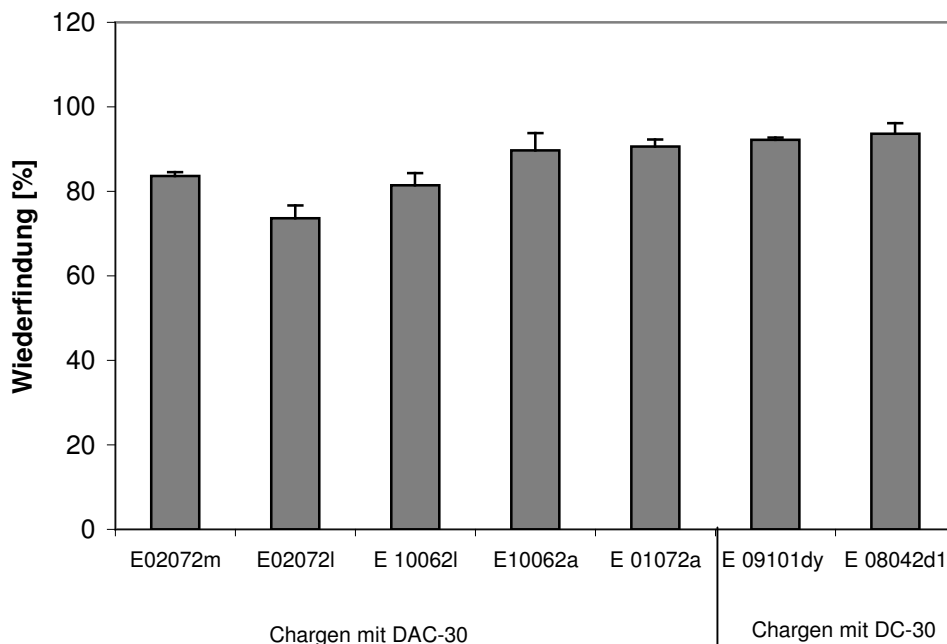


Abbildung 4.1.5-1 DNA-Gehalt durch UV-Messung verschiedener Chargen lyophilisierter Lipoplexe. DAC-30-haltige Chargen: DAC-30/DNA 5:1 (w/w), DC-30-haltige Chargen: DC-30/DNA 4:1 (w/w)

#### 4.1.5.2. PICOGREEN-ASSAY

Der PicoGreen-Assay ist ein Verfahren zur Quantifizierung sehr kleiner Mengen doppel- und einzelsträngiger DNA. Durch Assoziation von PicoGreen-Reagenz mit DNA kommt es zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Um zu prüfen, ob das Verfahren für die Quantifizierung von DNA in redispergierten lyophilisierten Lipoplexen brauchbar ist, wurden einige Vorversuche unternommen.

Die Analytik der Proben erfolgte in Zwittergent-haltigem Tris-Puffer pH 7,0 (Endkonzentration Zwittergent im Assay 0,1%), um die Lipoplexe zu zerstören und die DNA für den Farbstoff zugänglich zu machen. Zwittergent in dieser Konzentration hat keinen Einfluss auf das Fluoreszenzsignal von reiner DNA (Ferrari et al. 1998).

Es sollte herausgefunden werden, ob die Ausgangskonzentration der Lipoplexe einen Einfluss auf das Ergebnis hatte. Dazu wurden Lipoplexe aus DC-30 und GFP-exprimierendem Plasmid im Verhältnis 5:1 (w/w) mit zwei verschiedenen DNA- und entsprechenden Lipidkonzentrationen hergestellt ( $c_{DNA} = 25$  und  $2 \mu\text{g/ml}$ ). Lyophilisierte Lipoplexe (DC-30/DNA 5:1 (w/w)) wurden mit Millipore-Wasser redispergiert ( $c_{DNA} = 25 \mu\text{g/ml}$ ). Die konzentrierten redispergierten Lipoplexe wurden mit TRM zusätzlich auf eine Endkonzentration von  $c_{DNA} = 2 \mu\text{g/ml}$  verdünnt. Die

Endkonzentration an DNA im Assay betrug 0,25 µg/ml, entsprechende Volumina wurden von konzentrierten und verdünnten Lipoplexen eingesetzt.

In Tabelle 4-4 ist zu erkennen, dass die Lipoplexkonzentration keinen Einfluss auf die Wiederfindung hatte. Anhand der Abweichung lässt sich erkennen, dass mit redispergierten lyophilisierten Proben einheitlichere Ergebnisse erhalten wurden, als mit den in kleinem Maßstab durch Pipettieren hergestellten Lipoplexen.

Herstellungsart	DNA-Konzentration in Ausganglipoplexen [µg/ml]	DNA-Konzentration im Assay [µg/ml]	Wiederfindung [%]	sd [%]
kleiner Maßstab	25	0,25	89,5	10,28
kleiner Maßstab	2	0,25	93,0	3,3
großer Maßstab	25	0,25	102,4	1,84
großer Maßstab	2	0,25	100,9	1,96

Tabelle 4-4 PicoGreen-Assay: Wiederfindung von DNA in unterschiedlich hergestellten Lipoplexen (kleiner Maßstab durch Pipettieren und großer Maßstab durch kontinuierliches Mischen mit anschließender Lyophilisation) mit verschiedenen DNA-Ausgangskonzentrationen ( $C_{\text{DNA}} = 25$  und  $2 \mu\text{g/ml}$ ), Verhältnis DC-30/DNA 5:1 (w/w)

Zusätzlich wurde untersucht, ob die Art der Redispergierung lyophilisierter Lipoplexe (mit Millipore-Wasser; Lipoplexe bleiben intakt oder mit NaAc-Puffer (pH 6,0), 0,1% Zwittergent; Lipoplexe werden zerstört) sich auf die Wiederfindung auswirkte. In Tabelle 4-5 ist zu erkennen, dass die Art der Aufnahme keine Rolle spielt, da bei den Versuchsbedingungen des Assays die Lipoplexe ausreichend zerstört wurden.

Art der Redispersierung der lyophilisierten Lipoplexe	DNA-Konzentration in Ausgangslipoplexten [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]	DNA-Konzentration im Assay [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]	Wiederfindung [%]	sd [%]
Millipore-Wasser	25	0,25	102,3	3,95
NaAc-Puffer (pH 6,0), 0,1% Zwittergent	25	0,25	102,3	2,90

Tabelle 4-5 PicoGreen-Assay; Wiederfindung von DNA aus verschiedenen redispersierten lyophilisierten Lipoplexten (Millipore-Wasser und NaAc (pH 6,0), 0,1% Zwittergent) mit gleichen DNA-Ausgangskonzentrationen ( $c_{\text{DNA}} = 25 \mu\text{g}/\text{ml}$ )

Die Wiederfindungsrate von DNA in DC-30-haltigen Lipoplexten, die in verschiedenen Verhältnissen durch Pipettieren hergestellt wurden (DC-30/DNA 1:1, 5:1, 10:1 (w/w)) erbrachte, dass eine zunehmende Komplexierung der DNA sich nicht auf die Wiederfindung auswirkte. Die gewählte Zwittergentkonzentration im Assay war demnach hoch genug, um die komplette DNA aus den Lipoplexten dem Farbstoff zugänglich zu machen (Tabelle 4-6). Allerdings wichen die Wiederfindungswerte teilweise deutlich vom 100%-Wert ab. Dies könnte durch die vielen Pipettierschritte, die zur Herstellung der Lipoplexe und zur Probenherstellung für den Assay notwendig waren, bedingt sein.

Verhältnis DC-30/DNA (w/w)	Lipid-Konzentration in Ausgangslipoplexten [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]	DNA-Konzentration in Ausgangslipoplexten [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]	DNA-Konzentration im Assay [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]	Wiederfindung [%]	sd [%]
1:1	25	25	0,25	103,1	0,64
5:1	125	25	0,25	91,3	1,28
10:1	250	25	0,25	95,3	1,92

Tabelle 4-6 PicoGreen-Assay; Wiederfindung von DNA in Lipoplexten mit unterschiedlichen Verhältnissen Lipid/DNA (w/w): 1:1, 5:1 und 10:1

#### 4.1.5.3. BEWERTUNG DER METHODEN ZUR DNA-QUANTIFIZIERUNG

Die Ermittlung des DNA-Gehaltes in redispergierten lyophilisierten Lipoplexen ist ein sehr schnelles Verfahren. Die Methode führt zu einheitlichen Wiederfindungsraten. Allerdings konnten nur Proben analysiert werden, die in NaAc-Puffer (pH6,0), 0,1% Zwittergent redispergiert wurden. Die Aufnahme der Proben in Millipore-Wasser und anschließendes Verdünnen in Zwittergent-haltigem Puffer zur Zerstörung der Lipoplexe hätte zu einer nicht ausreichend hohen Konzentration für eine UV-metrische Bestimmung geführt.

Die Durchführung des PicoGreen-Assays ist wesentlich aufwändiger als die UV-spektroskopische Bestimmung. Jedoch wurden auch mit dieser Methode einheitliche Ergebnisse erzielt. Ein deutlicher Vorteil ist die höhere Sensitivität, es können wesentlich geringere DNA-Konzentrationen bestimmt werden. Außerdem können sowohl in Millipore-Wasser wie auch in NaAc-Puffer (pH6,0), 0,1% Zwittergent redispergierte Proben bestimmt werden.

#### 4.1.6. STABILITÄT UND LAGERFÄHIGKEIT LYOPHILISierter LIPOPLEXE

Im Hinblick auf eine Herstellung im großen Maßstab ist eine gute Lagerfähigkeit unerlässlich. Das Produkt darf sich über den gelagerten Zeitraum nicht verändern. Unterscheiden sich Lagerform und Applikationsform, so wie es bei Lyophilisaten der Fall ist, so muss für beide Formen der Erhalt der Eigenschaften gewährleistet sein.

Um eine Aussage über die Stabilität und Lagerfähigkeit lyophilisierter Lipoplexe zu erhalten, wurden zwei Chargen mit entweder DAC-30 oder DC-30 hergestellt (siehe Tabelle 4-7).

Chargenbezeichnung	Lipid	Verhältnis Lipid/DNA [w/w]
E06103dc	DC-30	5:1
E06103dac	DAC-30	5:1

Tabelle 4-7 Lipoplexchargen mit DC-30 bzw. DAC-30 und GFP-exprimierendem Plasmid, hergestellt durch kontinuierliches Mischen und anschließende Lyophilisation, zur Untersuchung der Stabilität

Die Lyophilisate wurden bei 4 °C gelagert und für die Untersuchungen redispergiert. Die Entwicklung der Produkteigenschaften wurde über 11 Monate (bzw. 18 Monate

bezüglich des Zetapotentials) hinweg verfolgt. Transfektionseffizienz und Zytotoxizität wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Partikelgröße wurde durch PCS-Messung untersucht. Die Bestimmung des Lipidgehaltes wurde über die Quantifizierung des DOPE-Anteils mittels Fluorescamin-Assay durchgeführt und der DNA-Gehalt wurde UV-spektroskopisch bestimmt. Die Ergebnisse für die einzelnen Untersuchungsparameter werden im folgenden Teil beschrieben.

#### 4.1.6.1. TRANSFEKTIONSEFFIZIENZ UND ZYTOTOXIZITÄT

Der Erhalt der biologischen Aktivität ist die Voraussetzung für die Lagerfähigkeit von lyophilisierten Lipoplexen. Ebenso wichtig ist, dass die Zytotoxizität mit zunehmender Lagerzeit nicht ansteigt.

Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz und der Zytotoxizität wurden die lyophilisierten Lipoplexe nach 3.2.1.1 mit sterilem Millipore-Wasser redispergiert und mit TRM auf eine Konzentration von 2 µg/ml DNA verdünnt. Transfektion und Auswertung erfolgten wie unter 3.4.1.2 beschrieben.

In Abbildung 4.1.6-1 wird deutlich, dass die Transfektionseffizienz beider Chargen über den untersuchten Zeitraum nicht abnahm. Dies bestätigte vorausgehende Untersuchungen, in denen die Transfektionseffizienz lyophilisierter Lipoplexe initial und nach 18 Monaten untersucht worden waren (Clement et al. 2005). Es ist erkennbar, dass sich für die unterschiedlichen Chargen ähnliche Muster ergaben, sowohl für die Transfektionseffizienz, als auch für die Zytotoxizität. Die Effizienz-Werte lagen in den ersten drei Monaten deutlich niedriger als in den folgenden Monaten. Besonders niedrige Werte wurden nach drei Monaten Lagerzeit erhalten. Die Transfektion mit der Charge E06103dac erbrachte deutlich höhere Werte als die der Charge E06103dc.



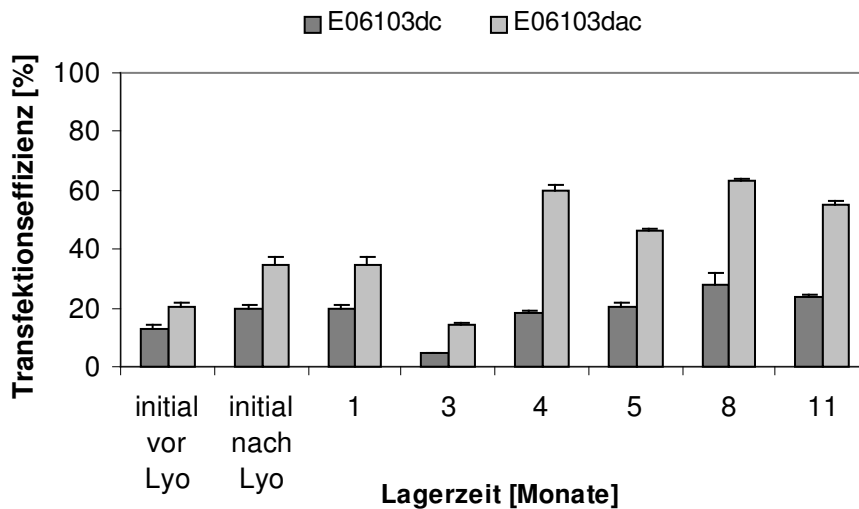


Abbildung 4.1.6-1 FACS-Analyse (GFP): Transfektionseffizienz der Chargen E06103dc und E06103dac in A-10 SMC vor und nach der Lyophilisation, sowie nach 1 bis 11 Monaten Lagerzeit

Für die Zytotoxizität ergaben sich gegenläufige Ergebnisse, die Werte der ersten drei Monate lagen etwas höher, der Wert initial nach der Lyophilisation deutlich am höchsten (Abbildung 4.1.6-2). Allerdings ließ sich keine direkte Korrelation mit der Transfektionseffizienz feststellen. Die niedrigen Effizienzwerte nach drei Monaten gingen nicht einher mit einem deutlich erhöhten Toxizitätswert. Die Charge E06103dc wirkte sich leicht toxischer auf die A-10 SMC aus als die Charge E06103dac.

Der Vergleich von toten unbehandelten Kontrollzellen und toten transfizierten Zellen erbrachte ebenfalls nur sehr geringe Unterschiede. Bei der Auswertung nach 11 Monaten waren mehr tote Kontrollzellen als tote transfizierte Zellen zu verzeichnen. Durch die schlechte Verfassung der Zellen zu diesem Zeitpunkt kann auch der leicht Anstieg der zytotoxischen Auswirkung der Transfektion mit beiden Chargen erklärt werden.

Es ist bemerkenswert, dass sich beide Chargen annähernd gleich toxisch auf die Zellen auswirkten, die Transfektionseffizienzen jedoch deutlich unterschiedlich waren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Zustand der Zellen nicht durch die Expressionsaktivität bedingt wurde.

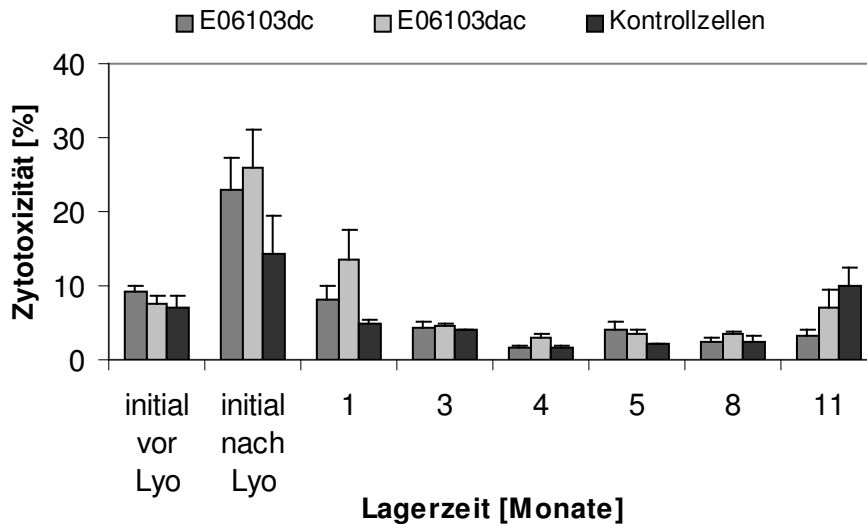


Abbildung 4.1.6-2 FACS-Analyse (7-AAD): Zytotoxizität der Chargen E06103dc und E06103dac in A-10 SMC vor und nach der Lyophilisation, sowie nach 1-11 Monaten Lagerzeit

Insgesamt machen die erhaltenen Ergebnisse deutlich, dass die biologische Aktivität über den untersuchten Zeitraum nicht abnahm. Die Zytotoxizität blieb, vor allem bei 3-8 Monaten Lagerzeit, größtenteils unverändert. Der Anstieg bei 11 Monaten Lagerzeit ist vermutlich auf die nicht optimale Verfassung der Zellen im Assay zurückzuführen, was auch die Komplexität eines Bio-Assay belegt. Der Vergleich der toten transfizierten Zellen mit den toten Kontrollzellen zeigt ebenfalls, dass die biologische Aktivität und die Auswirkungen der Lipoplexe auf die Zellen maßgeblich durch den Zustand der Zellen bedingt sind und etwaige unterschiedliche Ergebnisse der gleichen Chargen nicht eine verminderte Stabilität bedeuten müssen.

#### 4.1.6.2. PARTIKELGRÖSSE

Die Partikelgröße wurde als Maß für die Homogenität der redispergierten lyophilisierten Lipoplexe untersucht. Abbildung 4.1.6-4 lässt erkennen, dass die Partikelgröße innerhalb der Chargen zu den verschiedenen Messzeitpunkten zwar in gewissem Maße uneinheitlich war (Schwankungen von 320-590 nm in der Charge E06103dc und von 350-480 nm in der Charge E06103dac). Jedoch ließ sich mit zunehmender Lagerzeit der Lyophilisate nach Redispergierung kein Trend zu einer Zu- oder Abnahme der Partikelgröße erkennen. Besonders die Partikelgrößen direkt vor- und nach der Lyophilisation sind etwas kleiner, als die zu den anderen Untersuchungszeitpunkten. Es ließ sich keine Korrelation mit der Transfektionseffizienz erkennen, da die Partikelgrößen nach 2 und 3 Monaten

Lagerzeit nicht deutlich kleiner waren, als die zu späteren Zeitpunkten, die Transfektionseffizienz zu diesen Zeitpunkten aber für beide Chargen am geringsten war. Der Größenunterschied der Chargen untereinander war nicht deutlich ausgeprägt und es war kein Trend einer Charge zu größeren Partikeln sichtbar.

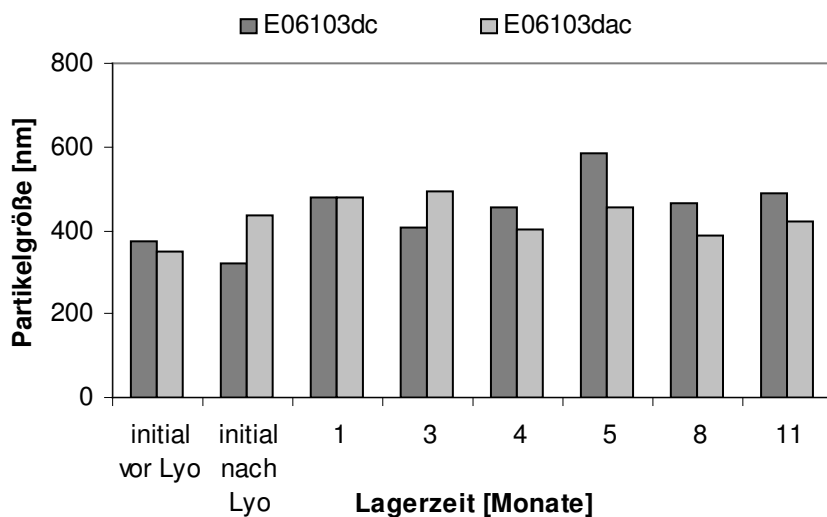


Abbildung 4.1.6-3 PCS: Partikelgrößen der Chargen E06103dc und E06103dac in A-10 SMC vor und nach der Lyophilisation, sowie nach 1-11 Monaten Lagerzeit

#### 4.1.6.3. ZETAPOTENTIAL

In Abbildung 4.1.6-4 sind die Zetapotentiale der frisch hergestellten Lipoplexe der Chargen E06103dc und E06103dac initial nach der Herstellung, sowie der redispergierten lyophilisierten Lipoplexe direkt nach der Lyophilisation und nach 18 Monaten Lagerzeit wiedergegeben. Die anfänglichen Werte der beiden Chargen wichen etwas deutlicher voneinander ab, das Zetapotential der DAC-30-haltigen Charge lag um ca. 20 mV niedriger, als das der DC-30-haltigen. Nach 18 Monaten Lagerzeit lagen die Zetapotentiale jedoch nah beieinander und zahlenmäßig im gleichen Bereich von ca. -70 mV, es war also keine grundlegende Veränderung des Zetapotentials zu erkennen.

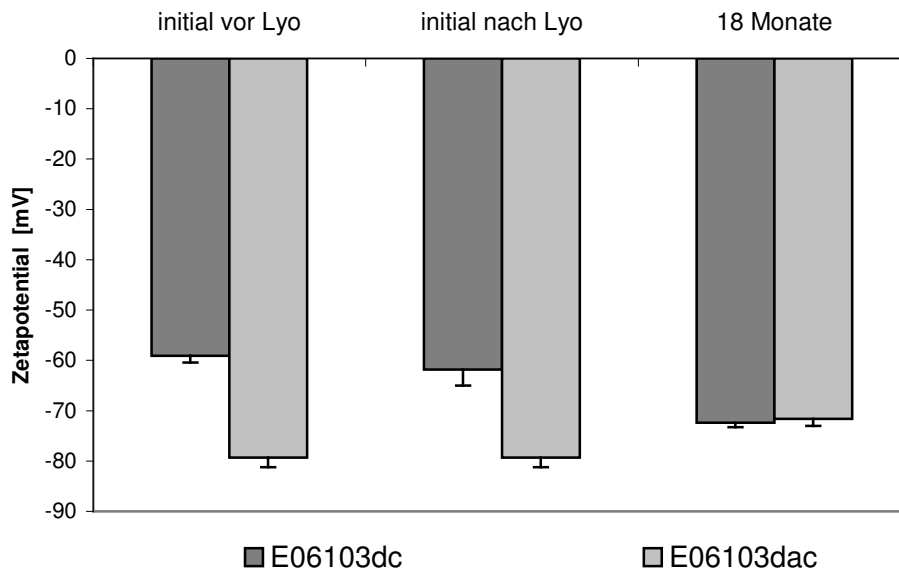


Abbildung 4.1.6-4 Zetapotentiale der Chargen E06103dc und E06103dac direkt nach der Herstellung vor Lyophilisation, direkt nach der Lyophilisation und nach 18 Monaten Lagerzeit

#### 4.1.6.4. LIPIDGEHALT MIT FLUORESCAMIN-ASSAY

Durch die Bestimmung des DOPE-Gehaltes mit Hilfe des Fluorescamin-Assays sollte festgestellt werden, ob der in den lyophilisierten Lipoplexen enthaltene Lipidgehalt sich mit zunehmender Lagerzeit veränderte. Die Bestimmung des Gehaltes erfolgte durch Bezug auf eine Kalibrationsgerade, die mit DAC-30 bzw. DC-30 enthaltenden Standarddispersionen erstellt wurde. Allerdings waren dies nicht die Lipiddispersionen, die auch zur Herstellung der Chargen verwendet wurden. Das kann eine Erklärung für die niedrigen DOPE-Wiederfindungsraten sein, die sowohl mit der Charge E06103dc als auch E06103dac erzielt wurden (Abbildung 4.1.6-5). In beiden Chargen konnten mit dem Assay nur ca. 70-80% des eingesetzten DOPE-Gehaltes wiedergefunden werden. Bezüglich der Stabilität ließ sich jedoch feststellen, dass die Ergebnisse zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten zwar etwas schwankten, insgesamt war aber keine Abnahme des DOPE-Gehaltes mit zunehmender Lagerzeit zu verzeichnen.

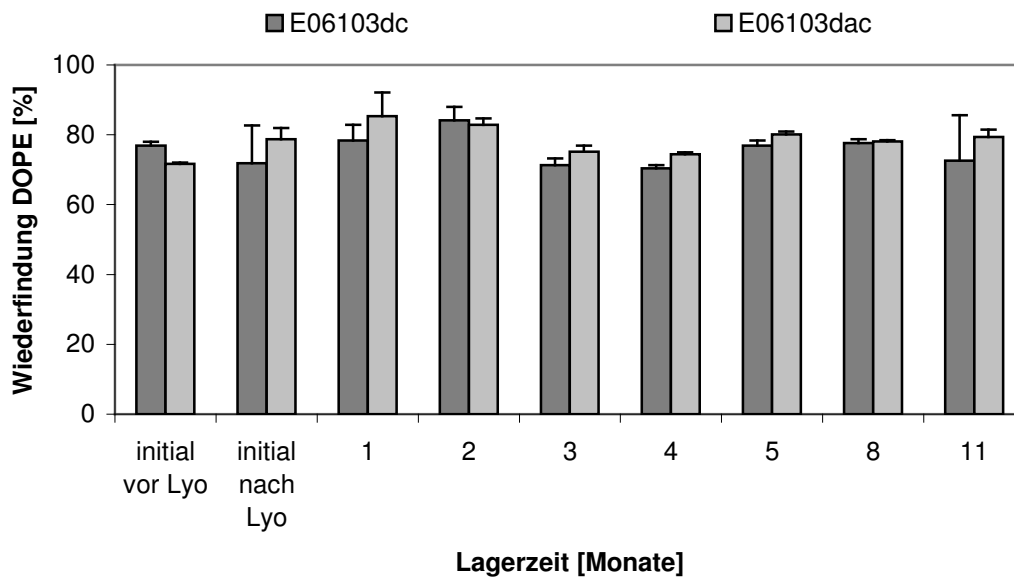


Abbildung 4.1.6-5 Fluorescamin-Assay: DOPE-Wiederfindung in den Chargen E06103dc und E06103dac direkt nach der Herstellung vor der Lyophilisation, direkt nach der Lyophilisation und nach 1-11 Monaten Lagerzeit

#### 4.1.6.5. DNA-GEHALT DURCH UV-MESSUNG

Die Untersuchung des DNA-Gehaltes durch Redispergierung der Lyophilisate mit NaAc-Puffer pH 6,0, 0,1% Zwittergent zu verschiedenen Messzeitpunkten erbrachte ähnliche Ergebnisse wie die der DOPE-Quantifizierung. Es konnte ebenfalls nur ca. 75% (E06103dc) bzw. 70% (E06103dac) der eingesetzten DNA-Menge wiedergefunden werden (Abbildung 4.1.6-6). Der Ausgangsgehalt der DNA-Lösung zur Herstellung der Lipoplexe war wiederum nicht bekannt und die Werte konnten dementsprechend nur auf die theoretisch eingesetzte Konzentration bezogen werden. Jedoch waren die Ergebnisse sehr stabil, es war keine Veränderung mit zunehmender Lagerzeit feststellbar.

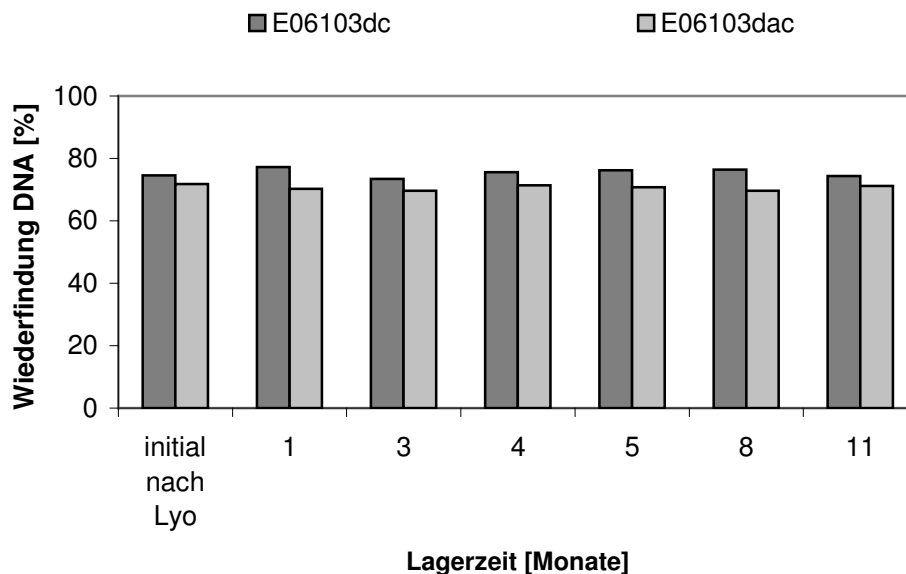


Abbildung 4.1.6-6 UV-Messung: DNA-Wiederfindung in den Chargen E06103dc und E06103dac direkt nach der Lyophilisation und nach 1-11 Monaten Lagerzeit

#### 4.1.7. REPRODUZIERBARKEIT DES SCALE-UP VERFAHRENS UND VERGLEICHBARKEIT DER METHODEN

Aus den vorangegangenen Untersuchungen war hervorgegangen, dass Lipoplexe, die durch die kontinuierliche Herstellungsmethode produziert wurden, teilweise erhebliche Unterschiede bezüglich der theoretisch eingesetzten und der ermittelten Konzentrationen (Lipid und DNA) aufwiesen.

Um die Reproduzierbarkeit der kontinuierlichen Herstellungsmethode und die Vergleichbarkeit der analytischen Methoden zu untersuchen, wurden je drei Chargen mit DAC-30 bzw DC-30 hergestellt und anschließend lyophilisiert (Tabelle 4-8).

Chargenbezeichnung	eingesetztes Lipid	eingesetztes Plasmid	Verhältnis Lipid/Plasmid (w/w)
E11015dac	DAC-30	pEGFP	5:1
E18015dac	DAC-30	pEGFP	5:1
E25015dac	DAC-30	pEGFP	5:1
E11015dc	DC-30	pEGFP	5:1
E18015dc	DC-30	pEGFP	5:1
E25015dc	DC-30	pEGFP	5:1

Tabelle 4-8 Zusammensetzung (Lipid und GFP-exprimierendes Plasmid) und Bezeichnung der Chargen zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit des scale-up-Verfahrens und zur Vergleichbarkeit der Methoden

Die Konzentrationen der Lipid- und DNA-Ausgangslösungen wurden ermittelt, um auf die tatsächlich in den Lipoplexen nach der Herstellung vorhandenen Konzentrationen an DNA und Lipid schließen zu können. Der DOPE-Anteil in den DC-30 bzw. DAC-30-Lösungen wurde mittels Bartlett-Assay bestimmt. Daraus wurde der Gesamtlipidgehalt ermittelt, da DOPE und Cholesterol-Derivate in DAC-30 und DC-30 im Verhältnis 7:3 (w/w) enthalten sind. Die DNA-Konzentration in der Ausgangslösung wurde durch UV-Messung ermittelt.

Die Kalibrationsgeraden zur Berechnung der Wiederfindungsraten von DOPE und DNA in den redispergierten lyophilisierten Proben wurden aus den selben Lösungen ermittelt, die zur Lipoplexherstellung eingesetzt wurden.

In Tabelle 4-9 sind die theoretisch ermittelten Konzentrationen der Lipiddispersionen vor und nach der Extrusion, sowie der verdünnten DNA-Lösung, die zur Herstellung der Lipoplexe verwendet wurde, aufgeführt.

Charge	$C_{\text{Lipid}}$ eingesetzt, vor und nach Extrusion [mg/ml]	$C_{\text{Lipid}}$ ermittelt, vor Extrusion [mg/ml]	$C_{\text{Lipid}}$ ermittelt, nach Extrusion [mg/ml]	$C_{\text{DNA}}$ verdünnt, eingesetzt [mg/ml]	$C_{\text{DNA}}$ verdünnt, ermittelt [mg/ml]
E11015dac	0,25	n.e.	0,196	0,05	0,0488
E18015dac	0,25	0,244	0,199	0,05	0,0496
E25015dac	0,25	0,278	0,226	0,05	0,0473
E11015dc	0,25	n.e.	0,137	0,05	0,0509
E18015dc	0,25	0,238	0,194	0,05	0,0496
E25015dc	0,25	0,289	0,196	0,05	0,0473

Tabelle 4-9 Theoretisch eingesetzte und ermittelte Konzentrationen der Lipiddispersionen vor und nach Extrusion, sowie der verdünnten DNA-Lösungen zur Herstellung der Chargen im großen Maßstab

Bei allen Chargen bestand eine recht deutliche Diskrepanz zwischen theoretisch eingesetztem und ermitteltem Lipidgehalt. Für die schlechten Wiederfindungsraten kommen mehrere Gründe in Betracht. Zum einen war es schwierig zu überprüfen, ob die lyophilisierten Ausgangslipide komplett redispergiert wurden. Schon kleine Mengen, die unerkannt im Gefäß zurück blieben oder nicht vollständig dispergiert wurden, konnten zu deutlichen Konzentrationsveränderungen führen. Ein weiterer kritischer Punkt war die Extrusion des Lipids. Konzentrationsbestimmungen vor und nach der Extrusion machten deutlich, dass bei diesem Prozessschritt erhebliche Verluste zu verzeichnen waren. Unklar war jedoch, ob die Verluste dadurch zustande kamen, dass Lipid an der Membran hängen blieb, oder ob Reste von TRM, welches zur Spülung der Schläuche und des Filtersystems vor der Extrusion eingesetzt wurde, in dem System zurückblieben und die Lipiddispersion zusätzlich verdünnte. Angesichts dieser Erkenntnisse wird deutlich, dass es von großer Wichtigkeit ist, die Konzentrationen der Lipid- und DNA-Ausgangslösungen mit einem möglichst raschen und zuverlässigen Verfahren zu bestimmen, um so eventuell die Konzentrationen für die gewünschten Lipid/DNA-Verhältnisse (w/w) anzupassen.



#### 4.1.7.1. TRANSFEKTIONSEFFIZIENZ UND ZYTOTOXIZITÄT

Die Ermittlung der biologischen Aktivität und der Zytotoxizität der Chargen erfolgte jeweils direkt nach der Herstellung vor der Lyophilisation und direkt nach der Lyophilisation. Diese Untersuchungen wurden demnach an verschiedenen Tagen durchgeführt. Wie aus Abbildung 4.1.7-1 ersichtlich reichten die Effizienzen der DC-Chargen von 3-15% und die der deutlich effizienteren DAC-Chargen von 16-40%. Die Transfektionseffizienzen der DC- und DAC-Chargen waren somit sehr uneinheitlich.

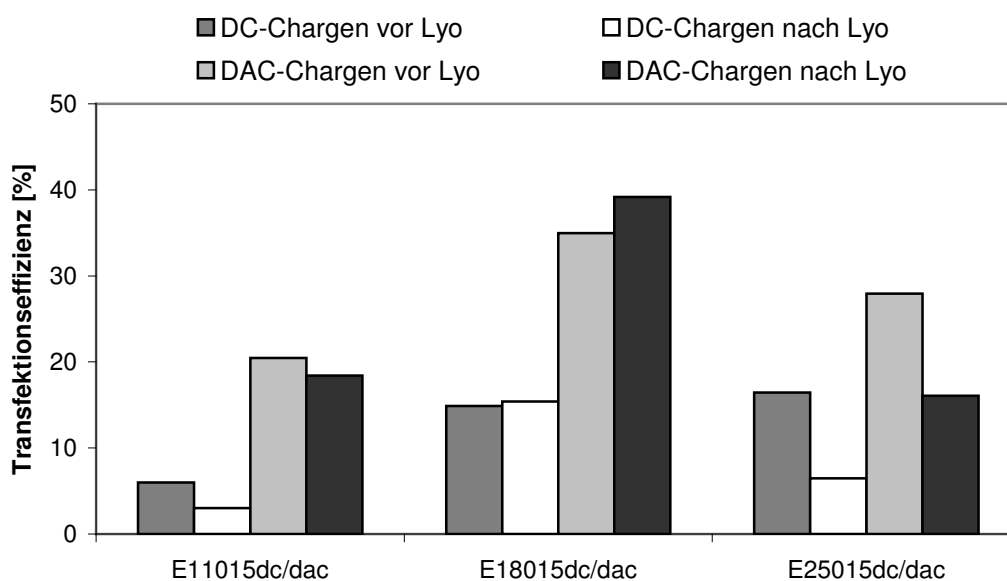


Abbildung 4.1.7-1 Durchflusszytometrie (GFP): Transfektionseffizienzen der Chargen E11015dc und -dac, E18015dc und -dac, sowie E25015dc und -dac vor und nach der Lyophilisation; verschiedene Versuchstage und Zellen

Trotz der deutlich unterschiedlichen biologischen Aktivitäten wirkten sich die Chargen nicht signifikant verschieden toxisch auf die Zellen aus (Abbildung 4.1.7-2). Lediglich die Chargen E11015dc und -dac zeigten sich vor der Lyophilisation deutlich toxischer als die übrigen Chargen vor und nach der Lyophilisation, sowie die selben Chargen nach der Lyophilisation. Eine Erklärung konnte hierfür nicht gefunden werden, da die Kontrollzellen der entsprechenden Untersuchungen keine höheren Toxizitätswerte erbrachten (Daten nicht gezeigt) und die erhöhten Werte somit nicht durch einen schlechten Zustand der Zellen bedingt sein konnten.

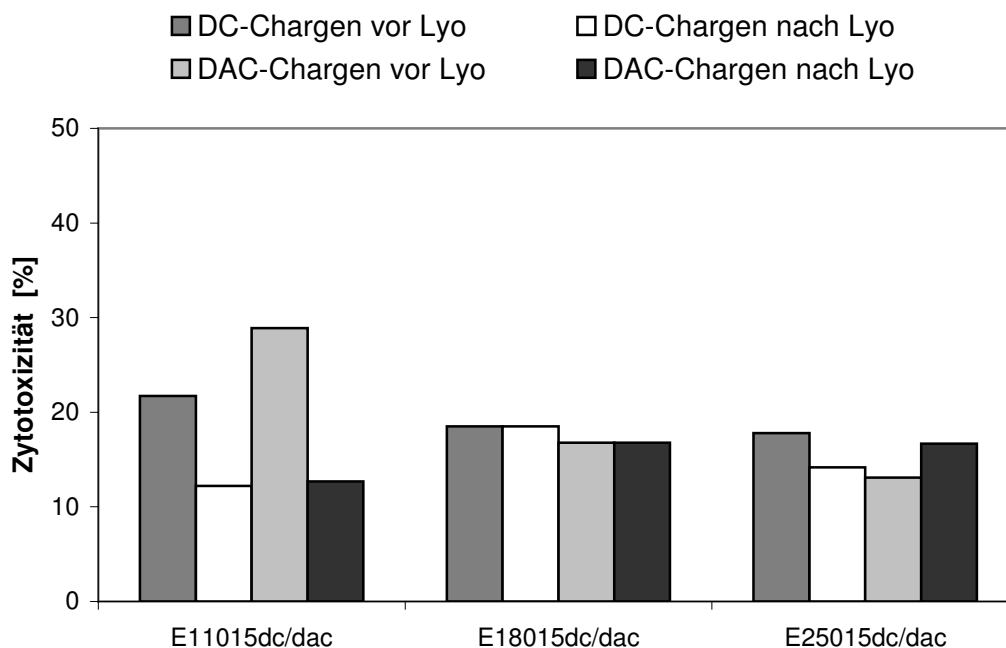


Abbildung 4.1.7-2 Durchflusszytometrie (7-AAD): Zytotoxizität der Chargen E11015dc und -dac, E18015dc und -dac, sowie E25015dc und -dac vor und nach der Lyophilisation; verschiedene Versuchstage und Zellen

Um herauszufinden, ob die unterschiedlichen Transfektionseffizienzen der Chargen u.U. auf die Zustände der Zellen bei den jeweiligen Untersuchungen zurückzuführen waren, wurden alle Chargen gemeinsam am gleichen Tag mit den gleichen Zellen untersucht. Zum Vergleich wurden die Charge E06103dc und -dac, die in vorangehenden Untersuchungen gute Ergebnisse erbracht hatten (siehe 4.1.6.1) analysiert.

Es ergab sich nur bei dem Ergebnis der Chargen E11015dc und -dac ein deutlicher Anstieg der Effizienz von 15%, wie aus Abbildung 4.1.7-3 und Abbildung 4.1.7-1 zu entnehmen ist. Alle anderen Chargen erbrachten Werte in den zuvor ermittelten Bereichen.

Die Charge E06103dac zeigte deutlich höhere Werte als die anderen DAC-30-haltigen Chargen. Keine besseres Ergebnisse wurden allerdings mit der Charge E06103dc erreicht.

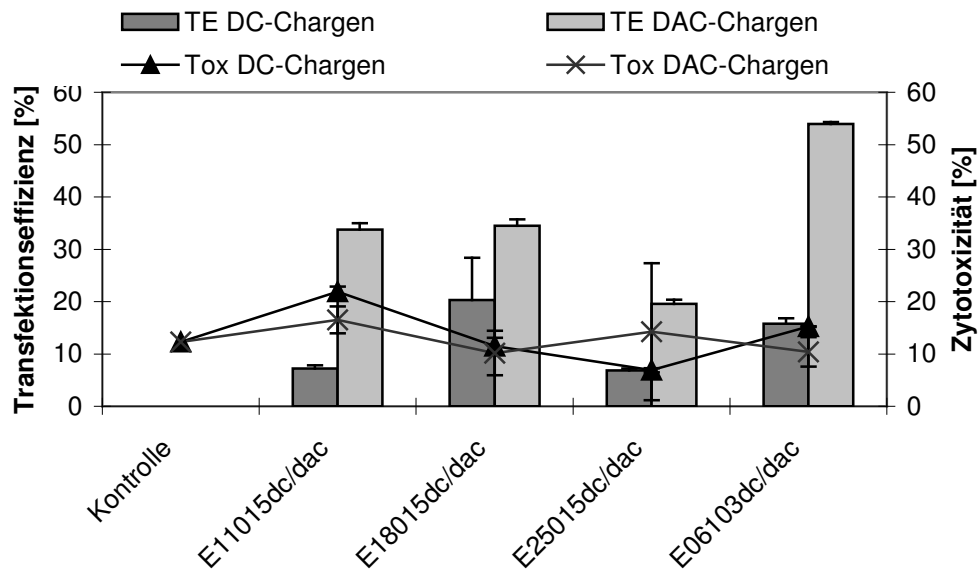


Abbildung 4.1.7-3 Durchflusszytometrie (GFP und 7-AAD): Vergleich der Transfektionseffizienz und Zytotoxizität der Chargen E11015dc und -dac, E18015dc und -dac, E25015dc und -dac, sowie E06103dc und -dac; gleicher Versuchstag und Zellen

Durch die uneinheitlichen Konzentrationen der Lipidausgangsdispersionen zur Herstellung der Lipoplexe wurden Chargen mit unterschiedlichen Ladungsverhältnissen (+/-) produziert (siehe Tabelle 4-10). Diese wichen ebenfalls deutlich von dem geplanten Masseverhältnis von 5:1 bzw. dem Ladungsverhältnis von 1:1 ab.

Charge	Verhältnis	Verhältnis	Verhältnis	Verhältnis
	Lipid:DNA (w/w) soll	Lipid:DNA (w/w) ist	Lipid:DNA (+/-) soll	Lipid:DNA (+/-) ist
E11015dac	5,0	4,0	1:1	0,8:1
E18015dac	5,0	4,2	1:1	0,8:1
E25015dac	5,0	3,5	1:1	0,7:1
E11015dc	5,0	2,8	1:1	0,5:1
E18015dc	5,0	4,1	1:1	0,8:1
E25015dc	5,0	4,0	1:1	0,8:1

Tabelle 4-10 Theoretische und tatsächliche Ladungsverhältnisse der Chargen E11015dc und -dac, E18015dc und -dac, sowie E25015dc und -dac nach Ermittlung der Konzentrationen der Ausgangslösungen (DNA und Lipid) zur Herstellung der Chargen

In einer Vielzahl von Publikationen wird die Auswirkung der Ladungsverhältnisse auf die biologische Aktivität von Transfektionssystemen diskutiert. Aus den hier ermittelten Ergebnissen ließ sich dies nicht als einziger Grund für die unterschiedlichen Transfektionsergebnisse festhalten. Die Charge E11015dc wies das am stärksten abweichende Ladungsverhältnis auf (0,5:1), führte aber nicht zu einer schlechteren Transfektionsrate, als die Charge E25015dc mit einem deutlich höheren Ladungsverhältnis (0,8:1). Die Effizienzen der Chargen E18015dc und E25015dc unterschieden sich hingegen trotz der gleichen Ladungsverhältnisse deutlich. Ähnliche Beobachtungen konnten auch für die DAC-Chargen gemacht werden, trotz annähernd gleicher Ladungsverhältnisse unterschieden sich die erzielten Transfektionseffizienzen teilweise erheblich.

#### 4.1.7.2. PARTIKELGRÖSSE UND STRUKTUR

##### 4.1.7.2.1. PCS

Die durch PCS gemessenen mittleren Durchmesser der im kontinuierlichen Verfahren hergestellten Lipoplexe vor der Lyophilisation waren sehr homogen. Sie lagen in den gleichen Bereichen der Partikelgrößen von bereits untersuchten Chargen im Rahmen dieser und anderer Arbeiten (siehe 4.1.2.1.2, (Kiefer 2003)). Die Größen der DC-30-haltigen Chargen bewegten sich im Bereich von 430-450 nm, die der DAC-30-haltigen Chargen lagen etwas darunter im Bereich von 350-390 nm. Auch die Charge E11015dc, die ein deutlich anderes Ladungsverhältnis aufweist, wich von dem Bereich der anderen Chargen nicht ab. Dies bestätigt die Ergebnisse aus 4.1.2.1.1, dass eine deutliche Zunahme der Partikelgröße erst ab einem Ladungsverhältnis von 4:1 (+/-) auftritt.

Die Herstellung von Lipoplexdispersionen mit reproduzierbaren Partikelgrößen ist also durch das kontinuierliche Herstellungsverfahren gegeben.

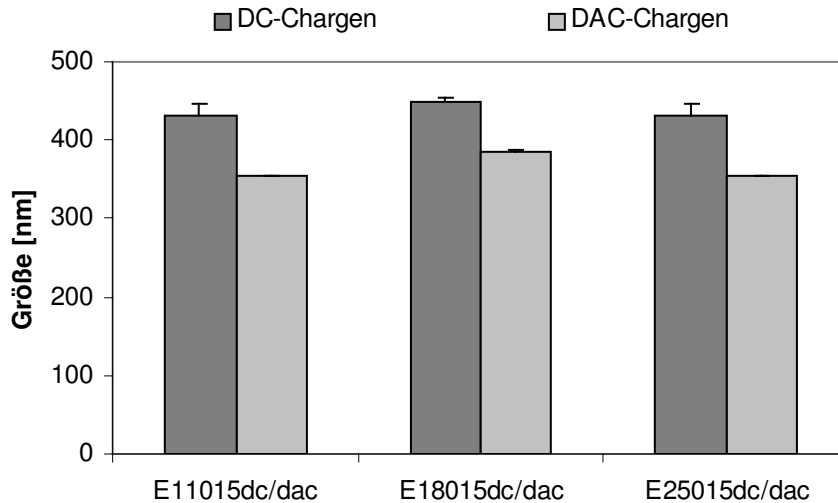


Abbildung 4.1.7-4 PCS: Mittlere Durchmesser der redispergierten lyophilisierten Lipoplexe der Chargen E11015dc und -dac, E18015dc und -dac, sowie E25015dc und -dac;

#### 4.1.7.2.2. CRYO-TEM

Um herauszufinden, ob durch das scale-up-Verfahren Lipoplexe mit reproduzierbaren Strukturen produziert werden konnten, wurden Cryo-TEM-Aufnahmen von verschiedenen DAC-30 haltigen Chargen im Verhältnis 5:1 (w/w) erstellt. Die Lyophilisate wurden mit Millipore-Wasser redispergiert, die Konzentrationen betragen 250  $\mu\text{g/ml}$  DAC-30 und 50  $\mu\text{g/ml}$  DNA. Wie aus Abbildung 4.1.7-5 ersichtlich waren in allen drei Chargen die gleichen Fingerprint-Strukturen zu erkennen (siehe auch 4.1.2.2). Auch die Größen lagen in einem ähnlichen Bereich.

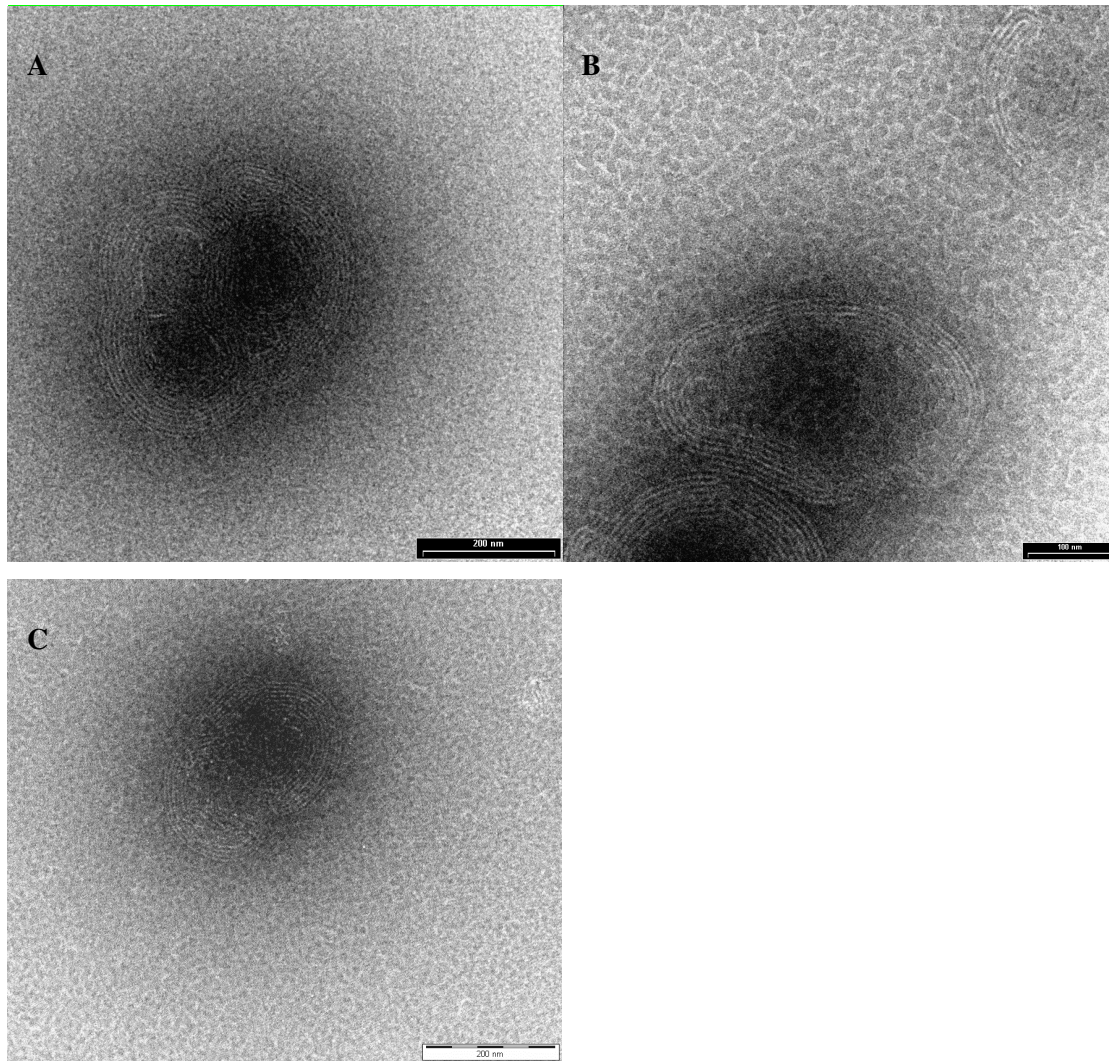
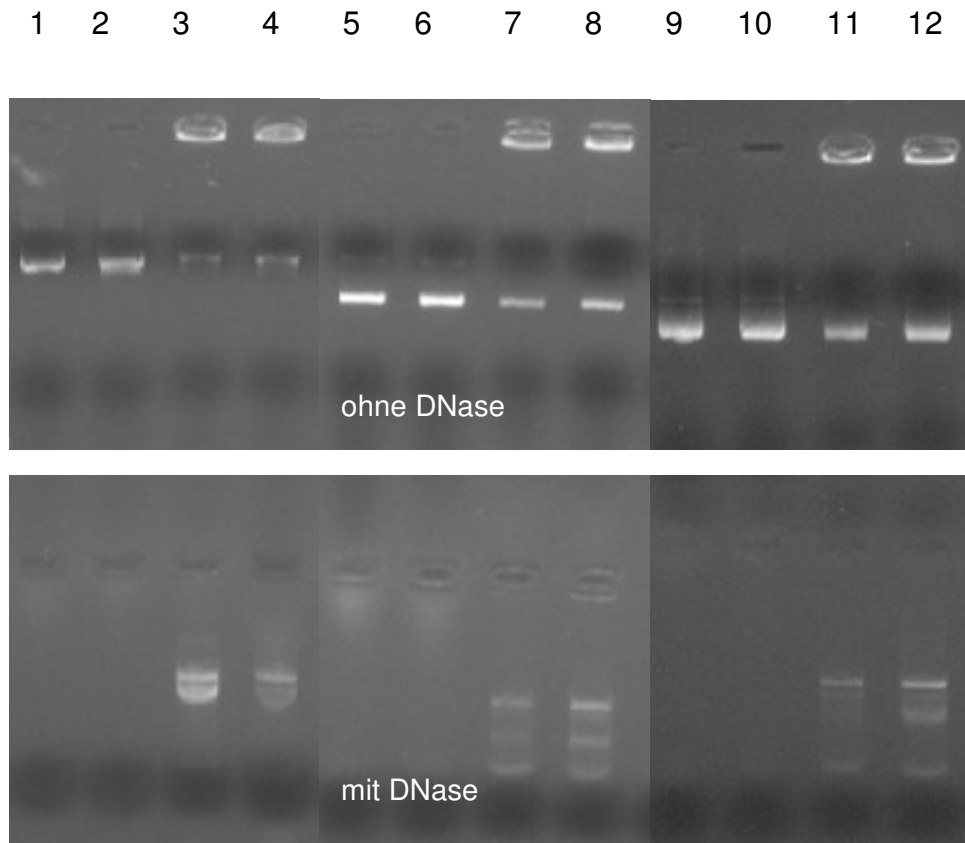


Abbildung 4.1.7-5 A, B und C: Cryo-TEM-Aufnahmen von verschiedenen Chargen in großem Maßstab hergestellter, redispergierter lyophilisierter Lipoplexe mit DAC-30, Lipid/DNA 5:1 (w/w),  $c_{DAC} = 0,25$  mg/ml, Balken entspricht 100 nm (A und B) bzw. 200 nm (C)

#### 4.1.7.2.3. AGAROSEGEL-ELEKTROPHORESE

Agarosegel-Elektrophorese wurde durchgeführt um zu ermitteln, ob die Lipoplexe der verschiedenen Chargen eine ähnliche Stabilität aufwiesen. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Lipoplexe gleichermaßen gegen einen Abbau durch Nuclease geschützt waren. Die Chargen wurden nach Redispergierung in Millipore-Wasser, sowie in NaAc-Puffer pH 6, 0,1% Zwittergent, mit (untere Reihe) und ohne (obere Reihe) DNase-Behandlung untersucht. Abbildung 4.1.7-6 zeigt, dass die DNA aller in Millipore-Wasser redispergierten Lipoplexe durch die Komplexierung mit den Lipidbestandteilen größtenteils an der Startposition zurückgehalten wird (obere Reihe, Bahnen 3 und 4, 7 und 8, 11 und 12). Auch bei den in Zwittergent-haltigem

NaAc-Puffer (pH 6,0) aufgenommenen Lipoplexen zeigte sich wie bei der Untersuchung des Herstellungsverfahrens (4.1.2.4.2) ermittelt, dass die Lipoplexe zerstört und dadurch die DNA freigesetzt wurde und durch das Gel laufen konnte (obere Reihe, Bahnen 1 und 2, 5 und 6, 9 und 10). Durch die enzymatische Behandlung wurde die zugängliche DNA der durch Zwittergent zerstörten Lipoplexe abgebaut (untere Reihe, Bahnen 1 und 2, 5 und 6, 9 und 10), wohingegen die DNA der intakten Lipoplexe durch das Gel gelaufen war und nicht völlig abgebaut, sondern nur teilweise degradiert wurde (untere Reihe, Bahnen 3 und 4, 7 und 8, 11 und 12). Ein unterschiedliches Verhalten der DAC-30 und DC-30-haltigen Chargen konnte wiederum nicht gefunden werden.



## Bahnen:

1: E11015dac redispergiert in NaAc-Puffer pH (6,0), 0,1% Zwittergent

2: E11015dc redispergiert in NaAc-Puffer pH (6,0), 0,1% Zwittergent

3: E11015dac redispergiert in Millipore-Wasser

4: E11015dc redispergiert in Millipore-Wasser

5: E18015dac redispergiert in NaAc-Puffer pH (6,0), 0,1% Zwittergent

6: E18015dc redispergiert in NaAc-Puffer pH (6,0), 0,1% Zwittergent

7: E18015dac redispergiert in Millipore-Wasser

8: E18015dc redispergiert in Millipore-Wasser

9: E25015dac redispergiert in NaAc-Puffer pH (6,0), 0,1% Zwittergent

10: E25015dc redispergiert in NaAc-Puffer pH (6,0), 0,1% Zwittergent

11: E25015dac redispergiert in Millipore-Wasser

12: E25015dc redispergiert in Millipore-Wasser

Abbildung 4.1.7-6 Agarosegel-Elektrophorese der Chargen E11015dac und -dc (Bahnen 1-4), E18015dac und -dc (Bahnen 5-8), sowie E11015dac und -dc (Bahnen 9-12) (Lipid/DNA 5:1 (w/w); untere Reihe mit, obere Reihe ohne DNase-Behandlung. Die Chargen wurden in Millipore-Wasser oder NaAc-Puffer (pH 6,0), 0,1% Zwittergent redispergiert.



#### 4.1.7.3. ZETAPOTENTIAL

Der Vergleich der Oberflächenladungen erbrachte keinen signifikanten Unterschied zwischen DAC-30 und DC-30-haltigen Chargen (Abbildung 4.1.7-7). Ebenso wenig ist ein deutlicher Unterschied der Zetapotentiale der an den verschiedenen Tagen hergestellten Lipoplexe zu erkennen. Wie schon bei der Partikelgröße ergab sich auch hier keine Beeinflussung des Zetapotentials durch das abweichende Ladungsverhältnis der Charge E11015dc. Allerdings wurde sowohl durch Zetapotentialmessungen, als auch durch den TNS-Assay ermittelt, dass eine Beeinflussung des Oberflächenpotentials erst in wesentlich höheren Ladungsverhältnissen (+/-) zu verzeichnen war (siehe 4.1.3.1.1 und 4.1.3.2.3). Diese Untersuchungen bestätigen jedoch die Homogenität der Lipoplexe, die durch das kontinuierliche Verfahren reproduzierbar hergestellt werden konnten.

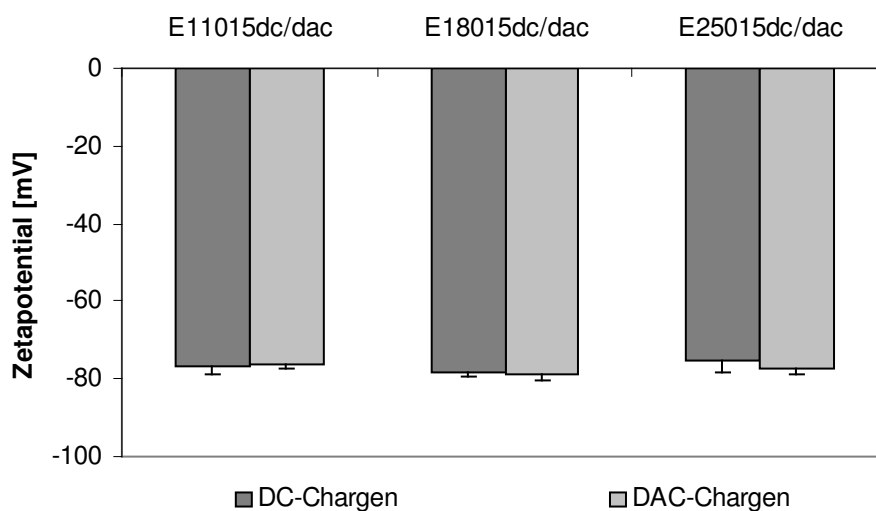


Abbildung 4.1.7-7 Zetapotentiale der redispergierten lyophilisierten Lipoplexe der Chargen E11015dc und-dac, E18015dc und-dac, sowie E25015dc und-dac

#### 4.1.7.4. LIPIDQUANTIFIZIERUNG MITTELS HPTLC, BARTLETT-ASSAY UND FLUORESCAMIN-ASSAY

Die Quantifizierung der Lipidanteile der Chargen E11015dc und -dac, E18015dc und -dac, sowie E25015dc und -dac wurde mit drei verschiedenen Verfahren durchgeführt um herauszufinden, ob die Ergebnisse der Methoden vergleichbar sind und sich gleichermaßen für die Charakterisierung der lyophilisierten Lipoplexe eignen. Der DOPE-Anteil wurde mittels Bartlett- und Fluorescamin-Assay bestimmt,

die HPTLC-Methode konnte zur Quantifizierung beider Lipidbestandteile (DOPE und DC-Cholesterol bzw. DAC-Cholesterol) eingesetzt werden.

Für die HPTLC-Methode wurden die Lipoplexe extrahiert. Zusätzlich zu den Lipoplexproben wurde ein DC-30 bzw. DAC-30-Standard auf die gleiche Weise extrahiert und die Proben wurden bei der Auswertung auf diesen Standardwert bezogen. Die Auswertung erfolgte wie unter 3.4.4.1 und 4.1.4.2.3 beschrieben. Die ermittelten Mengen wurden auf die tatsächlich eingesetzten Konzentrationen bezogen, die durch den Bartlett-Assay ermittelt worden waren.

In Tabelle 4-11 sind die mit der HPTLC ermittelten Vergleichswerte V für DOPE und DAC- bzw. DC-Cholesterol wiedergegeben.

Charge	V [DOPE]	V [DAC-Cholesterol]	V [DC-Cholesterol]
E11015dac	1,02	1,05	
E18015dac	0,99	0,98	
E25015dac	1,01	1,04	
E11015dc	0,94		1,00
E18015dc	0,99		1,14
E25015dc	0,82		1,05

Tabelle 4-11 HPTLC: ermittelte Vergleichswerte bezogen auf Standardwerte (DAC-30 bzw. DC-30) für DOPE und DAC-Cholesterol bzw. DC-Cholesterol aus extrahierten lyophilisierten Lipoplexen der Chargen E11015dc und -dac, E18015dc und -dac, sowie E25015dc und -dac

Die Vergleichswerte sowohl für DOPE, als auch für die Cholesterolderivate der untersuchten Chargen wichen nur sehr wenig von 1 ab. Lediglich der DOPE-Vergleichswert der Charge E25015dc und der DC-Cholesterol-Vergleichswert der Charge E18015dc zeigten größere Abweichungen. Die Vergleichswerte von DOPE und DAC-Chol der jeweiligen Chargen lagen sehr nah beieinander. Beide Lipidbestandteile wurden also in gleichem Maße wiedergefunden. Bei den DC-Chargen wichen diese Werte allerdings etwas stärker voneinander ab, DC-Cholesterol wurde in geringerem Maße wiedergefunden, als DOPE. Insgesamt ließ sich aber feststellen, dass bei Kenntnis der tatsächlichen Ausgangskonzentrationen zur Herstellung der Lipoplexe und bei Bezug der ermittelten Daten auf diese Werte, eine relativ gute Wiederfindung der Substanzen erzielt werden konnte.

Zur Ermittlung der DOPE-Konzentrationen in den gleichen lyophilisierten Proben mittels Bartlett-Assay wurden diese extrahiert und durch Nachspülen komplett in die zur Analyse verwendeten Gefäße überführt. So konnte davon ausgegangen werden, dass die gesamte DOPE-Menge, die in den Proben enthalten war, erfasst wurde. Die Quantifizierung des DOPE-Gehaltes mit dem Fluorescamin-Assay erfolgte durch den Bezug auf Kalibriergeraden, die mit den Lipid-Ausgangsdispersionen erstellt wurden, die zur Lipoplexherstellung verwendet worden waren. Die Ausgangskonzentration dieser Dispersionen waren mittels Bartlett-Assay genau bestimmt worden. In Tabelle 4-12 sind die Wiederfindungsraten, die mit dem Bartlett-Verfahren und dem Fluorescamin-Assay erhalten wurden, vergleichend wiedergegeben. Obwohl die durch den Bartlett-Assay erhaltenen Ergebnisse etwas höher lagen, als die durch den Fluorescamin-Assay ermittelten, waren die Wiederfindungsraten jedoch mit beiden Verfahren zufriedenstellend.

Charge	WF Bartlett-Assay [%]	sd [%]	WF Fluorescamin-Assay [%]	sd [%]
E11015dac	111,9	0,94	89,5	2,6
E18015dac	98,0	0,54	91	0,2
E25015dac	93,4	1,87	80,5	1,2
E11015dc	94,4	8,7	92,3	3,6
E18015dc	96,4	0,9	97,4	0,8
E25015dc	97,4	6,6	88,5	1,7

Tabelle 4-12 DOPE-Wiederfindungsraten [%] durch Bartlett- und Fluorescamin-Assay aus den Chargen E11015dc und -dac, Chargen E18015dc und -dac, sowie Chargen E25015dc und -dac

In Abbildung 4.1.7-8 werden die Ergebnisse der Wiederfindung von DOPE mit den drei Methoden dargestellt. Dabei wurden die Wiederfindungsraten der HPTLC-Ergebnisse durch Bezug der Vergleichswerte der Proben auf den Vergleichswert 1 ermittelt. Die Wiederfindungswerte der HPTLC liegen zwischen 94 und 102%, nur die Charge E25015dc fällt mit 81% Wiederfindung aus diesem Rahmen. Der Bartlett-Assay erbrachte Wiederfindungswerte im Bereich von 94-111%, die Ergebnisse des

Fluorescamin-Assays lagen mit ca. 90% Wiederfindung zumeist niedriger als die der anderen Methoden.

Besonders die HPTLC-Methode und der Bartlett-Assay eignen sich damit zur Quantifizierung von Lipidbestandteilen in lyophilisierten Lipoplexen. Der Vorteil der HPTLC ist eindeutig die Anwendbarkeit der Methode für alle Lipide. Es gibt keine Einschränkungen wie beim Bartlett-Assay (nur Phospholipide) oder Fluorescamin-Assay (nur Lipide mit primären Aminogruppen). Nachteilig ist der höhere Aufwand, der mit der nötigen Lipidextraktion, dem Probenauftrag und der Detektion verbunden ist. Auch für die Durchführung des Bartlett-Assay ist ein hoher Arbeits- und Zeitaufwand nötig. Der Fluorescamin-Assay ist zwar schnell durchzuführen und vor allem spricht dafür, dass die redispergierten Lipoplexe direkt verwendet werden können. Allerdings zeigen die Ergebnisse, dass der Assay zumindestens bei DAC-30-haltigen Lipoplexen weniger sensitiv ist als die beiden anderen Methoden.

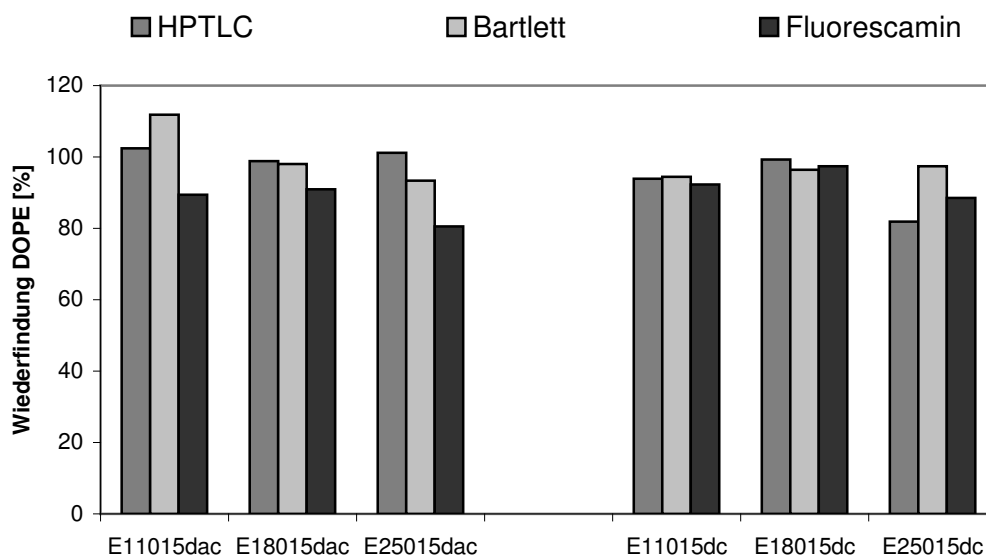


Abbildung 4.1.7-8 Vergleich der Wiederfindungsraten von DOPE aus den Chargen E11015dc und -dac, E18015dc und -dac, sowie E25015dc und -dac mittels HPTLC, Bartlett-Assay und Fluorescamin-Assay

#### 4.1.7.5. DNA-QUANTIFIZIERUNG MITTELS UV-MESSUNG UND PICOGREEN-ASSAY

Der Vergleich der Methoden zur Quantifizierung des DNA-Gehaltes in den lyophilisierten Proben mittels UV-Messung und PicoGreen-Assay führte zu ähnlichen Ergebnissen wie die Quantifizierung des Lipidgehaltes (siehe Tabelle 4-13).

Der PicoGreen-Assay ergab Wiederfindungswerte im Bereich von 89-108%. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Bezug auf Kalibrationsgeraden, die mit den DNA-Lösungen erstellt wurden, die zur Herstellung der jeweiligen Lipoplexproben verwendet worden waren.

Weniger breit gestreut waren die Ergebnisse, die durch UV-Messung erzielt wurden, diese lagen im Bereich von 95-101%. Zur Ermittlung des DNA-Gehaltes ist lediglich die Redispergierung der lyophilisierten Lipoplexe notwendig, es muss kein weiterer Pipettierschritt erfolgen. Im Gegensatz dazu sind zur Durchführung des PicoGreen-Assays zahlreiche Arbeitsschritte notwendig, die zu einer Beeinträchtigung des Ergebnisses führen können. Für die Anwendung der Konzentrationsbestimmung eignet sich also die UV-Messung eher. Müssen allerdings kleinere DNA-Mengen bestimmt werden, so ist das fluorimetrische Verfahren wesentlich genauer.

Charge	WF DNA Pico-Green-Assay [%]	sd [%]	WF DNA UV-Messung [%]	sd [%]
E11015dac	88,8	4,3	101,7	9,4
E18015dac	101,9	5,9	99,0	1,8
E25015dac	89,2	2,5	94,6	0,2
E11015dc	92,4	4,8	97,5	2,0
E18015dc	108,4	10,9	99,1	1,1
E25015dc	90,2	0,8	94,5	1,2

Tabelle 4-13 Vergleich der Wiederfindungsraten von DNA aus den Chargen E11015dc und -dac, E18015dc und -dac, sowie E25015dc und -dac mittels UV-Messung und PicoGreen-Assay

#### 4.1.8. METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DER LYOPHILISATE

##### 4.1.8.1. RESTFEUCHTEBESTIMMUNG DURCH KARL-FISCHER-TITRATION

Durch den Lyophilisationsprozess wird Wasser durch Sublimation und Desorption entfernt und somit der Restfeuchtegehalt im Produkt stark erniedrigt. Allerdings tendieren die Lyophilisate dazu, Feuchtigkeit aus der Umgebung wieder aufzunehmen. Dies führt zu einem Verlust an Stabilität und kann die Eigenschaften des Lyophilisates sowie der redispergierten Lipoplexe beeinflussen. Um

herauszufinden, wie stark die Tendenz der Lyophilisate zur Aufnahme von Wasser ist, wurden die Proben geöffnet und unterschiedlich lange im Raum offen stehen gelassen (5, 10, 15, 30, 60, 120 min). Anschließend wurde die Restfeuchte mittels Karl-Fischer-Titration bestimmt.

Untersucht wurden Plazebo-Lyophilisate, hergestellt aus TRM, die keine Lipoplexe aber die gleichen Mengen an Saccharose und NaCl enthielten, und die drei zeitnah zueinander hergestellten Chargen E11015dac, E18015dac und E25015dac (DAC-30/DNA 5:1 (w/w), 125 µg Lipid/Vial). In Abbildung 4.1.8-1 ist erkennbar, dass die Plazebo-Charge einen etwas höheren Wassergehalt aufwies, als die lipoplexhaltigen Chargen. Dabei handelt es sich jedoch nur um geringe Differenzen von ca. 0,5-1%. Dieser Unterschied kann dadurch zustande kommen, dass die Messungen an verschiedenen Tagen mit unterschiedlichen Luftfeuchten durchgeführt worden waren. Es wird bei der Plazebo- sowie bei den lipoplexhaltigen Chargen jedoch deutlich, dass erst ab 30 min der Wassergehalt anzusteigen beginnt. Die Differenz des Wassergehaltes nach 60 und nach 120 min geöffneten Stehenlassens der Proben führt zu einer Zunahme von unter 1%. Nach 120 min betrug der Wassergehalt weniger als 5%. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Lyophilisate bei normalen Luftfeuchtebedingungen nach der Öffnung über einen breiten Zeitintervall nur einen geringe Tendenz zur Aufnahme von Wasser zeigen und sich somit gut verarbeiten lassen.

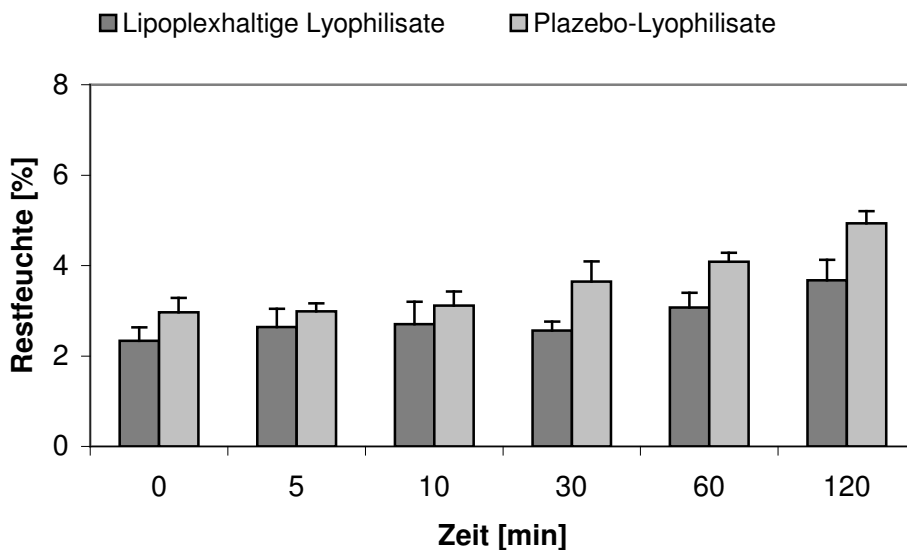


Abbildung 4.1.8-1 Restfeuchtebestimmung durch Karl-Fischer-Titration in TRM-haltigen Plazebo-Lyophilisaten und lipoplexhaltigen Lyophilisaten verschiedener Chargen (DAC-30/DNA 5:1 (w/w); E11015dac, E18015dac und E25015dac)

#### 4.1.8.2. ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN

Für die morphologische Beschreibung der Lyophilisate wurden REM-Aufnahmen angefertigt. Die Proben wurden mit Gold bedampft um die Oberfläche der Lyophilisate leitfähig zu machen. Die Erstellung der Aufnahmen erfolgte durch Dr. Joachim Bibus am Kristallographischen Institut der Universität Freiburg.

Es wurden Bilder von einem lipoplexhaltigen Lyophilisatkuchen (Abbildung 4.1.8-2) und einem Plazebo-Lyophilisatkuchen aus TRM (Abbildung 4.1.8-3) erstellt.

In Abbildung 4.1.8-2 wird deutlich, dass der Lyophilisatkuchen aus einem von Poren unterschiedlicher Größe durchzogenen, zusammenhängenden Gerüst bestand. Die relativ glatte Oberfläche des Lyophilisates lässt sich auch in Abbildung 4.1.8-3 erkennen. Allerdings wurde die Aufnahme mit einer höheren Vergrößerung erstellt und demnach sind die Poren hier nicht sichtbar.

Die auf beiden Aufnahmen erkennbaren faltigen Strukturen wurden durch Abdampfung, bedingt durch zunehmende Wärme bei Bestrahlung mit dem Elektronenstrahl erzeugt.

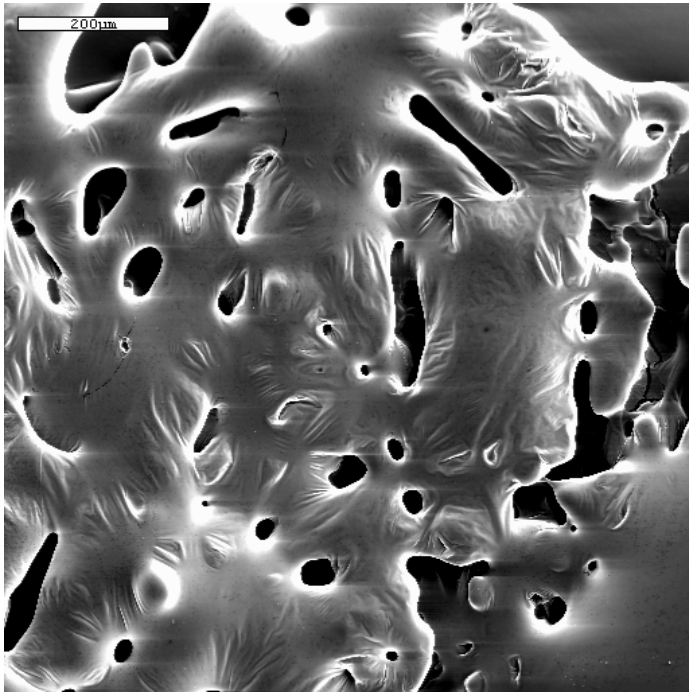


Abbildung 4.1.8-2 REM-Aufnahme eines lipoplexhaltigen Lyophilisatkuchens (DAC-30/DNA 5:1 (w/w), 187,5 µg DAC-30/Vial); Vergrößerung 100-fach; Balken entspricht 200 µm

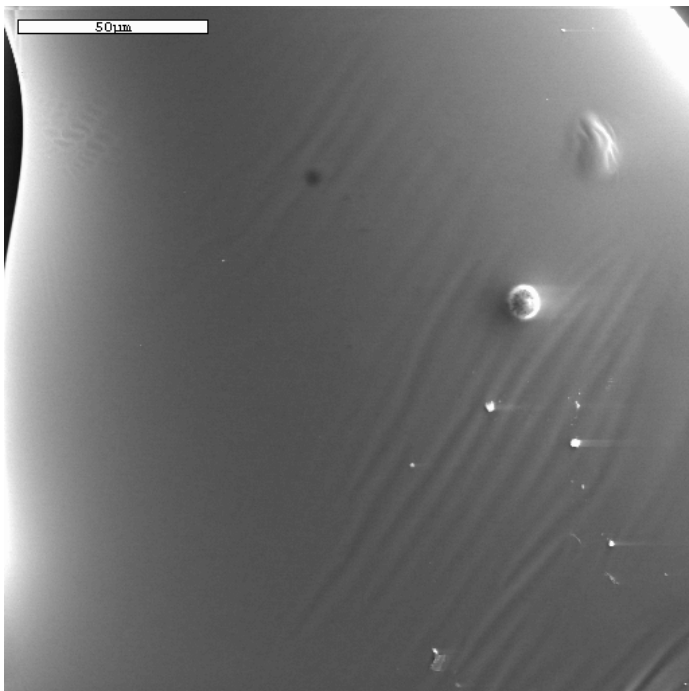


Abbildung 4.1.8-3 REM-Aufnahme eines Lyophilisatkuchens aus TRM ohne Lipoplexe; Vergrößerung 200-fach; Balken entspricht 50 µm



## 5. Zusammenfassung

Aggregate aus DNA und kationischen Lipiden, so genannte Lipoplexe für den nicht-viralen Gentransfer werden in Hinblick ihres großen therapeutischen Potentials intensiv untersucht und bearbeitet. Jedoch ist die Produktion liposomaler Gentransfersysteme mit vorhersagbaren und reproduzierbaren Eigenschaften sowie einer hinreichenden Lagerfähigkeit nach wie vor schwierig. Dies liegt insbesondere an den unzureichenden Kenntnissen über die molekularen Interaktionen von Lipiden und DNA und den sich daraus ergebenden Konsequenzen für die biologische Aktivität und die physikochemischen Eigenschaften. Dies macht deutlich, dass eine intensive Charakterisierung der Eigenschaften hinsichtlich der Herstellung und Lagerfähigkeit von liposomalen Gentransfersystemen für die potentielle Anwendung unerlässlich ist.

In vorausgegangenen Studien/Dissertationen in der Arbeitsgruppe wurde DAC-30 als Transfektionsreagenz aufgrund seines Potentials zum effektiven Gentransfer, kombiniert mit zufriedenstellenden Auswirkungen auf die Zellvitalität, ausgewählt, um ein Verfahren zur großtechnischen Herstellung von solchen Lipoplexen mit erhöhter Lagerstabilität durch Lyophilisation zu etablieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, aufbauend auf dem beschriebenen Herstellungsprozess Methoden zu entwickeln, die eine weitreichendere Charakterisierung der lyophilisierten Lipoplexe und des Herstellungsverfahrens ermöglichen sollten. Ebenso stand die Beurteilung der Stabilität der im großen Maßstab hergestellten und lyophilisierten Lipoplexe im Vordergrund.

Um strukturelle Einflüsse des Transfektionslipides gezielt charakterisieren zu können, wurde vergleichend zu DAC-30 auch DC-30 untersucht, welches sich im Aufbau nur geringfügig von DAC-30 unterscheidet. Um die Besonderheiten der großtechnischen Herstellung zu erfassen, wurden zur Entwicklung der Methoden in kleinem Maßstab durch Pipettieren hergestellte Lipoplexe eingesetzt und mit den im großen Maßstab hergestellten lyophilisierten und redispergierten Lipoplexen verglichen.

Die Untersuchung der Zellvitalität mittels des CTG-Assays, durch den die metabolisch aktiven Zellen nach Transfektion erfasst wurden, sowie mittels Durchflusszytometrie, welche die Quantifizierung der toten Zellen durch Markierung

mit einem Fluoreszenzfarbstoff (7-AAD) erlaubte, ergaben sich übereinstimmende Ergebnisse. Lipoplexe aus beiden Lipidkomponenten wirkten sich in ansteigenden Masseverhältnissen Lipid/DNA (w/w) zunehmend toxisch aus, DAC-30-haltige Lipoplexe etwas stärker als DC-30-haltige. Zunehmende Aggregatkonzentrationen DAC-30-haltiger Lipoplexe führten bei gleichbleibendem Lipid/DNA-Verhältnis (w/w) jedoch nicht zu einer Zunahme der Toxizität. Zur Wertung der Analysenmethoden kann festgestellt werden, dass der durchflusszytometrischen Methode gegenüber dem Assay ein Vorzug einzuräumen ist, da sich die Zytotoxizität in Kombination mit der Transfektionseffizienz erfassen lässt. Dies erhöht die Genauigkeit und ist zeitsparender und kostengünstiger.

Eine Korrelation zwischen Transfektionseffizienz und Auswirkung auf die Vitalität der Zellen ließ sich für keines der Lipide ersehen, generell war die Transfektion mit DAC-30-haltigen Lipoplexen höher.

Die Ermittlung der Partikelgröße durch PCS von DC-30-haltigen Lipoplexen mit verschiedenen Ladungsverhältnissen (+/-) ergab, dass ein Anstieg der Größe erst ab einem Verhältnis von 4:1 (+/-) zu verzeichnen ist. Die Korrelation der Größe mit dem Zetapotential erbrachte, dass bei dem gleichen Ladungsverhältnis ein ausgeglichenes Zetapotential von etwa 0 mV vorliegt, also nicht die fehlende Ladung an den Grenzflächen zu einer Größenzunahme führte.

Der kontinuierliche Herstellungsprozess wirkte sich innerhalb einer 24stündigen Lagerung stabilisierend auf die Größe von redispergierten lyophilisierten, sowie nicht lyophilisierten DAC-30-haltigen Lipoplexen des Verhältnisses Lipid/DNA 5:1 (w/w) aus. Mit Lipoplexen des gleichen Verhältnisses, die durch Pipettieren hergestellt wurden, war eine deutliche Zunahme der Größe während der gleichen Zeit zu verzeichnen.

Cryo-TEM-Aufnahmen erbrachten, dass in Dispersionen pipettierter und redispergierter lyophilisierter Lipoplexe dieselben multilamellaren Elemente alternierender Lipid- und DNA-Schichten gefunden wurden, und somit der scale-up-Prozess keine Auswirkung auf die Struktur und Größe der gebildeten Lipoplexe hatte. Die Ergebnisse der Größenmessung wurden durch PCS bestätigt.

Die Ermittlung der Struktur von Lipoplexen zunehmender Ladungsverhältnisse (+/-) durch Quantifizierung des DNA-Anteils, der für den Fluoreszenzfarbstoff DAPI

zugänglich war erbrachte eine annähernd lineare Abnahme der Fluoreszenzintensität bei zunehmendem Ladungsverhältnis. Es wirkte sich dabei nicht aus, ob der Fluoreszenzfarbstoff vor oder nach der Bildung der Lipoplexe hinzugegeben wurde. Der Vergleich von redispergierten lyophilisierten und pipettierten Lipoplexen des gleichen Ladungsverhältnisses erbrachte keinen deutlichen Unterschied der Fluoreszenzintensität, was wiederum darauf hindeutet, dass die Struktur der Lipoplexe durch den kontinuierlichen Herstellungsprozess mit anschließender Lyophilisation erhalten bleibt.

Dies konnte auch durch Agarosegel-Elektrophorese bestätigt werden. Durch die Komplexierung mit den kationischen Lipiden kann sich gleichermaßen nur der freie Teil der neben den Lipoplexen vorhandenen DNA in dem Gel bewegen, der Rest wird durch Komplexierung durch die kationische Komponente zurückgehalten. Deutlich wurde dies auch dadurch, dass durch beide Herstellungsprozesse Lipoplexe erhalten wurden, die einen Abbau der komplexierten DNA durch DNase hemmten. Die zunehmende Hemmung durch ansteigende Masseverhältnisse Lipid/DNA (w/w) konnte für beide Lipide gleichermaßen bestätigt werden.

Die Untersuchung der Ladung der Lipoplexe wurde mit zwei verschiedenen Verfahren ermittelt, durch Zetapotential-Analyse und durch die Bestimmung der ladungsabhängigen Einlagerung des Fluoreszenzfarbstoffes TNS in die Oberfläche der Lipoplexe. Es bestand eine annähernd lineare Korrelation der Ergebnisse der beiden Methoden, die mit DC-30-haltigen Lipoplexen unterschiedlicher Ladungsverhältnisse erhalten wurden. Demnach können mit beiden Verfahren Ladungsveränderungen registriert werden. Jedoch ergab sich durch die Analyse des Zetapotentials, dass Lipoplexe mit berechnetem ausgeglichenen Ladungsverhältnis deutlich negativ geladen waren. Ein Übergang in den positiven Bereich fand erst ab einem Verhältnis von 4:1 (+/-) statt. Mit dem TNS-Assay hingegen war ein signifikanter Fluoreszenzanstieg bereits ab einem ausgeglichenen Ladungsverhältnis von 1:1 (+/-) zu verzeichnen. Dies zeigt die Übereinstimmung der berechneten Ladungsmengen mit den Ladungsverhältnissen an der Partikeloberfläche. Beide Verfahren erbrachten übereinstimmende Ergebnisse (negatives Zetapotential bzw. gleiche Fluoreszenzintensität) für DC-30-haltige Lipoplexe des Verhältnisses 5:1 (w/w), die einerseits durch Pipettieren und andererseits durch kontinuierliches Mischen mit anschließender Lyophilisation hergestellt worden waren.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass das umgebende Medium einen deutlichen Einfluss auf das Zetapotential ausübt. Ein Anstieg der Ionenkonzentration führt, wie erwartet, zu einer Abnahme des Zetapotentials und zu der Verschiebung des Überganges vom negativen ins positive Potential in den Bereich höherer Ladungsverhältnisse (+/-).

Verschiedene Methoden zur Quantifizierung des Lipidgehaltes wurden auf die Anwendbarkeit für lyophilisierte Lipoplexe untersucht.

Der Bartlett-Assay, mit welchem Phospholipide bestimmt werden können, erbrachte je nach Aufarbeitung der Lyophilisate sehr uneinheitliche Ergebnisse. In Millipore-Wasser redispergierte Lipoplexe ergaben die niedrigsten Wiederfindungsraten. Wurden die Lyophilisate in zwittergenthaltigem Puffer redispergiert, der zu einer Zerstörung der Lipoplexe führte, konnten etwas höhere Ergebnisse erzielt werden. Die höchsten Wiederfindungsraten wurden mit Lipoplexen erhalten, die zuvor extrahiert worden waren, um die wasserlöslichen Anteile abzutrennen.

Mittels Fluorescamin-Assay konnten Lipide mit primären Aminogruppen, im vorliegenden Fall DOPE, durch Reaktion mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescamin quantifiziert werden. Mit dieser Methode konnte kein Unterschied der Wiederfindungsraten zwischen lyophilisierten Lipoplexen festgestellt werden, die einerseits in Millipore-Wasser und andererseits in zwittergenthaltigem Puffer aufgenommen worden waren.

Durch HPTLC ließ sich sowohl der DOPE-, als auch der Cholesterol-Anteil bestimmen. Es konnte festgestellt werden, dass extrahierte Lipoplexe zu präziseren Ergebnissen führten, als in MeOH aufgenommene. In diesen waren noch die wasserlöslichen Anteile enthalten, welche zu Störungen der Analyse führten.

Generell war von Nachteil, dass die genauen Ausgangskonzentrationen der Lipid- und DNA-Lösungen zur Herstellung der Lipoplexe nicht bekannt waren und somit die ermittelten Werte nur auf die theoretischen Ausgangskonzentrationen bezogen werden konnten, was eine Erklärung für die Schwankungen der Ergebnisse zwischen den verschiedenen Chargen sein könnte.

Die Unkenntnis der wahren Ausgangskonzentrationen war ebenso problematisch bei der Ermittlung der DNA-Konzentration in Lipoplexen mittels UV-Messung. Es wurden

übereinstimmende Ergebnisse innerhalb der Chargen erzielt, die Chargen untereinander variierten jedoch ebenfalls deutlich.

Zur Untersuchung der Stabilität einer DC-30 und einer DAC-30-haltigen Charge des gleichen Lipid/DNA-Verhältnisses (5:1 (w/w)) wurde die Entwicklung der Produkteigenschaften über 11 Monate hinweg verfolgt.

Die Transfektionseffizienz der DAC-30-haltigen Charge lag generell deutlich höher als die der DC-30-haltigen, wohingegen die Zytotoxizität beider Chargen etwa gleich ausgeprägt war. Die höhere biologische Aktivität von DAC-30-haltigen Lipoplexen könnte durch eine bessere Freisetzung der DNA aus den Lipoplexen nach zellulärer Aufnahme zu Stande kommen, die durch den sterischen Unterschied von DAC-Cholesterol im Gegensatz zu DC-Cholesterol und ein dadurch verändertes Bindungsgleichgewicht bedingt sein könnte. Mit beiden Chargen waren Schwankungen der Effizienz zu verzeichnen, es war allerdings kein Trend zur Abnahme mit zunehmender Lagerzeit zu verzeichnen.

Bezüglich der Partikelgröße wurde ebenfalls keine Zu- oder Abnahmetendenz festgestellt. Geringe Schwankungen zu den einzelnen Messzeiten ließen sich nicht mit den jeweils ermittelten Transfektionseffizienzen korrelieren. Die Zetapotentiale beider Chargen (Masseverhältnis Lipid/DNA 5:1 (w/w), Ladungsverhältnis 1:1 (+/-)) lagen vor und nach der Lyophilisation sowie nach 18 Monaten im deutlich negativen Bereich.

Der Gehalt an Lipid (ermittelt durch Fluorescamin-Assay) und DNA (ermittelt durch UV-Messung) blieb über den gesamten Zeitraum hinweg stabil.

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit des scale-up-Verfahrens und der Reproduzierbarkeit der Methoden wurden je drei DAC-30 und DC-30-haltige Chargen des gleichen Lipid/DNA-Verhältnisses (5:1 (w/w)) im großen Maßstab hergestellt. Die genauen Ausgangskonzentrationen der DNA-Lösungen und der Lipiddispersionen zur Herstellung der Lipoplexchargen wurden durch UV-Messung bzw. Bartlett-Assay ermittelt, um die Wiederfindungsraten auf die tatsächlichen Konzentrationen beziehen zu können. Dies erbrachte, dass vor allem die Konzentrationen der Lipiddispersionen teilweise erheblich von den theoretisch eingesetzten abwichen, u. U. durch inhomogene Ausgangsdispersionen oder durch Verluste bei der

Vorbehandlung durch Extrusion vor dem Zusammenmischen von Lipid und DNA zur Herstellung der Lipoplexe.

Die Transfektionseffizienz der DAC-30-haltigen Chargen lag wiederum deutlich höher als die der DC-30-haltigen bei etwa gleich stark ausgeprägten toxischen Auswirkungen auf die Zellen. Die einzelnen Chargen unterschieden sich deutlich in der biologischen Aktivität, diese ließ sich aber nicht mit verschiedenen Ladungsverhältnissen der Lipoplexe korrelieren, die durch die Schwankungen der Ausgangskonzentrationen bewirkt worden waren.

Es ließ sich ebenfalls kein Zusammenhang zwischen dem Ladungsverhältnis und der Partikelgröße feststellen, welche für alle DAC-30 bzw. DC-30-haltigen Chargen in den gleichen Bereichen lag, wobei die Partikel der DAC-30-haltigen Chargen etwas größer waren als jene der DC-30-haltigen.

Untersuchungen mittels Agarosegel-Elektrophorese erbrachten einheitliche Ergebnisse der DC-30 und DAC-30-haltigen Chargen bezüglich der DNA-Komplexierung in den Lipoplexen und dem Schutz der DNA vor Degradierung durch Enzymbehandlung.

Auch das Zetapotential erbrachte keine Unterschiede, alle Chargen wiesen einen negativen Wert auf.

Die Lipidquantifizierung mit verschiedenen Methoden (Bartlett-Assay, Fluorescamin-Assay und HPTLC) erbrachte, dass generell die Wiederfindung bei Bezug der Ergebnisse auf die tatsächlich eingesetzten Konzentrationen wesentlich besser ausfällt. Mit jeder der Methoden wurden einheitliche Ergebnisse erzielt, allerdings ergaben sich zwischen den mit den verschiedenen Methoden erzielten Ergebnissen Unterschiede. Die Fluoreszenzmethode war zwar unkompliziert und schnell durchzuführen, allerdings lagen die Ergebnisse niedriger als mit den anderen Methoden. Die Durchführung von HPTLC und Bartlett-Assay war wesentlich aufwändiger, da die Lipoplexe erst extrahiert werden mussten, die Wiederfindungswerte lagen jedoch nahe des 100%-Bereiches. Der zusätzliche Vorteil der HPTLC war, dass nicht nur der DOPE-Anteil, sondern auch die Cholesterol-Derivate erfasst werden konnten.

Mittels Karl-Fischer-Titration konnte bestätigt werden, dass die Lyophilisate einen niedrigen Restfeuchtegehalt aufweisen und die Tendenz zur Aufnahme von Wasser nur gering ausgeprägt ist. Dies ist von Vorteil für die Verarbeitung der Lyophilisate.

Es kann resümiert werden, dass erfolgreich Methoden entwickelt wurden, die sich zur Charakterisierung der biologischen Aktivität, der physikochemischen Eigenschaften sowie zur Quantifizierung der Ausgangskomponenten von in großem Maßstab mit anschließender Lyophilisation hergestellten DAC-30 bzw. DC-30-haltigen Lipoplexen eignen.

DAC-30 hat sich gegenüber DC-30 bei ansonsten gleichen Eigenschaften als das bevorzugte Transfektionsreagenz zur Herstellung von Lipoplexen mit deutlich besserer biologischer Aktivität bei geringfügig höherer Zytotoxizität bestätigt.

Das Herstellungsverfahren hat sich als geeignet erwiesen, Lipoplexe mit reproduzierbaren Eigenschaften herzustellen, die über einen Lagerzeitraum von mindestens einem Jahr erhalten bleiben.

Dadurch ist es durchaus möglich, auf diese Weise Lipoplexe in therapielevanten Mengen herzustellen, was einen wichtigen Schritt zur weiteren Etablierung der Lipoplexe in einem neuartigen Therapieverfahren zur Behandlung von genetisch bedingten Erkrankungen darstellt.

## 6. Literatur

"Europäisches Arzneibuch, 5. Auflage."

Aiken, J. H. (1992). "Comparison of hematoporphyrin with other fluorogenic agents for the detection of cationic surfactants and lipids after separation by HPTLC." J Plan Chrom **5**: 87-91.

Akao, T., Osaki, J., Mitoma, J. I., Ito, A. and Kunitake, T. (1991). "Correlation between physicochemical characteristics of synthetic cationic amphiphiles and their DNA transfection ability." Bull Chem Soc Jpn **64**(3677-3681).

Allison, S. D. and Anchordoquy, T. J. (2000). "Mechanisms of protection of cationic lipid-DNA complexes during lyophilization." J Pharm Sci **89**(5): 682-91.

Almofti, M. R., Harashima, H., Shinohara, Y., Almofti, A., Baba, Y. and Kiwada, H. (2003). "Cationic liposome-mediated gene delivery: biophysical study and mechanism of internalization." Arch Biochem Biophys **410**(2): 246-53.

Almofti, M. R., Harashima, H., Shinohara, Y., Almofti, A., Li, W. and Kiwada, H. (2003). "Lipoplex size determines lipofection efficiency with or without serum." Mol Membr Biol **20**(1): 35-43.

Alton, E. W., Stern, M., Farley, R., Jaffe, A., Chadwick, S. L., Phillips, J., Davies, J., Smith, S. N., Browning, J., Davies, M. G., Hodson, M. E., Durham, S. R., Li, D., Jeffery, P. K., Scallan, M., Balfour, R., Eastman, S. J., Cheng, S. H., Smith, A. E., Meeker, D. and Geddes, D. M. (1999). "Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial." Lancet **353**(9157): 947-54.

AMG "Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz) vom 24. August 1976 in der geltenden Fassung. BGBl I:2445."

Anchordoquy, T. J., Carpenter, J. F. and Kroll, D. J. (1997). "Maintenance of transfection rates and physical characterization of lipid/DNA complexes after freeze-drying and rehydration." Arch Biochem Biophys **348**(1): 199-206.

Arigita, C., Zuidam, N. J., Crommelin, D. J. and Hennink, W. E. (1999). "Association and dissociation characteristics of polymer/DNA complexes used for gene delivery." Pharm Res **16**(10): 1534-41.

Audouy, S. and Hoekstra, D. (2001). "Cationic lipid-mediated transfection in vitro and in vivo (review)." Mol Membr Biol **18**(2): 129-43.

Axel, D. I., Spyridopoulos, I., Riessen, R., Runge, H., Viebahn, R. and Karsch, K. R. (2000). "Toxicity, uptake kinetics and efficacy of new transfection reagents: increase of oligonucleotide uptake." J Vasc Res **37**(4): 221-34; discussion 303-4.



- Balasubramaniam, R. P., Bennett, M. J., Aberle, A. M., Malone, J. G., Nantz, M. H. and Malone, R. W. (1996). "Structural and functional analysis of cationic transfection lipids: the hydrophobic domain." Gene Ther **3**(2): 163-72.
- Bally, M. B., Harvie, P., Wong, F. M., Kong, S., Wasan, E. K. and Reimer, D. L. (1999). "Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers." Adv Drug Deliv Rev **38**(3): 291-315.
- Bartlett, G. R. (1959). "Phosphorus assay in column chromatography." J Biol Chem **234**(3): 466-8.
- Bergan, D., Galbraith, T. and Sloane, D. L. (2000). "Gene transfer in vitro and in vivo by cationic lipids is not significantly affected by levels of supercoiling of a reporter plasmid." Pharm Res **17**(8): 967-73.
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification." Can J Biochem Physiol **37**(8): 911-7.
- 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 USA **92**(16): 7297-301.
- Boussif, O., Zanta, M. A. and Behr, J. P. (1996). "Optimized galenics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold." Gene Ther **3**(12): 1074-80.
- Bridgman, P. C., Brown, M. E. and Balan, I. (2003). "Biolistic transfection." Methods Cell Biol **71**: 353-68.
- Brisson, M., Tseng, W. C., Almonte, C., Watkins, S. and Huang, L. (1999). "Subcellular trafficking of the cytoplasmic expression system." Hum Gene Ther **10**(16): 2601-13.
- Capecchi, M. R. (1980). "High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells." Cell **22**(2 Pt 2): 479-88.
- Carriere, M., Tranchant, I., Niore, P. A., Byk, G., Mignet, N., Escriou, V., Scherman, D. and Herscovici, J. (2002). "Optimization of cationic lipid mediated gene transfer: structure-function, physico-chemical, and cellular studies." J Liposome Res **12**(1-2): 95-106.
- Cevc, G. (1990). "Membrane electrostatics." Biochim Biophys Acta **1031**(3): 311-82.
- Cherng, J. Y., Talsma, H., Crommelin, D. J. and Hennink, W. E. (1999). "Long term stability of poly((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-based gene delivery systems." Pharm Res **16**(9): 1417-23.
- Cherng, J. Y., vd Wetering, P., Talsma, H., Crommelin, D. J. and Hennink, W. E. (1999). "Stabilization of polymer-based gene delivery systems." Int J Pharm **183**(1): 25-8.

- Ciani, L., Ristori, S., Salvati, A., Calamai, L. and Martini, G. (2004). "DOTAP/DOPE and DC-Chol/DOPE lipoplexes for gene delivery: zeta potential measurements and electron spin resonance spectra." Biochim Biophys Acta **1664**(1): 70-9.
- Clement, J., Kiefer, K., Kimpfler, A., Garidel, P. and Peschka-Suss, R. (2005). "Large-scale production of lipoplexes with long shelf-life." Eur J Pharm Biopharm **59**(1): 35-43.
- Clement, J., Kiefer, K., Kimpfler, A., Garidel, P. and Peschka-Süss, R. (2005). "Large-scale production of lipoplexes with long shelf-life." Eur J Pharm Biopharm **59**(1): 35-43.
- Cocera, M., Lopez, O., Estelrich, J., Parra, J. L. and de la Maza, A. (2001). "Use of a fluorescence spectroscopy technique to study the adsorption of sodium dodecylsulfonate on liposomes." Chem Phys Lipids **110**(1): 19-26.
- Cocera, M., Lopez, O., Estelrich, J., Parra, J. L. and de la Maza, A. (2003). "Influence of the temperature in the adsorption of sodium dodecyl sulfate on phosphatidylcholine liposomes." Chem Phys Lipids **124**(1): 15-22.
- Congiu, A., Pozzi, D., Esposito, C., Castellano, C. and Mossa, G. (2004). "Correlation between structure and transfection efficiency: a study of DC-Chol-DOPE/DNA complexes." Colloids Surf B Biointerfaces **36**(1): 43-8.
- Cornelis, S., Vandenbranden, M., Ruyschaert, J. M. and Elouahabi, A. (2002). "Role of intracellular cationic liposome-DNA complex dissociation in transfection mediated by cationic lipids." DNA Cell Biol **21**(2): 91-7.
- Dani, S. U. (1999). "The challenge of vector development in gene therapy." Braz J Med Biol Res **32**(2): 133-45.
- De Bernardo, S., Weigele, M., Toome, V., Manhart, K., Leimgruber, W., Bohlen, P., Stein, S. and Udenfriend, S. (1974). "Studies on the reaction of fluorescamine with primary amines." Arch Biochem Biophys **163**(1): 390-9.
- DeReG (2002). "Deutsches Register für somatische Gentransferstudien."
- Dhanesar, S. C. (1992). "Evaluation of phospholipids in liposomes by HPTLC." J Plan Chrom **5**: 45-49.
- Dodds, E., Dunckley, M. G., Naujoks, K., Michaelis, U. and Dickson, G. (1998). "Lipofection of cultured mouse muscle cells: a direct comparison of Lipofectamine and DOSPER." Gene Ther **5**(4): 542-51.
- Eastman, S. J., Hope, M. J. and Cullis, P. R. (1991). "Transbilayer transport of phosphatidic acid in response to transmembrane pH gradients." Biochemistry **30**(7): 1740-5.
- Eastman, S. J., Hope, M. J., Wong, K. F. and Cullis, P. R. (1992). "Influence of phospholipid asymmetry on fusion between large unilamellar vesicles." Biochemistry **31**(17): 4262-8.

- Eisenberg, M., Gresalfi, T., Riccio, T. and McLaughlin, S. (1979). "Adsorption of monovalent cations to bilayer membranes containing negative phospholipids." Biochemistry **18**(23): 5213-23.
- Escriou, V., Ciolina, C., Helbling-Leclerc, A., Wils, P. and Scherman, D. (1998). "Cationic lipid-mediated gene transfer: analysis of cellular uptake and nuclear import of plasmid DNA." Cell Biol Toxicol **14**(2): 95-104.
- Faneca, H., Simoes, S. and de Lima, M. C. (2002). "Evaluation of lipid-based reagents to mediate intracellular gene delivery." Biochim Biophys Acta **1567**(1-2): 23-33.
- Farhood, H., Serbina, N. and Huang, L. (1995). "The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer." Biochim Biophys Acta **1235**(2): 289-95.
- Felgner, J. H. (1997). "Separation and quantitation of cationic liposome components by high performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection." Pharm Res **14**(9): 1269-71.
- Felgner, P. L., Barenholz, Y., Behr, J. P., Cheng, S. H., Cullis, P., Huang, L., Jessee, J. A., Seymour, L., Szoka, F., Thierry, A. R., Wagner, E. and Wu, G. (1997). "Nomenclature for synthetic gene delivery systems." Hum Gene Ther **8**(5): 511-2.
- 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 USA **84**(21): 7413-7.
- Ferrari, M. E., Nguyen, C. M., Zelphati, O., Tsai, Y. and Felgner, P. L. (1998). "Analytical methods for the characterization of cationic lipid-nucleic acid complexes." Hum Gene Ther **9**(3): 341-51.
- Ferrari, M. E., Rusalov, D., Enas, J. and Wheeler, C. J. (2001). "Trends in lipoplex physical properties dependent on cationic lipid structure, vehicle and complexation procedure do not correlate with biological activity." Nucleic Acids Res **29**(7): 1539-48.
- Flegler, S. L., Heckman, J. J. W. and Klomparens, K. L. (1995). "Elektronenmikroskopie." Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford (1995).
- Fukami, A. and Adachi, K. (1965). "A new method of preparation of a self-perforated micro plastic grid and its application." J Electron Microsc (Tokyo) **14**(2): 112-8.
- Gao, X. and Huang, L. (1995). "Cationic liposome-mediated gene transfer." Gene Ther **2**(10): 710-22.
- Geall, A. J. and Blagbrough, I. S. (2000). "Rapid and sensitive ethidium bromide fluorescence quenching assay of polyamine conjugate-DNA interactions for the analysis of lipoplex formation in gene therapy." J Pharm Biomed Anal **22**(5): 849-59.

- Gebhart, C. L. and Kabanov, A. V. (2001). "Evaluation of polyplexes as gene transfer agents." J Control Release **73**(2-3): 401-16.
- Gershon, H., Ghirlando, R., Guttman, S. B. and Minsky, A. (1993). "Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection." Biochemistry **32**(28): 7143-51.
- GMP-Leitfaden "Europäische Kommission (1999) Leitfaden einer guten Herstellungspraxis für Arzneimittel in der europäischen Union Band 4, Amt für amtliche Veröffentlichungen der Europäischen Gemeinschaft."
- Gregory, L. G., Harbottle, R. P., Lawrence, L., Knapton, H. J., Themis, M. and Coutelle, C. (2003). "Enhancement of adenovirus-mediated gene transfer to the airways by DEAE dextran and sodium caprate in vivo." Mol Ther **7**(1): 19-26.
- Gustafsson, J. (1995). "Complexes between cationic liposomes and DNA visualized by cryo-TEM." Biochim Biophys Acta **1235**: 305-312.
- Hallek, M., Buening, H., Ried, M., Hacker, U., Kurzeder, C. and Wendtner, C. M. (2001). "Basis of gene therapy: principles and state of development." Internist (Berl) **42**(10): 1306-8, 1311-3.
- Harbottle, R. P., Cooper, R. G., Hart, S. L., Ladhoff, A., McKay, T., Knight, A. M., Wagner, E., Miller, A. D. and Coutelle, C. (1998). "An RGD-oligolysine peptide: a prototype construct for integrin-mediated gene delivery." Hum Gene Ther **9**(7): 1037-47.
- Hirota, S., de Ilarduya, C. T., Barron, L. G. and Szoka, F. C., Jr. (1999). "Simple mixing device to reproducibly prepare cationic lipid-DNA complexes (lipoplexes)." Biotechniques **27**(2): 286-90.
- Hortobagyi, G. N., Ueno, N. T., Xia, W., Zhang, S., Wolf, J. K., Putnam, J. B., Weiden, P. L., Willey, J. S., Carey, M., Branham, D. L., Payne, J. Y., Tucker, S. D., Bartholomeusz, C., Kilbourn, R. G., De Jager, R. L., Sneige, N., Katz, R. L., Anklesaria, P., Ibrahim, N. K., Murray, J. L., Theriault, R. L., Valero, V., Gershenson, D. M., Bevers, M. W., Huang, L., Lopez-Berestein, G. and Hung, M. C. (2001). "Cationic liposome-mediated E1A gene transfer to human breast and ovarian cancer cells and its biologic effects: a phase I clinical trial." J Clin Oncol **19**(14): 3422-33.
- Huebner, S. (1999). "lipid dna complex formation: reorganazation and rupture of lipid vesicles in the presence of dna as observed by cryoelectron microscopy." biophysical journal **76**: 3158-66.
- Huebner, S. (1999). "Lipid DNA complex formation: reorganization and rupture of lipid vesicles in the presence of DNA as observed by cryoelectron microscopy." Biophys J **76**: 3158-66.
- Hyde, S. C., Southern, K. W., Gileadi, U., Fitzjohn, E. M., Mofford, K. A., Waddell, B. E., Gooi, H. C., Goddard, C. A., Hannavy, K., Smyth, S. E., Egan, J. J., Sorgi, F. L., Huang, L., Cuthbert, A. W., Evans, M. J., Colledge, W. H., Higgins, C. F., Webb, A. K. and Gill, D. R. (2000). "Repeat administration of DNA/liposomes

- to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis." Gene Ther **7**(13): 1156-65.
- Imai, E., Akagi, Y. and Isaka, Y. (1998). "Towards gene therapy for renal diseases." Nephrologie **19**(7): 397-402.
- Kachel, K., Asuncion-Punzalan, E. and London, E. (1998). "The location of fluorescence probes with charged groups in model membranes." Biochim Biophys Acta **1374**(1-2): 63-76.
- Kamiya, H., Fujimura, Y., Matsuoka, I. and Harashima, H. (2002). "Visualization of intracellular trafficking of exogenous DNA delivered by cationic liposomes." Biochem Biophys Res Commun **298**(4): 591-7.
- Kawaura, C., Noguchi, A., Furuno, T. and Nakanishi, M. (1998). "Atomic force microscopy for studying gene transfection mediated by cationic liposomes with a cationic cholesterol derivative." FEBS Lett **421**(1): 69-72.
- Kennedy, M. T., Pozharski, E. V., Rakhmanova, V. A. and MacDonald, R. C. (2000). "Factors governing the assembly of cationic phospholipid-DNA complexes." Biophys J **78**(3): 1620-33.
- Keogh, M. C., Chen, D., Lupu, F., Shaper, N., Schmitt, J. F., Kakkar, V. V. and Lemoine, N. R. (1997). "High efficiency reporter gene transfection of vascular tissue in vitro and in vivo using a cationic lipid-DNA complex." Gene Ther **4**(2): 162-71.
- Kiefer, K. (2003). "Entwicklung einer nicht-viralen upscalebaren Formulierung zur Transfektion humaner vaskulärer Endothelzellen und glatter Muskelzellen." Dissertation: Pharmazeutische Technologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.
- Kiefer, K., Clement, J., Garidel, P. and Peschka-Süss, R. (2004). "Transfection efficiency and cytotoxicity of nonviral gene transfer reagents in human smooth muscle and endothelial cells." Pharm Res **21**(6): 1015-23.
- Knowles, M. R., Noone, P. G., Hohneker, K., Johnson, L. G., Boucher, R. C., Efthimiou, J., Crawford, C., Brown, R., Schwartzbach, C. and Pearlman, R. (1998). "A double-blind, placebo controlled, dose ranging study to evaluate the safety and biological efficacy of the lipid-DNA complex GR213487B in the nasal epithelium of adult patients with cystic fibrosis." Hum Gene Ther **9**(2): 249-69.
- Kohn, D. B., Sadelain, M. and Glorioso, J. C. (2003). "Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID." Nat Rev Cancer **3**(7): 477-88.
- Lai, E. and van Zanten, J. H. (2002). "Evidence of lipoplex dissociation in liquid formulations." J Pharm Sci **91**(5): 1225-32.
- Lechardeur, D., Sohn, K. J., Haardt, M., Joshi, P. B., Monck, M., Graham, R. W., Beatty, B., Squire, J., O'Brodovich, H. and Lukacs, G. L. (1999). "Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer." Gene Ther **6**(4): 482-97.

- Lee, E. R., Marshall, J., Siegel, C. S., Jiang, C., Yew, N. S., Nichols, M. R., Nietupski, J. B., Ziegler, R. J., Lane, M. B., Wang, K. X., Wan, N. C., Scheule, R. K., Harris, D. J., Smith, A. E. and Cheng, S. H. (1996). "Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to the lung." Hum Gene Ther **7**(14): 1701-17.
- Legendre, J. Y. and Szoka, F. C., Jr. (1992). "Delivery of plasmid DNA into mammalian cell lines using pH-sensitive liposomes: comparison with cationic liposomes." Pharm Res **9**(10): 1235-42.
- Li, S. and Huang, L. (2000). "Nonviral gene therapy: promises and challenges." Gene Ther **7**(1): 31-4.
- Li, S., Tseng, W. C., Stolz, D. B., Wu, S. P., Watkins, S. C. and Huang, L. (1999). "Dynamic changes in the characteristics of cationic lipidic vectors after exposure to mouse serum: implications for intravenous lipofection." Gene Ther **6**(4): 585-94.
- Liu, F., Yang, J., Huang, L. and Liu, D. (1996). "New cationic lipid formulations for gene transfer." Pharm Res **13**(12): 1856-60.
- Lleres, D., Weibel, J. M., Heissler, D., Zuber, G., Duportail, G. and Mely, Y. (2004). "Dependence of the cellular internalization and transfection efficiency on the structure and physicochemical properties of cationic detergent/DNA/liposomes." J Gene Med **6**(4): 415-28.
- Loisel, S., Floch, V., Le Gall, C., Ferec, C. (2001). "Factors influencing the efficiency of lipoplexes mediated gene transfer in lung after intravenous administration." J Lip Res **11**(2,3): 127-38.
- Loisel, S., Le Gall, C., Doucet, L., Ferec, C. and Floch, V. (2001). "Contribution of plasmid DNA to hepatotoxicity after systemic administration of lipoplexes." Hum Gene Ther **12**(6): 685-96.
- Mandel, M. and Higa, A. (1970). "Calcium-dependent bacteriophage DNA infection." J Mol Biol **53**(1): 159-62.
- Matsui, H., Johnson, L. G., Randell, S. H. and Boucher, R. C. (1997). "Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells." J Biol Chem **272**(2): 1117-26.
- Maurer, N., Mori, A., Palmer, L., Monck, M. A., Mok, K. W., Mui, B., Akhong, Q. F. and Cullis, P. R. (1999). "Lipid-based systems for the intracellular delivery of genetic drugs." Mol Membr Biol **16**(1): 129-40.
- Maxwell, R. J. (1992). "Comparison of induced vapor phase fluorescent responses of four polycyclic ether antibiotics and several lipid classes on RP-18 and silica gel HPTLC plates." J Plan Chrom **5**: 35-40.
- Meredith, P., Donald, A. M. and Payne, R. S. (1996). "Freeze-drying: in situ observations using cryoenvironmental scanning electron microscopy and differential scanning calorimetry." J Pharm Sci **85**(6): 631-7.

- Meyer, O., Roch, O., Elmlinger, D. and Kolbe, H. V. (2000). "Direct lipid quantitation of cationic liposomes by reversed-phase HPLC in lipoplex preparation process." Eur J Pharm Biopharm **50**(3): 353-6.
- Mok, K. W. and Cullis, P. R. (1997). "Structural and fusogenic properties of cationic liposomes in the presence of plasmid DNA." Biophys J **73**(5): 2534-45.
- Molina, M. C., Allison, S. D. and Anchordoquy, T. J. (2001). "Maintenance of nonviral vector particle size during the freezing step of the lyophilization process is insufficient for preservation of activity: insight from other structural indicators." J Pharm Sci **90**(10): 1445-55.
- Momm, J. (2004). "Herstellung und Charakterisierung von unsymmetrischen Liposomen unter Verwendung von rekombinanten Proteinen." Dissertation: Pharmazeutische Technologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.
- Mülhardt, C. (2003). "Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics." Spektrum Akademischer Verlag.
- Müller, R. H. (1996). "Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis." Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- Nabel, E. G., Gordon, D., Yang, Z. Y., Xu, L., San, H., Plautz, G. E., Wu, B. Y., Gao, X., Huang, L. and Nabel, G. J. (1992). "Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: lack of autoimmunity and gonadal localization." Hum Gene Ther **3**(6): 649-56.
- Nabel, G. J., Nabel, E. G., Yang, Z. Y., Fox, B. A., Plautz, G. E., Gao, X., Huang, L., Shu, S., Gordon, D. and Chang, A. E. (1993). "Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans." Proc Natl Acad Sci USA **90**(23): 11307-11.
- Noone, P. G., Hohneker, K. W., Zhou, Z., Johnson, L. G., Foy, C., Gipson, C., Jones, K., Noah, T. L., Leigh, M. W., Schwartzbach, C., Efthimiou, J., Pearlman, R., Boucher, R. C. and Knowles, M. R. (2000). "Safety and biological efficacy of a lipid-CFTR complex for gene transfer in the nasal epithelium of adult patients with cystic fibrosis." Mol Ther **1**(1): 105-14.
- Obika, S., Yu, W., Shimoyama, A., Uneda, T., Minami, T., Miyashita, K., Doi, T. and Imanishi, T. (1999). "Properties of cationic liposomes composed of cationic lipid YKS-220 having an ester linkage: adequate stability, high transfection efficiency, and low cytotoxicity." Biol Pharm Bull **22**(2): 187-90.
- Pearson, S., Jia, H. and Kandachi, K. (2004). "China approves first gene therapy." Nat Biotechnol **22**(1): 3-4.
- Pedroso de Lima, M. C., Neves, S., Filipe, A., Duzgunes, N. and Simoes, S. (2003). "Cationic liposomes for gene delivery: from biophysics to biological applications." Curr Med Chem **10**(14): 1221-31.
- Pelisek, J., Engelmann, M. G., Golda, A., Fuchs, A., Armeanu, S., Shimizu, M., Mekkaoui, C., Rolland, P. H. and Nikol, S. (2002). "Optimization of nonviral transfection: variables influencing liposome-mediated gene transfer in

- proliferating vs. quiescent cells in culture and in vivo using a porcine restenosis model." J Mol Med **80**(11): 724-36.
- PharmBetrV "Betriebsverordnung für Pharmazeutische Unternehmer (PharmBetrV) vom 8. März 1985 in der aktuell gültigen Fassung. BGBl I:546."
- Pires, P., Simoes, S., Nir, S., Gaspar, R., Duzgunes, N. and Pedroso de Lima, M. C. (1999). "Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells." Biochim Biophys Acta **1418**(1): 71-84.
- Rakhmanova, V. A., Pozharski, E. V. and MacDonald, R. C. (2004). "Mechanisms of lipoplex formation: dependence of the biological properties of transfection complexes on formulation procedures." J Membr Biol **200**(1): 35-45.
- Ratz, H., Schnell, H., Rischer, M. and Eibl, H. J. (2001). "Separation and quantitation of alkylphosphocholines and analogues of different liposome formulations by HPTLC." J AOAC Int **84**(4): 1277-82.
- Remy, J. S., Sirlin, C., Vierling, P. and Behr, J. P. (1994). "Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules." Bioconjug Chem **5**(6): 647-54.
- Reszka, R., Zhu, J., Weber, F., Walther, W., Greferath, R. and Dyballa, S. (1995). "Liposome mediated transfer of marker and cytokine genes into rat and human glioblastoma cells in vitro and in vivo." J Lip Res **5**((1)): 149-167.
- Ross, P. C. and Hui, S. W. (1999). "Lipoplex size is a major determinant of in vitro lipofection efficiency." Gene Ther **6**(4): 651-9.
- Schmutz, M., Durand, D., Debin, A., Palvadeau, Y., Etienne, A. and Thierry, A. R. (1999). "DNA packing in stable lipid complexes designed for gene transfer imitates DNA compaction in bacteriophage." Proc Natl Acad Sci USA **96**(22): 12293-8.
- Seville, P. C., Kellaway, I. W. and Birchall, J. C. (2002). "Preparation of dry powder dispersions for non-viral gene delivery by freeze-drying and spray-drying." J Gene Med **4**(4): 428-37.
- 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): 47453-9.
- Smisterova, J., Wagenaar, A., Stuart, M. C., Polushkin, E., ten Brinke, G., Hulst, R., Engberts, J. B. and Hoekstra, D. (2001). "Molecular shape of the cationic lipid controls the structure of cationic lipid/dioleoylphosphatidylethanolamine-DNA complexes and the efficiency of gene delivery." J Biol Chem **276**(50): 47615-22.
- Smith, J. G., Wedeking, T., Vernachio, J. H., Way, H. and Niven, R. W. (1998). "Characterization and in vivo testing of a heterogeneous cationic lipid-DNA formulation." Pharm Res **15**(9): 1356-63.



- Somia, N. and Verma, I. M. (2000). "Gene therapy: trials and tribulations." Nat Rev Genet **1**(2): 91-9.
- Son, K. K., Patel, D. H., Tkach, D. and Park, A. (2000). "Cationic liposome and plasmid DNA complexes formed in serum-free medium under optimum transfection condition are negatively charged." Biochim Biophys Acta **1466**(1-2): 11-5.
- Stegmann, T. and Legendre, J. Y. (1997). "Gene transfer mediated by cationic lipids: lack of a correlation between lipid mixing and transfection." Biochim Biophys Acta **1325**(1): 71-9.
- Sternberg, B., Sorgi, F. L. and Huang, L. (1994). "New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy." FEBS Lett **356**(2-3): 361-6.
- Stewart, J. C. (1980). "Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate." Anal Biochem **104**(1): 10-4.
- Stopper, H., Jones, H. and Zimmermann, U. (1987). "Large scale transfection of mouse L-cells by electroporation." Biochim Biophys Acta **900**(1): 38-44.
- Talsma, H., Cherng, J., Lehrmann, H., Kurs, M., Ogris, M., Hennink, W. E., Cotten, M. and Wagner, E. (1997). "Stabilization of gene delivery systems by freeze-drying." Int J Pharm **157**(2): 233-238.
- Tang, M. X., Redemann, C. T. and Szoka, F. C., Jr. (1996). "In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers." Bioconjug Chem **7**(6): 703-14.
- Teichler, Z. D. (2000). "US gene therapy in crisis." Trends Genet **16**(6): 272-5.
- Templeton, N. S., Lasic, D. D., Frederik, P. M., Strey, H. H., Roberts, D. D. and Pavlakis, G. N. (1997). "Improved DNA: liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression." Nat Biotechnol **15**(7): 647-52.
- Thomas, M. and Klibanov, A. M. (2003). "Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery." Appl Microbiol Biotechnol **62**(1): 27-34.
- Torchilin, V. P. and Weissig, V. (2003). "Liposomes Second Edition." Oxford University Press.
- Tranchant, I., Thompson, B., Nicolazzi, C., Mignet, N. and Scherman, D. (2004). "Physicochemical optimisation of plasmid delivery by cationic lipids." J Gene Med **6 Suppl 1**: S24-35.
- Uchida, E., Mizuguchi, H., Ishii-Watabe, A. and Hayakawa, T. (2002). "Comparison of the efficiency and safety of non-viral vector-mediated gene transfer into a wide range of human cells." Biol Pharm Bull **25**(7): 891-7.
- Udenfriend, S., Stein, S., Bohlen, P., Dairman, W., Leimgruber, W. and Weigele, M. (1972). "Fluorescamine: a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range." Science **178**(63): 871-2.

- Vassilev, V. B., Gil, L. H. and Donis, R. O. (2001). "Microparticle-mediated RNA immunization against bovine viral diarrhoea virus." Vaccine **19**(15-16): 2012-9.
- Vuorela, P. (1996). "Development of quantitative TLC assay for phospholipid products." J Plan Chrom **9**: 254-259.
- Walther, W. and Stein, U. (2000). "Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases." Drugs **60**(2): 249-71.
- Wasan, E. K., Harvie, P., Edwards, K., Karlsson, G. and Bally, M. B. (1999). "A multi-step lipid mixing assay to model structural changes in cationic lipoplexes used for in vitro transfection." Biochim Biophys Acta **1461**(1): 27-46.
- Werner, W., Dörmann, D. and Krüger, D. (2001). "GMP-gerechte Herstellung von Gentransfer-Arzneimitteln." Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz **44**: 1090-1095.
- Wheeler, C. J., Felgner, P. L., Tsai, Y. J., Marshall, J., Sukhu, L., Doh, S. G., Hartikka, J., Nietupski, J., Manthorpe, M., Nichols, M., Plewe, M., Liang, X., Norman, J., Smith, A. and Cheng, S. H. (1996). "A novel cationic lipid greatly enhances plasmid DNA delivery and expression in mouse lung." Proc Natl Acad Sci USA **93**(21): 11454-9.
- Wieland-Berghausen, S. (1999). "Präparation und Charakterisierung von Liposomen mit asymmetrischer Lipidverteilung." Dissertation: Pharmazeutischen Technologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.
- Wiethoff, C. M., Gill, M. L., Koe, G. S., Koe, J. G. and Middaugh, C. R. (2002). "The structural organization of cationic lipid-DNA complexes." J Biol Chem **277**(47): 44980-7.
- Wiethoff, C. M., Gill, M. L., Koe, G. S., Koe, J. G. and Middaugh, C. R. (2003). "A fluorescence study of the structure and accessibility of plasmid DNA condensed with cationic gene delivery vehicles." J Pharm Sci **92**(6): 1272-85.
- Wiethoff, C. M., Koe, J. G., Koe, G. S. and Middaugh, C. R. (2004). "Compositional effects of cationic lipid/DNA delivery systems on transgene expression in cell culture." J Pharm Sci **93**(1): 108-23.
- Wiethoff, C. M. and Middaugh, C. R. (2003). "Barriers to nonviral gene delivery." J Pharm Sci **92**(2): 203-17.
- Wiethoff, C. M., Smith, J. G., Koe, G. S. and Middaugh, C. R. (2001). "The potential role of proteoglycans in cationic lipid-mediated gene delivery. Studies of the interaction of cationic lipid-DNA complexes with model glycosaminoglycans." J Biol Chem **276**(35): 32806-13.
- Xu, Y., Hui, S. W., Frederik, P. and Szoka, F. C., Jr. (1999). "Physicochemical characterization and purification of cationic lipoplexes." Biophys J **77**(1): 341-53.

- 
- Yang, Y., Nunes, F. A., Berencsi, K., Furth, E. E., Gonczol, E. and Wilson, J. M. (1994). "Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy." Proc Natl Acad Sci USA **91**(10): 4407-11.
- Zabner, J., Fasbender, A. J., Moninger, T., Poellinger, K. A. and Welsh, M. J. (1995). "Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid." J Biol Chem **270**(32): 18997-9007.
- Zanta, M. A., Belguise-Valladier, P. and Behr, J. P. (1999). "Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus." Proc Natl Acad Sci USA **96**(1): 91-6.
- Zelphati, O., Nguyen, C., Ferrari, M., Felgner, J., Tsai, Y. and Felgner, P. L. (1998). "Stable and monodisperse lipoplex formulations for gene delivery." Gene Ther **5**(9): 1272-82.
- Zhdanov, R. I., Podobed, O. V. and Vlassov, V. V. (2002). "Cationic lipid-DNA complexes-lipoplexes-for gene transfer and therapy." Bioelectrochemistry **58**(1): 53-64.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

### **Vorträge:**

J. Clement, R. Peschka-Süss (2002)  
Transfection of endothelial cells – a review  
15<sup>th</sup> Mountain / Sea Liposome Workshop, Oberjoch/Allgäu

J. Clement, R. Peschka-Süss (2003)  
Künstliche Minichromosomen  
4. Pharmazie-Workshop, Oberjoch/Allgäu

J. Clement, K. Kiefer, P. Garidel, R. Peschka-Süss (2003)  
Development of a stable non-viral gene transfer system with suitability for large-scale production  
Vortrag beim “2<sup>nd</sup> Ameland Liposome Workshop”, Ameland, Holland

J. Clement, K. Kiefer, P. Garidel, R. Peschka-Süss (2004)  
Up-scaling der Herstellung von Lipid/DNA-Transfersystemen für die Gentherapie  
Vortrag bei der „Veranstaltung des Fördervereins für Arzneimittelforschung (FAF)“, Freiburg

J. Clement, R. Peschka-Süss (2004)  
Analytik von Lipoplexen  
5. Pharmazie-Workshop, Oberjoch/Allgäu

J. Clement, K. Kiefer, P. Garidel, R. Peschka-Süss (2004)  
Großtechnische Herstellung von lipidhaltigen Gentransfersystemen  
13. FMF-Kolloquium, Titisee

### **Posterpräsentationen:**

J. Clement, K. Kiefer, P. Garidel, R. Peschka-Süss (2003)  
Development of a stable non-viral gene transfer system with suitability for large-scale production  
Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Würzburg

J. Clement, K. Kiefer, P. Garidel, R. Peschka-Süss (2004)  
Evaluation of an appropriate non-viral gene-transfer system for large-scale production  
International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Nürnberg

J. Clement, K. Kiefer, A. Kimpfler, P. Garidel, R. Peschka-Süss (2005)  
Large-scale production of lipoplexes with long shelf-life  
Controlled Release Society German Chapter Annual Meeting, Marburg

J. Clement, K. Kiefer, A. Kimpfler, P. Garidel, R. Peschka-Süss (2005)  
Large-scale production of lipoplexes with long shelf-life  
Lipids, Liposomes, and Biomembranes: New Technologies 2005, Vancouver, Kanada

## **Veröffentlichungen:**

K. Kiefer, J. Clement, P. Garidel, R. Peschka-Süss (2004)

Transfection efficiency and cytotoxicity of nonviral transfection reagents in human smooth muscle and endothelial cells

Pharm. Res. 21: 1015-1023

J. Clement, K. Kiefer, A. Kimpfler, P. Garidel, R. Peschka-Süss (2005)

Large-scale production of lipoplexes with long shelf-life

Eur. J. Pharm. Biopharm. 59: 35-43

# Wissenschaftlicher Werdegang

## ***Persönliche Daten***

Name: Jule Clement  
Geburtsdatum: 25.10.1975  
Geburtsort: Tübingen  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## ***Ausbildung***

### **Schule**

09/1982 – 07/1986 Kreuzerfeldgrundschule, Rottenburg  
09/1986 – 06/1995 Eugen-Bolz-Gymnasium, Rottenburg  
07/1995 Abitur

### **Studium**

11/1995 – 03/2000 Pharmaziestudium an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg  
07/2001 Approbation als Apothekerin

### **Pharmaziepraktikum**

05/2000 – 11/2000 Ipswich-Hospital NHS Trust, Ipswich, England  
12/2000 – 05/2001 Birken-Apotheke, Köln

### **Promotion**

seit 01/2002 Anfertigung der Dissertation mit dem Thema „Methoden zur Charakterisierung von großtechnisch hergestellten Lipoplexten zum Gentransfer“ am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg unter Leitung von Frau PD Dr. Regine Peschka-Süss