

# Entwicklung innovativer nicht-viraler Vektoren zur Gentherapie



---

seit 1558

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades  
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Diplom-Pharmazeut Matthias Zink**

**geboren am 20.04.1986 in Gera**

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dagmar Fischer; Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie; Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. Prof. Dr. Michaela Schulz-Siegmund; Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie; Universität Leipzig
3. Prof. Dr. Andreas Stallmach; Klinik für Innere Medizin IV; Abteilung: Gastroenterologie, Hepatologie, Infektiologie; Universitätsklinikum Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 18.07.2016

Für meine Familie

Für meine Freunde

„Es gibt nichts Gutes, außer: Man tut es.“

[Erich Kästner]

## Danksagung

Mein Dank gilt zuallererst **Prof. Dr. Dagmar Fischer** für die Möglichkeit diese Doktorarbeit in der Zeit vom August 2012 bis Dezember 2015 am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie zu erstellen. Außerdem möchte ich mich für Anleitung, Diskussionen und Hilfestellungen während der Zeit meiner Promotion bis hin zur Erstellung dieser Arbeit bedanken.

**Prof. Dr. Ulrich S. Schubert** möchte ich für die Zusammenarbeit, die Möglichkeit des Besuchs der Seminare am Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie und die Nutzung verschiedener Geräte danken sowie die Finanzierung meiner Stelle über die Carl-Zeiss-Stiftung (Strukturantrag JCSM) und die Möglichkeit des Besuchs verschiedener Kongresse.

Ich danke **Prof. Dr. Alfred Fahr** für die Möglichkeit seine Räume und Geräte zu nutzen.

Ein besonderer Dank gilt **Prof. Dr. Thomas Heinze** sowie **Konrad Hotzel** und **Dr. Cintia S. P. Zarth** vom Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie für die Bereitstellung der Testpolymer sowie zahlreiche Diskussionen über die Polymere und deren Optimierung.

Für die Einführung in verschiedene Methoden und Diskussionen rund um die Bewertung der Polymere insbesondere zu Beginn meiner Arbeit am Institut möchte ich herzlich **Sofia Ochrimenko**, **Stefan Grund** und **Florian Schlenk** danken. Für die technische Unterstützung bei zahlreichen Versuchen danke ich **Angela Herre**, **Ramona Brabetz** und **Alexander Mohn**.

An dieser Stelle sei außerdem allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Pharmazeutische Technologie für die wunderbare Arbeitsatmosphäre und die schöne gemeinsame Zeit auch nach dem Feierabend gedankt!

Abschließend danke ich **Klaus Heise**, **Stephan Holzschuh**, **Sebastian Moritz**, **Sofia Ochrimenko**, **Robert Penzis**, **Markus Rabenhold** und **Wiebke Scharffetter**, die mich beim Schreiben dieser Arbeit durch Anregungen und Korrekturlesen unterstützt haben.



---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1	Genstransfer als Meilenstein zur Behandlung genetischer Erkrankungen.....	7
1.2	Barrieren für den Genstransfer <i>in vivo</i> .....	7
1.3	Trägersysteme zum Genstransfer .....	11
1.4	Struktur und Eigenschaften von Dextran .....	14
1.5	Modifikationen von Dextran als nicht-viraler Vektor zum Genstransfer.....	16
<b>2</b>	<b>Zielstellung der Arbeit</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>23</b>
3.1	Polymere .....	23
3.2	Zellkultur .....	24
3.3	Plasmid-DNA .....	25
3.4	Herstellung von Komplexen aus DNA und Polymeren .....	27
3.5	Untersuchung der Toxizität der Polymere.....	28
3.5.1	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assay .....	28
3.5.2	Hämolyse .....	29
3.5.3	Aggregation roter Blutzellen .....	30
3.6	Physikochemische Untersuchungen der Komplexe .....	31
3.6.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	31
3.6.2	AccuBlue™-Assay.....	32
3.6.3	Messung von hydrodynamischen Durchmesser und Zetapotential der Komplexe .....	32
3.7	Untersuchung der Transfektionseffizienz der Komplexe .....	33
3.8	Lagerstabilität der Komplexe .....	35
3.8.1	Untersuchung des Einflusses verschiedener Lagerbedingungen auf die Komplexe .....	35
3.8.2	Untersuchung des Einflusses von Gefriertrocknungs- und Rekonstitutionszyklen auf die Komplexe .....	35
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>36</b>
4.1	Einfluss des Grundgerüsts auf die biologischen und physikochemischen Eigenschaften der Vektoren .....	36
4.1.1	Untersuchung der Biokompatibilität der Methylaminobutyrat-substituierten Vektoren <i>in vitro</i> .....	36
4.1.2	Untersuchung der mit Methylaminobutyrat substituierten Vektoren auf Komplexierung, Kondensation, Größenreduktion und Schutz der DNA vor DNase .....	42

---

4.1.3	In-vitro-Transfektionseffizienz Methylaminobutyrat-modifizierter Dextrane und Zellulosen....	48
4.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen von Dextranen und Zellulosen als Grundgerüst für einen potentiellen Vektor zum Gentransfer .....	51
4.2	Einfluss verschiedener Substituenten auf die Eigenschaften von Dextran zum Gentransfer .....	51
4.2.1	Einfluss der mit Glycin, $\beta$ -Alanin oder Lysin substituierten Dextrane auf die Zellviabilität von Fibroblasten und Erythrozyten in vitro .....	52
4.2.2	Untersuchung der Fähigkeit zur Kondensation, Größenreduktion und Schutz von DNA vor DNase von mit Glycin, $\beta$ -Alanin oder Lysin substituierten Dextranen.....	59
4.2.3	In-vitro-Transfektionseffizienz der mit $\beta$ -Alanin bzw. Lysin substituierten Dextrane.....	64
4.2.4	Zusammenfassung der Untersuchungen von Dextran substituiert mit Glycin, $\beta$ -Alanin oder Lysin auf Eignung als Vektor zum Gentransfer .....	67
4.3	Kombination der vorteilhaften Eigenschaften von $\beta$ -Alanin und Lysin konjugiert an Dextran zum Einsatz als Vektor zum Gentransfer .....	68
4.3.1	Untersuchung der Toxizität von mit $\beta$ -Alanin und Lysin substituierten Dextranen an murinen Fibroblasten und Erythrozyten in vitro .....	69
4.3.2	Untersuchung der Kondensation, Größenreduktion und des Schutzes vor DNasen von Plasmid-DNA durch $\beta$ -Alanin- und Lysin-substituierte Dextrane.....	73
4.3.3	Abhängigkeit der Transfektionseffizienz der $\beta$ -Alanin- und Lysin-substituierten Dextrane mit pGL3 in vitro vom Substitutionsgrad der Aminosäuren .....	76
4.3.4	Gezielte Steuerung der Eigenschaften des Vektors durch Konjugation von $\beta$ -Alanin und Lysin an ein Dextrangrundgerüst .....	77
4.4	Lagerstabilität der Komplexe .....	78
4.4.1	Untersuchung des Einflusses verschiedener Lagerbedingungen auf die physikochemischen Eigenschaften der Komplexe sowie ihre Transfektionseffizienz.....	78
4.4.2	Untersuchung des Einflusses von Gefriertrocknungs- und Rekonstitutionszyklen auf den hydrodynamischen Durchmesser und das Zetapotential der Komplexe .....	85
<b>5</b>	<b>Gesamtdiskussion</b>	<b>88</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>107</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>118</b>
	<b>Annex I: Summary</b>	<b>119</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Gentransfer als Meilenstein zur Behandlung genetischer Erkrankungen

Das Genom ist der Träger vererbbarer Informationen in allen Zellen. Auf Grundlage der Sequenz der Basen im Genom ist die Zelle nach Transkription und Translation eines Gens in der Lage aus Aminosäuren Proteine zu produzieren. Viele Krankheiten, wie z. B. Hämophilie, zystische Fibrose, schwere kombinierte Immundefizienz (X-SCID), Alzheimer und Krebs basieren auf fehlerhaften genetischen Faktoren [1]. Das moderne Verständnis des humanen Genoms macht es möglich, die Ursache für diese Fehler zu finden und gegebenenfalls zu beseitigen. Bereits vor der Beschreibung der Struktur von Desoxyribonukleinsäure (DNA) im Jahre 1953 durch Watson und Crick [2] wurde der Bedarf von Gentherapie zur Behandlung bestimmter Erkrankungen postuliert [3]. *In vitro* kann der Gentransfer zur Produktion gewünschter z. B. therapeutischer Proteine durch Zellen verwendet werden. Viele dieser sogenannte Biopharmazeutika befinden sich bereits auf dem Markt, wie z. B. der Antikörper Ranibizumab (Lucentis®), welcher aus *Escherichia coli* (*E. coli*) gewonnen und bei feuchter altersbedingter Makuladegeneration eingesetzt wird [4] oder der Impfstoff Gardasil®, welcher in *Saccharomyces cerevisiae* produziert wird und gegen humane Papillomaviren (HPV) wirkt [5]. Die klassische Gentherapie, das heißt das Einbringen von Nukleinsäuren in Zellen *in vivo* oder *ex vivo*, ist ein therapeutischer Ansatz, der als Meilenstein in der Behandlung genetischer Erkrankungen angenommen wird. Mit diesem therapeutischen System ist es möglich, fehlende oder fehlerhafte Gene zu ersetzen (Substitutionstherapie) oder zu unterdrücken (Gen-Stillegung).

### 1.2 Barrieren für den Gentransfer *in vivo*

Um DNA in eine Zielzelle zu transportieren, stehen eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Verfügung [6]. So kann sie unter anderem mittels Mikroinjektion direkt in die Zielzelle injiziert [7] oder die Transfektion mittels Thermoporation durch Laserstrahlen [8] oder Elektroporation [9] vermittelt werden. Allerdings sind all diese Verfahren sehr aufwendig und oftmals ineffizient. So muss im Falle der Mikroinjektion jede Zelle einzeln transfiziert werden, während der Einsatz von Lasern, als hochspezialisiertes Verfahren nur in wenigen Laboren angeboten werden kann, und die Elektroporation die Zellen stark beschädigt [6]. Eine intravenöse Applikation einer therapeutischen Dosis am Patienten wäre daher ein großer Fortschritt. Allerdings eignet sich ungeschützte DNA nicht zum Gentransfer nach intravenöser Applikation. Im Blut vorkommende Endo- und Exonukleasen führen durch Spaltung der inneren bzw. endständigen Phosphodiesterbindung zum Abbau der DNA zu Oligonukleotiden bzw. Nukleinsäuremonomeren [10]. Außerdem kann DNA akute Entzündungsreaktionen hervorrufen, die Zytokinausschüttung provozieren und somit für eine rasche Clearance sorgen [11]. Die

Halbwertszeit ungeschützter DNA liegt aufgrund all dieser Faktoren bei <5 Minuten [12]. Aus diesem Grund ist die richtige Formulierung für Nukleinsäuren als Therapeutikum wichtig. Das Trägersystem für DNA wird als Vektor bezeichnet. Der Träger oder Vektor der Nukleinsäure muss auf dem Weg zum Nukleus der Zielzelle viele Hürden überwinden (Abbildung 1). So muss er zuallererst die Fähigkeit besitzen Nukleinsäuren zu kondensieren, also in ihrem Volumen zu reduzieren und dicht zu packen, und zu komplexieren [13, 14], um sie als Komplex auf Größe von 20 bis 200 nm [15] auch über einen längeren Lagerzeitraum zu stabilisieren [16]. Nach der Herstellung der Komplexe können Aggregation und Zerfall durch thermodynamische Instabilität zur begrenzten Anwendbarkeit der Formulierung führen [17]. Auch die Struktur der verwendeten Nukleinsäure zu beachten. Plasmid-DNA (pDNA), welche typischerweise zum Einbringen von Erbinformationen in den Zellkern verwendet wird, ist mehrere tausend Basenpaare (bp) lang. Da DNA aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladen ist, kann die Komplexierung durch kationische Trägersysteme (z. B. Liposomen, Polymere, Peptide) über elektrostatische Wechselwirkung erfolgen. Dabei wickelt oder faltet sich die relativ flexible DNA entweder vor der Bindung an z. B. kationische Polymere auf oder wickelt sich direkt um das Polymer [18]. Komplexe aus synthetischem Polymer bzw. Liposom und Nukleinsäuren werden als Polyplexe bzw. Lipoplexe bezeichnet [19-21]. Bei neutralen oder negativ geladenen Liposomen ist außerdem eine Verkapselung in das hydrophile Innere der Liposomen möglich [22]. Die Größe der Formulierung ist ein wichtiger Faktor für den Transport in der Blutbahn. Vor allem in der Krebstherapie ist ein passives Targeting dank der durch Angiogenese „löchrigen“ Gefäße mit Formulierungen zwischen 10 und 150 nm möglich. Kleinere Formulierungen (<10 nm) unterliegen rascher renaler Elimination [15], wohingegen größere (>200 nm) von Makrophagen aufgenommen werden [23]. Mit einer Größe von >150 nm wiederum weißt die Formulierung eine schlechtere Penetration in das Tumorgewebe auf [15, 24]. Nach der intravenösen Applikation ist die Formulierung einer Vielzahl von Einflüssen ausgesetzt (Abbildung 1). Der Vektor muss unter anderem die DNA vor Nukleasen schützen, die den Abbau der DNA verursachen. Außerdem können eine Vielzahl von Proteinen aus dem Blut, innerhalb von weniger als einer Minute, eine Korona um Nanopartikel bilden oder durch ihre negative Ladung die DNA aus der Bindung mit dem Vektor verdrängen. Eine Proteinkorona kann aus nicht weniger als 200 verschiedenen Proteinen bestehen [25], welche die Eigenschaften des Trägers, wie die Interaktionsfähigkeit mit Zellen positiv, oder negativ beeinflusst [26]. Zusätzlich ist bei Anlagerung von Proteinen die Wirkung des Vektors als Hapten möglich.

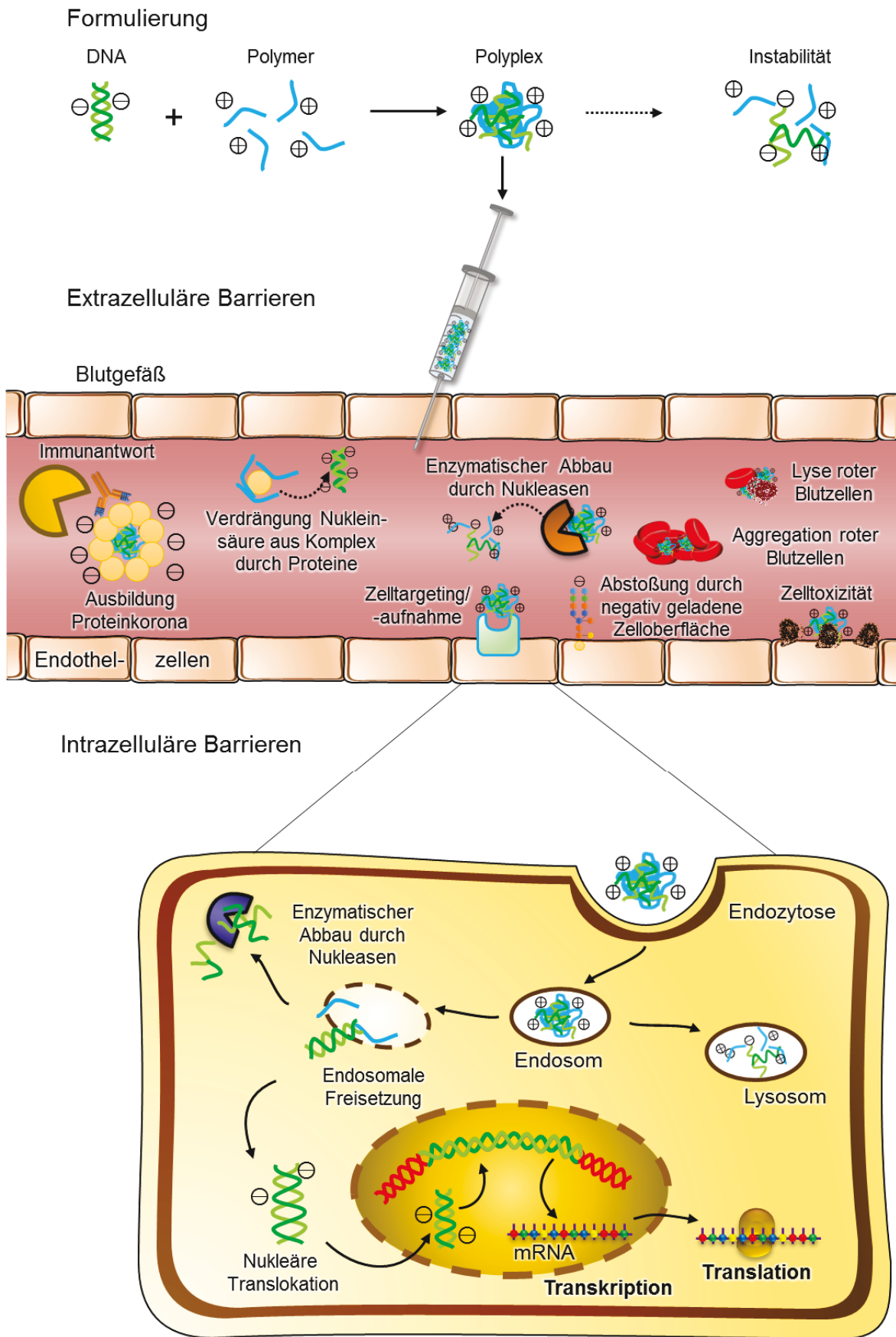


Abbildung 1: Barrieren für den Gentransfer am Beispiel einer DNA formuliert mit einem synthetischen kationischen Polymer [modifiziert und ergänzt nach [27]]

Das heißt der Vektor könnte nach Interaktion mit Proteinen als Antigen erkannt werden. Antikörper und unspezifische Immunzellen würden eine Immunreaktion hervorrufen, was für eine rasche Elimination sorgt [11]. Auch die im Blutstrom vorkommenden Erythrozyten können mit dem Vektor interagieren. Die positive Ladung des Vektors kann dabei zur Aggregation roter Blutzellen führen, was die Gefahr von z. B. Schlaganfällen oder Lungenembolien mit sich bringt. Ladungsabhängig kann es außerdem zur Lyse der Erythrozyten kommen [28].

Als nächste Hürde präsentiert sich die Zellmembran. Sie ist aufgrund einer Vielzahl von Proteinen, Glykoproteinen sowie Gangliosiden (Glykolipiden) mit endständigen Sialinsäuren negativ geladen ist und kann somit Nukleinsäuren elektrostatisch abstoßen [29]. Die Struktur des Trägers sollte eine Interaktion mit der Zelloberfläche ermöglichen und zur Endozytose führen [30]. Dies kann je nach Vektor eine Fusion mit der Zellmembran, z. B. bei neutralen Lipiden [11] oder elektrostatische Interaktion, z. B. bei kationischen Polymeren, sein [31]. Eine zu starke kationische Ladung kann dabei zur Lyse der Zelle führen. Die Diskrepanz der Interaktion der kationischen Träger zwischen Zellinteraktion zur Endozytose und Zelltoxizität durch die Lyse der Zelle wird als „Ladungsdilemma“ bezeichnet [32]. Die Aufnahme in die Zelle ist je nach Partikelgröße durch eine clathrin- oder caveolinabhängige Aufnahme möglich [33, 34]. Dabei scheint für Partikel mit <200 nm Durchmesser die Aufnahme via clathrinabhängiger Endozytose zu überwiegen [35]. Aber auch Aufnahmemechanismen für größere Partikel via Makropinozytose (500 nm) oder Phagozytose (10 µm), z. B. bei Makrophagen, sind beschrieben [36]. Nach Überwinden der Zellmembran befinden sich DNA und Vektor im Endosom, bei dessen niedrigem pH-Wert die DNA stabilisiert werden muss. Über die Lebensdauer der Endosomen kann dieser pH-Wert bis auf 4,5 absinken. Sie werden dann als Lysosomen bezeichnet. Außerdem muss die Freisetzung rasch erfolgen, da die DNA sonst wieder exozytiert werden kann [37]. Der Mechanismus der Freisetzung aus dem Endosom ist je nach Vektor verschieden und hat einen starken Einfluss auf die Transfektionseffizienz [38]. So wurde z. B. von einem Anteil von lediglich 2 % freigesetzter Nukleinsäure aus dem Endosom berichtet [39]. Bei kationische Lipiden kommt es nach Interaktion mit der Lipiddoppelmembran des Endosoms zur Ausbildung von Ionenpaaren und folglich zur Destabilisierung der Membran und Freisetzung der DNA [40]. Kationische Polymere mit vielen Aminfunktionen mit hohem  $pK_a$  können den niedrigen pH-Wert im Inneren des Endosoms puffern. Dies führt zur Aktivierung von Protonenpumpen, die für einen Einstrom von Wasserstoffionen sorgen. Die, durch den Nachstrom von Chloridionen, steigende Ionenkonzentration im Inneren des Endosoms führt zum Einströmen von Wasser aufgrund des osmotischen Drucks, was das Platzen des Endosoms und somit die Freisetzung der Nukleinsäure zur Folge hat. Dieses Freisetzungsprinzip wird in der

„Protonenschwammtheorie“ beschrieben. Die Freisetzung steigt mit steigender Pufferkapazität des Trägers. Diese steigt wiederum mit steigender molarer Masse und Verzweigungsgrad an und auch mit der alkalischen Funktion des Polymers (Kapitel 1.5) [12]. Peptidträgersysteme aus zellpenetrierenden Peptiden (CPPs) für DNA können ebenfalls aufgrund ihrer Pufferkapazität nach der Protonenschwammtheorie zu einer Freisetzung aus dem Endosom führen. Außerdem ist eine Änderung ihrer dreidimensionalen Struktur, aufgrund der Protonierung im Endosom, beschrieben. In Folge kann es zur Fusion mit der Endosomenmembran und Ausbildung von Poren kommen, die zur Lyse des Endosoms führen können [21]. Durch Protonierung innerhalb des Endosoms sowie die rasche Freisetzung in das Zellplasma wird die DNA vom Träger getrennt und erneut der Gefahr des Abbaus durch Nukleasen ausgesetzt [41]. Allerdings wurde hier eine Halbwertszeit von 50 bis 90 Minuten für pDNA gefunden [11]. Für die pDNA ist im Zellplasma eine weitere Translokation in den Zellkern nötig. Diese dauert für pDNA durchschnittlich 6–8 Stunden [42]. Die Größe und Struktur der Nukleinsäure ist im Zellplasma für die Beweglichkeit relevant. So diffundiert supercoiled Plasmid-DNA schneller als offen-zirkuläre, welche wiederum um den Faktor drei schneller diffundiert als lineare DNA [43]. Das Überwinden der Zellkernmembran findet entweder während der Zellteilung statt oder bei sich nicht teilenden Zellen mittels passiven Transport. Dieser ist für Moleküle kleiner 40.000 g/mol bzw. 9 nm via nukleärem Porenkomplex [42], der den Stoffaustausch zwischen Zellkern und Zellmembran kontrolliert [44], möglich. Größere Moleküle mit einem Durchmesser von >39 nm müssen aktiv transportiert werden. Die Translokationsgeschwindigkeit zum Zellkern kann durch die Verwendung nukleärer Lokalisierungssequenzen (NLS), wie z. B. Karyopherin  $\beta$ 2, um den Faktor 10 verbessert werden [42].

### 1.3 Trägersysteme zum Gentransfer

Wie in Kapitel 1.2 beschrieben ist ein Vektor zum Gentransfer von Vorteil, um Nukleinsäure nach intravenöser Applikation in die Zielzelle zu transportieren. Nach intensiver Forschung in den vergangenen Jahren stehen immer mehr Gentransfersysteme kurz vor oder sie befinden sich bereits in der klinischen Prüfung. Allein im Jahr 2015 fanden mehr als 2000 klinische Studien zur Gentherapie statt, wovon fast 100 bereits in späten Stadien klinischer Prüfung waren (Phase III und IV, Abbildung 2A) [45, 46]. Von allen Vektoren zum Gentransfer sind Viren am weitesten verbreitet [47] und machten über 60 % der klinischen Studien zur Gentherapie im Jahr 2015 aus (Abbildung 2B). Es liegt in ihrer Natur Zellen zu infizieren und ihre DNA zur Replikation zu transduzieren. Ihre Einsatzmöglichkeit zur Transduktion therapeutischer Nukleinsäuren liegt damit auf der Hand [48]. Auch die ersten therapeutischen Systeme auf dem Markt sind

virusbasiert, wie z. B. Gendicine [49] und Oncorine [50], welche für ein p53-Tumorsuppressorgen kodieren und 2003 bzw. 2005 zur Behandlung von Kopf- und Halstumoren auf dem chinesischen Markt zugelassen wurden. Glybera als erstes Gentherapeutikum in der Europäischen Union erhielt 2012 die Marktzulassung und wird gegen Lipoproteinlipase-Defizienz eingesetzt [27]. Nichtsdestotrotz hat die Therapie mit virusbasierten Systemen Nachteile (Tabelle 1), wie niedrige Biokompatibilität, hohe Immunogenität und die Gefahr der Insertionsmutagenese [51]. Letztgenannte ist Folge des Einbaus der transportierten Nukleinsäure in das Genom der Zielzelle. Der Einbau hat einerseits den Vorteil einer dauerhaften Expression. Andererseits kann bei Einbau in die Sequenz eines Tumorsuppressorgens dieses Gen inaktiviert oder, die Aktivierung eines Protoonkogens begünstigt werden, was zur Entwicklung einer Tumorzelle führen kann [52]. Außerdem ist die Größe der Nukleinsäuren eingeschränkt, da einige virale Systeme nur eine niedrige Transportkapazität von z. B. 5.000 bp bei Adeno-assoziierten Viren haben [53, 54]. Zusätzlich ist die Herstellung von Vektoren auf der Basis von Viren kostenintensiv und aufwendig [55].

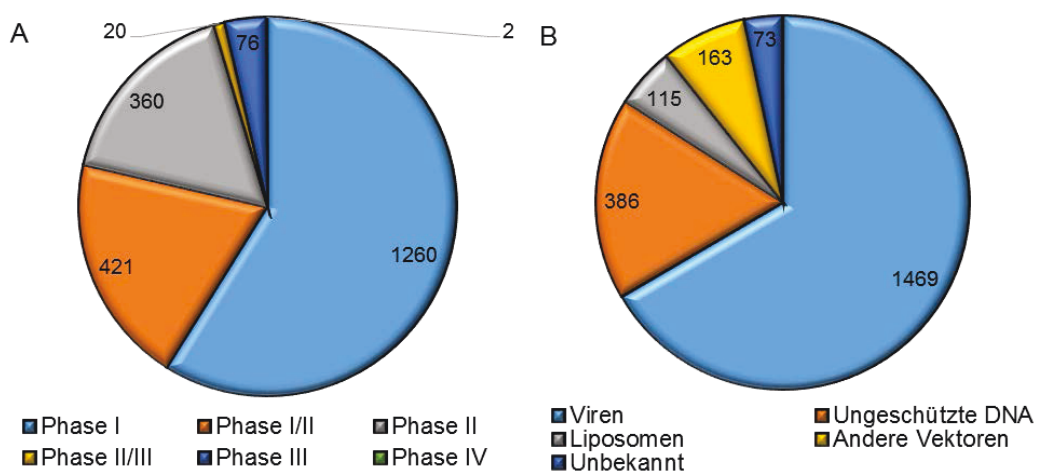


Abbildung 2: Anzahl der klinischen Studien zur Gentherapie 2015 in verschiedenen Phasen (A). Anzahl klinischer Studien zur Gentherapie 2015 mit verschiedenen Vektoren (B) [56, 57].

Um diese Nachteile zu umgehen war die Entwicklung nicht-viraler Systeme notwendig. Im Jahr 1965 wurden erstmals kationische Polymere zur Transfektion eingesetzt, als für Diethylaminoethyl-(DEAE-)Dextran eine gesteigerte Transfektion viraler RNA in Zellen sowie Schutz der beladenen RNA vor Nukleasen festgestellt wurde [58]. Lipid-basierte Vektoren zum Gentransfer wurden erstmals 1987 verwendet, um die bis dahin auftretenden Probleme polymerer Vektoren, wie Toxizität, unzureichende Reproduzierbarkeit der Transfektion und ineffizienten Nukleinsäuretransfer, zu lösen [59]. Bis heute sind Lipid-basierte Vektoren aufgrund ihrer, im Vergleich zu Polymeren bis 10-fach, erhöhten Transfektionseffizienz [27] die am besten untersuchten Trägersysteme für Nukleinsäuren [1, 60]. Nachteilig an diesen Systemen sind



allerdings die geringe Reproduzierbarkeit in der Herstellung und vor allem ihre geringe kolloidale Stabilität. Instabilität zeigten dabei vor allem neutrale Liposomen während der Lagerung sowie kationische nach Kontakt mit Salzen oder Blutplasma, was zur Aggregation der Liposomen führt [61]. Vor ca. 25 Jahren wurde das transfizierende Potential von Zellpenetrierenden Peptiden (CPPs) entdeckt [62]. Die Anwendung erfolgt meist zusammen mit anderen nicht-viralen Methoden, indem sie verschiedene Aspekte viraler Proteine, wie z. B. Zellerkennung oder Membranpenetration imitieren [6].

*Tabelle 1: Vor- und Nachteile einer Auswahl von Vektoren zum Gentransfer.*

<b>Vektor</b>	<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>	<b>Quellen</b>
<b>Viren</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sehr hohe Transduktionseffizienz</li> <li>• Je nach Virus gewebespezifische Promotoren</li> <li>• Schnelle Expression</li> <li>• Integration DNA in Genom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niedrige Biokompatibilität</li> <li>• Hohe Immunogenität</li> <li>• Gefahr Insertionsmutagenese</li> <li>• Teilweise niedrige Transportkapazität</li> <li>• Kostenintensive und aufwendige Herstellung (schwieriges Upscalen)</li> </ul>	[51-55]
<b>Zellpenetrierende Peptide</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gezieltes Targeting von Gewebe durch Aminosäuresequenz</li> <li>• Übergang über die Blut-Hirn-Schranke</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geringe Transfektionseffizienz</li> <li>• Aufwendige individuelle Anpassung des Trägers an Ladung und Zielzellen nötig</li> </ul>	[6, 62]
<b>Liposomen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hohe Transfektionseffizienz</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geringe Reproduzierbarkeit der Herstellung</li> <li>• Geringe kolloidale Stabilität</li> </ul>	[1, 27, 59-61]
<b>Polymere (synthetische)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hohe Transfektionseffizienz</li> <li>• Einfache reproduzierbare chemische Modifikation</li> <li>• Hohe Transportkapazität</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geringe Biokompatibilität</li> <li>• Geringe Bioabbaubarkeit</li> </ul>	[11, 32, 59, 63-67]
<b>Polymere (natürliche)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hohe Biokompatibilität</li> <li>• Geringe Immunogenität</li> <li>• Bioabbaubarkeit</li> <li>• Einfache reproduzierbare chemische Modifikation</li> <li>• Hohe Transportkapazität</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Teilweise geringe Transfektionseffizienz</li> </ul>	[11, 32, 63]

Vergleicht man Liposomen bezüglich ihrer Herstellung mit polymeren Systemen, zeigen letztere den Vorteil reproduzierbarer Modifikation und flexibler Optimierung der Struktur für verschiedene Spezifikationen. Dies kann z. B. die Konjugation von Zielstrukturen für spezifische

Zellen, unter anderem mit Hilfe von CPPs, oder ein besserer Schutz vor DNasen sein [11, 63]. Außerdem kann z. B. das Einbringen von Aminen die Bindeeffizienz für DNA, aber auch die Zytotoxizität beeinflussen. Sowohl die Bindeeffizienz als auch die Toxizität steigen mit dem Substitutionsgrad der Aminfunktion mit primär < sekundär < tertiär < quartär [11]. Auch die molare Masse hat Einfluss auf die Eigenschaften des Vektors. So zeigt z. B. 70.000 g/mol bPEI eine hohe Transfektionseffizienz von 25,6 % der behandelten Zellen, wohingegen kurzkettiges bPEI (z. B. 1.800 g/mol) keinerlei Transfektionseffizienz aufwies [64, 65]. Als Goldstandard für den nicht-viralen polymeren Gentransfer setzte sich bPEI durch, das 1995 erstmals verwendet wurde [68-70]. Allerdings bringt PEI, genau wie auch andere synthetische Polymere, den Nachteil einer fehlenden Bioabbaubarkeit mit sich [66]. Die stark positive Ladung durch sekundäre und tertiäre Aminfunktionen bedingt die Toxizität von bPEI durch Interaktion mit negativ geladenen Zelloberflächen [67]. Die Akkumulation nicht-bioabbaubarer toxischer Vektoren im Organismus ist daher der größte Nachteil synthetischer Polymere als Trägersystem. Aus diesem Grund rückte der Fokus auf natürliche Polymere, welche die Vorteile der Bioabbaubarkeit, Biokompatibilität, fehlenden Immunogenität und guten Wasserlöslichkeit mit sich brachten. Zusätzlich lassen sich an diese natürlichen Polymere, wie auch bei synthetischen, mittels funktioneller Gruppen Zielstrukturen, wie z. B. Antikörper, Wirkstoffe oder Copolymere konjugieren [32]. Bioabbaubare Polymere können aus Polyaminosäuren, wie z. B. Poly-L-Lysin, Proteinen, wie Kollagen, oder Polysacchariden aus pflanzlichen, tierischen, menschlichen oder mikrobiellen Quellen, wie z. B. Zellulose, Chitosan oder Dextran, bestehen [32]. Einige dieser natürlichen Polymere tragen von sich aus eine kationische Ladung, wie z. B. Chitosan. Andere benötigen einen zusätzlichen Syntheseschritt zur Modifikation der funktionellen Gruppen, um eine kationische Funktion zur elektrostatischen Wechselwirkung mit Nukleinsäuren zu erhalten z. B. Zellulose oder Dextran. Ein Einsatz natürlicher Polymere bringt also eine Vielzahl an Vorteilen mit sich, was sie als Träger für DNA attraktiv macht [63, 71].

#### 1.4 Struktur und Eigenschaften von Dextran

Louis Pasteur entdeckte 1861 ein Schleim produzierendes Bakterium [72], das von van Tieghem den Namen *Leuconostoc mesenteroides* bekam. Der „Schleim“ wurde von Scheibler als Dextran deklariert [73]. Dextran ist ein hydrophiles Polysaccharid, welches aus D-Glukoseeinheiten besteht, die  $\alpha$ -(1→6)-glykosidisch zu einer Hauptkette verbunden sind. Je nach Bakterium, welches für die Synthese verwendet wird, findet man auch  $\alpha$ -(1→2)-,  $\alpha$ -(1→3) und  $\alpha$ -(1→4)-glykosidische Verknüpfungen (Abbildung 3) [74]. Neben der Art des Bakteriums haben auch die Temperatur sowie die Saccharosekonzentration im Medium einen Einfluss auf die Quervernetzung. Für die gute Wasserlöslichkeit sowie die Flexibilität des Polymers ist die

$\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glykosidische Bindung verantwortlich [73]. Natürliches durch *L. mesenteroides* synthetisiertes Dextran hat eine molare Masse von  $9 \cdot 10^6$  bis  $5 \cdot 10^8$  g/mol. Der Polydispersitätsindex (PDI) steigt mit steigender molarer Masse. Für industrielle und klinische Anwendungen folgt auf die Synthese eine partielle Hydrolyse und Fraktionierung, um gewünschte molare Masse mit niedrigem PDI zu gewinnen. Zusätzlich zur partiellen Hydrolyse und Fraktionierung können Dextranasen als degradierende Enzyme eingesetzt werden, um die Molmassenverteilung zu senken [73]. Vorteile von Dextran sind unter anderem die hervorragende Bioabbaubarkeit und Eliminierbarkeit [75-77]. Die Bioabbaubarkeit ist  $\alpha$ -1-Glukosidasen zu verdanken, welche in Milz, Leber, Lunge und Nieren vorkommen. Zusätzlich sezernieren im Darm vorkommende Bakterien Dextranasen [78].

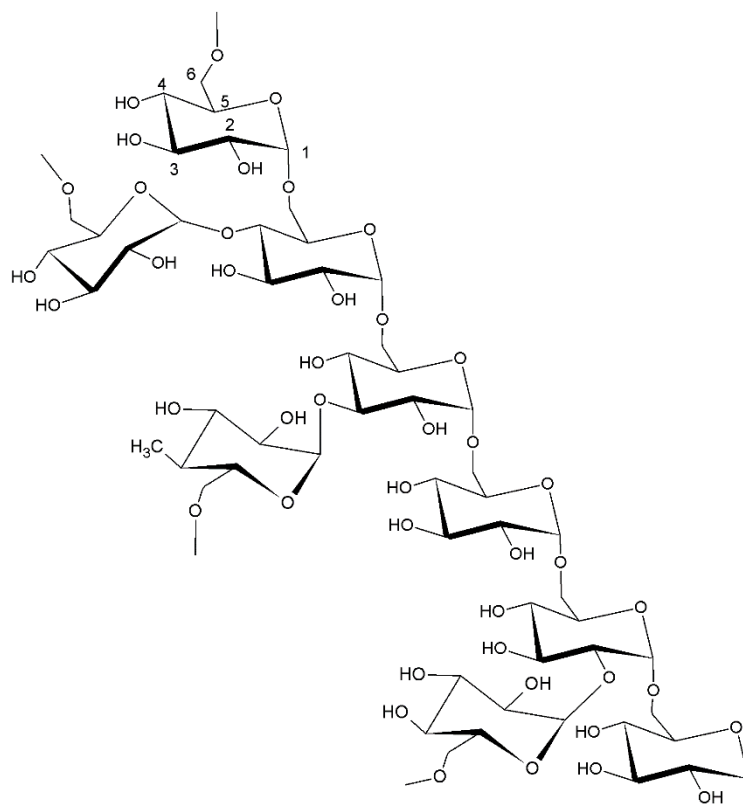


Abbildung 3: Teil einer  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-verknüpften Glukosehauptkette von Dextran mit Verzweigungen an der 2-, 3- und 4-Position

Die Halbwertszeit von Dextran hängt von der molaren Masse ab. Oberhalb der Nierenschwelle (>50.000 g/mol) haben z. B. 60.000- und 70.000 g/mol-Dextran eine Halbwertszeit von 20 bis 30 Stunden, wohingegen Dextran mit einer molaren Masse von 40.000 g/mol eine Halbwertszeit von ca. 6 Stunden hat, da es direkt glomerulär filtriert werden kann [79, 80].

Ein weiterer Vorteil ist die lange Erfahrung in der Anwendung von Dextran bspw. durch den Einsatz als Plasmaexpander, aber auch als Wirkstoffträger oder Wundauflage (Tabelle 2). Dadurch gilt es heute als GRAS (generally regarded as safe) [73, 81], da auch Gewebeschäden,

Nekrosen und Immunogenität bei lokaler und systemischer Applikation ausgeschlossen werden können [82, 83]. Eine Aktivierung des Komplementsystems ist lediglich für Dextrane mit einer Molekülmasse von >60.000 g/mol beschrieben [84]. Dextran kann außerdem die Immunogenität der mit ihm konjugierten Antikörper oder Proteine senken [85, 86].

*Tabelle 2: Pharmazeutische Anwendungsgebiete von Dextran und die jeweils verwendeten molaren Massen.*

<b>Molare Masse (g/mol)</b>	<b>Anwendung</b>	<b>Quelle</b>
40.000	Antithrombotikum	[73, 87]
60.000, 70.000	Plasmaexpander	[73, 88, 89]
10.000 – 2.000.000	Wirkstoffträger	[81, 86, 90, 91]
6.000 – 76.000	Wundauflage	[92-95]
70.000	Augenbefeuchtungsmittel	[96]
6.000, 70.000	Leberspezifischer Wirkstofftransport	[97, 98]

Mit dem Vorteil hoher Biokompatibilität und langer Erfahrung der sicheren Anwendung zeigt Dextran ausgezeichnete Voraussetzungen, um nach kationischer Modifikation als Vektor zum Gentransfer eingesetzt zu werden. Die zahlreichen freien Hydroxylgruppen des Moleküls erlauben einfache Modifikationen [78], so dass eine Vielzahl kationischer Derivate seit seiner ersten Verwendung 1965 [58] bis heute [99] hergestellt und als Basis für den nicht-viralen Gentransfer eingesetzt wurden [63].

### 1.5 Modifikationen von Dextran als nicht-viraler Vektor zum Gentransfer

Für die Anwendung als Vektor zum Gentransfer sind bereits viele Modifikationen von Dextran vorgenommen worden. Bei diesen kann zwischen Dextran-*graft*-Copolymeren (Tabelle 3) und Oligoamindextranen (Tabelle 4) unterschieden werden. Bei ersteren handelt es sich um kationische Polymere, wie Polyethylenimin (PEI) oder Peptide, die an Dextran konjugiert werden. Dagegen sind Oligoamine kurzkettige kationische Moleküle, wie z. B. Agmatin oder Spermin. Dieses Kapitel soll eine Übersicht über Modifikationen von Dextran zum Einsatz als Trägersystem für Nukleinsäuren geben.

Tabelle 3: Dextran-graft-Copolymere zum Einsatz als Vektor zum Gentransfer (wenn nicht anders angegeben ist PEI = 25.000 g/mol bPEI).

	Dextran-Polyethylenimin	Dextran-Methacrylat	Dextran-p(DMAEMA)	Dextran-Peptid
<b>Ziel</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erhöhung der Biokompatibilität durch Maskierung der kationischen Ladung von PEI mit Dextran</li> <li>• Erhöhung der Transfektionseffizienz kurzkettiger PEIs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zeitgesteuerte Freisetzung von Nucleinsäuren durch gut definierte Bioabbaubarkeit hergestellter Hydrogele</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Einbringen tertiärer und quartärer Aminfunktionen mit N,N-Dimethylaminoethylmethacrylat (DMAEMA) in Dextran</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nutzen endogener Funktion von Peptiden, wie Zelltargeting oder Schutz vor enzymatischem Verdau</li> </ul>
<b>Kopplungsstrategie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduktive Aminierung</li> <li>• EDC-Kopplung über Carboxylfunktion</li> <li>• Kopplung über bifunktionelles Hexamethyldiisocyanat</li> <li>• Kopplung über Disulfidbrücken</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Emulsionsphotopolymerisation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atom Transfer Radikal Polymerisierung (ATRP)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kopplung über Succinidyl-carbamat</li> <li>• Einbringen in feste Lipidnanopartikel</li> </ul>
<b>Toxizität</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quervernetzung von 1.500- &amp; 10.000 g/mol Dextran vor Konjugation an PEI führt zu Viabilität &gt;90 % an CHO-K1-Zellen</li> <li>• Kopplung von Dextran (15.000 – 200.000 g/mol) und PEI (800 – 2000 g/mol) reduziert Toxizität an HEK293-Zellen um ca. 40 %</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PEGylierung reduzierte:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Toxizität hoher Hydrogelkonzentration an HuH-7-Zellen (90 statt 40 % Viabilität bei 500 µg/ml)</li> <li>○ Interaktion mit Plasmabestandteilen</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vergleichbar mit PEI in HEK 293 und L929</li> <li>• Konnte durch Einbringen von PEG und bioabbaubaren Disulfidbrücken verringert werden (Viabilität &gt;60 % im Vergleich zu &lt;20 % bei N/P 30)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Keine Blut- und Zelltoxizität</li> </ul>
<b>In vitro</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kopplung von Dextran (1.500 und 10.000 g/mol) an l- und bPEI führte zu wasserlöslichen Polymeren, deren Transfektionseffizienz aufgrund der sterischen Hinderung von PEI um 85 % abnahm</li> <li>○ Quervernetzung von Dextran vor Konjugation an PEI führt zu Transfektionseffizienz gleich unmodifiziertem PEI</li> <li>• Bei Kopplung 15.000 – 200.000 g/mol-Dextran &amp; 800 – 2000 g/mol PEI blieb Transfektionseffizienz gleich ungekoppelten PEI</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Steigender Vernetzungsgrad führte zu Freisetzung über bis zu 5 Tage</li> <li>• Interaktion mit Blutzellen führt zum Verlust der siRNA</li> <li>• Knockdown, wie Lipofectamin® 2000 in HuH-7 Leberzellen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tertiäre Aminfunktion: vergleichbare Transfektionseffizienz wie PEI in HEK293 &amp; L929</li> <li>• Quartäre Aminfunktion: aufgrund hoher DNA Bindeeffizienz fehlende Freisetzung zur Transfektion</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nur 1/10 der Transfektionseffizienz von PEI in HepG2 Zellen</li> <li>• Schleimhautpenetrierende Wirkung an Caco-2 Zellen</li> </ul>
<b>In vivo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kopplung von Dextran (1.500- und 10.000 g/mol) und IPEI (2.000 – 5.000 g/mol) zeigte mit IPEI (22.000 g/mol) vergleichbare Transfektionseffizienz in BALB/c Mäusen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transfektion eines p53-Tumorsuppressorgens im MCF 7 Tumormodel in Mäusen vergleichbar mit Lipofectamin® 2000</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transfektion eines p53-Tumorsuppressorgens im MCF 7 Tumormodel in Mäusen vergleichbar mit Lipofectamin® 2000</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erfolgreiche Transfektion von pGFP über 7 Tage in BALB/c Mäusen</li> </ul>
<b>Quellen</b>	[67, 111-122]	[107-110]	[104-106]	[100-103]

Tabelle 4: Oligoamindextrane zum Einsatz als Vektor zum Gentransfer (wenn nicht anders angegeben ist PEI = 25.000 g/mol bPEI).

	DEAE-Dextran	Dextran-Spermin	Azetal-modifiziertes-Dextran	Dextran-Agmatin
<b>Ziel</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Kationisierung von Dextran mit 2-(Diethylamino)ethyl(DEAE)-gruppen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Konjugation von Dextran mit natürlichem Polyamin als kationisierbare Gruppe</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Targeting von Entzündungen und Tumorgewebe durch kontrollierte Freisetzung im sauren Medium</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Einsatz des, für Guanidin-funktionen bekannten, membranpenetrierenden Potentials</li> </ul>
<b>Kopplungsstrategie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Kopplung im basischen mittels 2-(Chloroethyl)diethylammoniumchlorid</li> <li>•Ausbildung von tertiären 2-DEAE- und quartären 2-[2-(DEAE)-DEAE]gruppen.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Reduktive Aminierung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Saurer Katalyse von 2-Methoxypropen an Hydroxylgruppen des Dextrans</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Konjugation an Dextran nach Tosylierung der Hydroxylgruppen</li> </ul>
<b>Toxizität</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Mit steigender Konzentration und Kontaktzeit steigende Toxizität</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Untoxisch an NIH3T3-Zellen</li> <li>•Mit zusätzlicher hydrophober Modifikation mit Ölsäure wie PEI</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Biokompatibilität war gleich der von Polylactid-co-Glycolid (PLGA)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Keinerlei Toxizität an COS-7-Zellen und Blutzellen</li> </ul>
<b>In vitro</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Steigende Transfektionseffizienz mit steigendem Anteil kationischer Ladungen</li> <li>○ steigender molarer Masse des Dextran (bis 2.000 g/mol)</li> <li>○ steigender Polymerkonzentration (bis 3 mg · ml<sup>-1</sup>)</li> <li>•Optimierung von Transfektionsprotokollen mit DMSO als Permeabilisierungsmittel &amp; Chloroquin als lysosomotrope Substanz</li> <li>•Primäre Zellen (adhärente humane Makrophagen) &amp; spezielle Sequenzen (7SL RNA &amp; Alu-Sequenz) können transfiziert werden</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Dextran (6.000 – 8.000 g/mol) zeigte vergleichbare Transfektionseffizienz, wie Transfast™ &amp; Calciumphosphat in HEK293 &amp; NIH3T3-Zellen</li> <li>•Hydrophobe Modifikation zeigte Schutz vor FCS &amp; Transfektionseffizienz wie PEI in HEK293-, NIH3T3- &amp; HeLa-Zellen</li> <li>•Hydrophile Modifikationen mit PEG transfizierte primäre dendritische Zellen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Stabilität bei pH-Wert 7,4 (72 h) und bei pH-Wert 5,0 (24 h)</li> <li>•Hydrolyserate stieg mit steigendem Anteil azyklischer Azetale</li> <li>•Mit 10 % Poly-β-Aminoestern lag Transfektionseffizienz 15- bzw. 24-fach höher als Lipofectamin® 2000 in RAW264.7- bzw. HeLa-Zellen</li> <li>•Knockdowneffizienz von siRNA mit über Azetal gekoppelten Spermin im Vergleich zu unbehandelten HeLa-luc-Zellen bei 60 %</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Transfektionseffizienz in COS-7-Zellen ist, nach zusätzlicher Kopplung von Laurinsäure, mit PEI und Exgen® 500 vergleichbar</li> </ul>
<b>In vivo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Stabile Transfektion des humanen Wachstumshormons (hGH) in Meerschweinchen über 14 Tage</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Hydrophobe Modifikation zeigte an Zebrafischen und Mäusen über 14 Tage Transfektionseffizienz wie DOTAP</li> <li>•Hydrophile Modifikationen zeigte Lebertargeting</li> </ul>		
<b>Quellen</b>	[58, 73, 145-153]	[113, 132-144]	[125-131]	[123, 124]

Betrachtet man die Funktion der Modifikationen sollten unter anderen speziellen Freisetzungsmechanismen erreicht werden. So wurde z. B. die über 20-jährige Erfahrung im Einsatz von Hydrogelen aus Dextran zum Wirkstofftransport verwendet [154, 155], um nach Kopplung von Hydroxymethacrylat an Dextran und anschließender Hydrogelbildung erfolgreich eine gut definierte Bioabbaubarkeit und damit Freisetzung von Nukleinsäuren zu erreichen [81, 154, 156]. Dieses System eignet sich hervorragend zur zeitgesteuerten Freisetzung über bis zu 5 Tage und kann durch Anpassung der Herstellungsmethode (inverse Emulsionspolymerisation) der Gele sehr hohe Nukleinsäuremengen beladen [108]. Allerdings führte die Interaktion mit Blutzellen zum Verlust der beladenen Nukleinsäure und zur Reduktion der Toxizität war eine zusätzliche Modifikation mit Polyethylenglycol (PEGylierung) notwendig.

Das Targeting azider Milieus im Körper, wie sie z. B. in Endosomen, bei Entzündungen oder in Tumorgewebe vorkommen [157, 158], war durch die pH-abhängige Hydrolyserate von Azetal-modifiziertem Dextran möglich [125, 126]. Dabei ließ sich die Halbwertszeit der Hydrolyse mit steigendem Anteil azyklischer Azetale erhöhen [126]. Für eine erfolgreiche Komplexbildung war allerdings die Konjugation kationischer Gruppen nötig. Aus diesem Grund wurden die Azetal-modifizierten Dextrane zusätzlich mit Spermin oder Poly- $\beta$ -aminoestern untersucht, welche für die kationische Ladung am Dextran und die damit einhergehende elektrostatische Interaktion mit DNA sorgten [127-130].

Die beschriebenen Kationisierungen mit Oligoaminen oder Copolymeren (Tabelle 3 und Tabelle 4) zeigten, dass es für die physikochemischen und biologischen Eigenschaften des Polymers und damit seiner Eignung zum Gentransfer eine Abhängigkeit von Art, Anzahl und Dichte der kationischen Ladungen, Flexibilität der Struktur sowie molarer Masse und dreidimensionale Struktur gab [32, 159]. So fiel bei den bisher untersuchten Möglichkeiten der Kationisierung von Dextran auf, dass eine gesteigerte kationische Ladung meist mit einer gesteigerten Toxizität einherging, was das bereits erwähnte „Ladungsdilemma“ widerspiegelte (Kapitel 1.2) [32].

Dies kann vor allem bei DEAE-Dextran beobachtet werden. Dieser lang etablierte Vektor wurde zwar durch den Einsatz von verschiedenen Protokollen weiter optimiert - so z. B. durch Zusatz von DMSO als Permeabilisierungsgagens oder Chloroquin als lysosomotrope Substanz [145, 149]. Dadurch war auch die Transfektion spezieller DNA-Sequenzen, wie 300 bp lange Alu-Sequenz oder 7SL RNA, welche die Zellproliferation von humanen Zervixkarzinomepithelzellen (HeLa-Zellen) beeinflussen [150] und auch die Transfektion von primären Zellen, wie adhärennten humanen Makrophagen, möglich [151] – allerdings tritt bei der Transfektion mit steigender Konzentration an DEAE-Dextran und steigender Kontaktzeit zu den zu transfizierenden Zellen

eine erhöhte Toxizität auf [149, 152]. Auch andere synthetische Konjugate an Dextran, wie z. B. DMAEMA oder Methacrylate zeigten die Notwendigkeit der PEGylierung oder des Einbaus von Disulfidbrücken zur Reduzierung der Toxizität [106, 110]. Die Kopplung an Dextran wurde gezielt zur Reduktion der Toxizität des Goldstandards des polymeren Gentransfers, PEI, angewandt [160]. Die Eigenschaften dieser PEI-Dextran-Derivate zeigten sich stark von molarer Masse der beiden Polymere und der Kopplungsstrategie abhängig. Vor allem die Konjugation von PEI mit niedriger molarer Masse (<5.000 g/mol) an Dextran hoher molarer Masse (>15.000 g/mol) führte zu einer Reduktion der Toxizität [111] bei gleichbleibender Transfektionseffizienz *in vitro* [116] und *in vivo* [160]. Das Einbringen anionischer Ladungen durch Kopplung des PEIs über eine Carboxylfunktion an Dextran konnte zusätzlich zu einer gesteigerten Transfektionseffizienz führen [116]. Somit war Dextran als Grundgerüst nicht nur in der Lage die Transfektionseffizienz zu verbessern, sondern auch die Biokompatibilität der mit ihm konjugierten Strukturen zu erhöhen.

Vergleicht man die weiteren Modifikationen des Dextrans, stellt man fest, dass endogen vorkommende Substanzen, wie Peptide [102], Spermin [139] oder das decarboxylierte Derivat von Arginin, Agmatin [124], im Vergleich zu den synthetischen Konjugaten eine hohe Biokompatibilität aufweisen. Jedoch haben diese ebenfalls Nachteile, wie z. B. starke Interaktion mit Plasmabestandteilen bei Spermin [137, 138] oder eine im Vergleich zu 25.000 g/mol bPEI niedrige Transfektionseffizienz für Peptide [113] und Agmatin [124], was weitere Modifikation nötig machte. Dies kann wiederum zu einer gesteigerten Toxizität führen, wie z. B. die hydrophobe Modifikation von Dextran-Spermin mit Ölsäure. Der Komplex dieser hydrophoben Spermin-Dextrane mit DNA zeigte eine mit 25.000 g/mol verzweigtem PEI (bPEI) vergleichbare Transfektionseffizienz *in vitro* und wies auch *in vivo* eine Transfektion auf. Allerdings war die Toxizität ebenfalls mit der von 25.000 g/mol bPEI vergleichbar [138, 139].

Sucht man nach weiteren Möglichkeiten der Modifikation mit endogenen Substanzen so zeigt die Literatur, dass die an Dextran gekoppelten Peptide die Eigenschaften ihrer Aminosäuren zur Verbesserung der Transfektionseffizienz nutzen [100-103]. Dieses Prinzip findet ebenfalls Anwendung in CPPs, wo Aminosäuren durch ihren Einsatz umfangreich erforscht wurden [6, 62]. Erste Ansätze zum Einsatz von Aminosäuren an Dextran finden sich in der Modifikation von Dextran mit Agmatin, dem decarboxylierten Derivat der Aminosäure Arginin. Die Kationisierung von Dextran mit Agmatin führte zu einem an Blutzellen und Fibroblasten untoxischen Vektor, der nach zusätzlicher Modifikation mit Laurinsäure *in vitro* eine vergleichbare Transfektionseffizienz, wie 25.000 g/mol bPEI aufwies [124]. Dieser Ansatz war vielversprechend, allerdings stehen weitere Publikationen wie beispielsweise zur Transfektionseffizienz *in vivo* aus. Beschreibungen



des Einsatzes von Aminosäuren zum Gentransfer finden sich außerdem zur Modifikation lipophiler Substanzen [161-163]. Dabei wurden einfache Aminosäuren, wie Glycin, Alanin, Histidin und Lysin, an lipophile Substanzen, wie  $\alpha$ -Tocopherol, Fettsäuren oder Cholesterol erfolgreich als Vektor zum Gentransfer eingesetzt. Die lipophilen Substanzen mit Aminosäuren als kationische Kopfgruppe bildeten Liposomen und banden Nukleinsäure erfolgreich [161-163]. Einzelne Träger, wie Lysin gekoppelt an  $\alpha$ -Tocopherol, waren in der Lage auf dem Niveau von Lipofectamin® 2000 zu transfizieren [161]. Als Poly-L-Lysin ist Lysin außerdem bereits ein lang bekannter und etablierter Vektor zum Gentransfer [164, 165]. Aminosäuren schienen aufgrund ihrer Aminfunktionen als Kopplungspartner zur Kationisierung eines Grundgerüsts und damit dem Einsatz als Vektor zum Gentransfer geeignet zu sein. Sie bringen zusätzlich den Vorteil einer, über Veresterung an Hydroxylgruppen, koppelbaren Carboxylfunktion mit. Ihre systematische Untersuchung konjugiert an ein Polymergrundgerüst für den Einsatz als Vektor steht allerdings noch aus.

## 2 Zielstellung der Arbeit

Die Genterapie als innovativer therapeutischer Ansatz ist seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung. Aufgrund dieser Forschungsanstrengungen befinden sich mittlerweile erste virale Vektoren auf dem Markt und auch nicht-virale Vektoren werden bereits in klinischen Studien untersucht. Nichtsdestotrotz sind die Nachteile synthetischer Vektoren, insbesondere die niedrige Biokompatibilität, noch nicht vollends überwunden.

Ziel dieser Arbeit sollte daher die Entwicklung maßgeschneiderter natürlicher Polymere als nicht-virale Vektoren für die Anwendung zum Gentransfer sein. Dafür wurden in ersten Versuchen die Glukose-basierten Polymere Zellulose und Dextran auf ihre Eignung untersucht. Die biologischen und physikochemischen Eigenschaften beider Polymere sollten nach Kationisierung mit Methylaminobutytrat, erstmals verglichen werden. Dabei waren für die Anwendung als Vektor zum Gentransfer, neben der Fähigkeit der Kondensation und Komplexierung von DNA, auch der hydrodynamische Durchmesser und das Zetapotential der Komplexe sowie der Schutz der DNA im Komplex vor DNase von Bedeutung. Zusätzlich sollte die Toxizität der Polymere sowie die Transfektionseffizienz der Komplexe mit Plasmid-DNA untersucht werden.

Zur weiteren Optimierung der Vektoren sollte nach Wahl des Dextrans als passendes Grundgerüst die Untersuchung von Substanzen mit kationisierbarer Funktion zur Konjugation an

Dextran erfolgen. Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse bei der Anwendung natürlicher Substanzen, wie Spermin oder Oligopeptiden, sollten in unserer Studie verschiedene Aminosäuren auf ihre Eignung untersucht werden. Aufgrund ihrer kationisierbaren Aminfunktion(en) und der einfachen Möglichkeit der Kopplung der Carboxylfunktion an die Hydroxylgruppen des Glukose-basierten Grundgerüsts zeigten sie die Voraussetzungen für den Einsatz als protonierbare funktionelle Gruppe. Aus der Literatur sind die vorteilhaften Eigenschaften von Glycin,  $\beta$ -Alanin und Lysin zur Kationisierung lipophiler Substanzen zum Einsatz als Vektor zum Gentransfer beschrieben. Ein Vergleich dieser Aminosäuren an einem Polymergrundgerüst steht bisher aus. Aus diesem Grund wurden Glycin,  $\beta$ -Alanin und Lysin mit verschiedenen Substitutionsgraden an Dextran konjugiert und auf ihre Eignung als Vektor zum Gentransfer untersucht. Dafür wurden ihre biologischen und physikochemischen Eigenschaften in Abhängigkeit von Substitutionsgrad, Art der Aminosäure und Polymerkonzentration untersucht.

Zell-penetrierende Peptide bestehen aus mehreren Aminosäuren die anhand ihrer vorteilhaften Eigenschaften gewählt, verknüpft und als Vektor zum Gentransfer eingesetzt werden. Aus den Untersuchungen auf Eignung als Vektor zum Gentransfer von Glycin,  $\beta$ -Alanin und Lysin konjugiert an Dextran ließen sich ebenfalls verschiedene vorteilhafte Eigenschaften für die Aminosäuren ableiten. Zur weiteren Verbesserung der entwickelten Vektoren zum Gentransfer sollte eine Kombination der Aminosäuren an Dextran konjugiert und analysiert werden. Dafür wurden  $\beta$ -Alanin und Lysin mit verschiedenen Substitutionsgraden an ein Dextran Grundgerüst gekoppelt. Der Einfluss der Polymerkonzentration und des Substitutionsgrades der jeweiligen Aminosäure am Dextran auf die biologischen und physikochemischen Eigenschaften wurde untersucht. Der Schwerpunkt dieser Untersuchung lag auf der Möglichkeit einer Optimierung der Substitutionsgrade der jeweiligen Aminosäuren. Damit können die positiven Eigenschaften der jeweiligen Substituenten gezielt zur Herstellung maßgeschneiderter Vektoren zum Gentransfer eingesetzt werden.

Letztlich ist für eine Anwendung am Patienten eine stabile, einfach zu lagernde und anzuwendende Formulierung nötig. Aus der Literatur ist bekannt, dass es für die Stabilisierung der Komplexe aus Nukleinsäuren und verschiedenen Trägern keine eine Lösung für alle Formulierungen gibt. Da die Stabilität der Formulierungen sowie ihre einfache Anwendbarkeit nach der Lagerung für eine Anwendung *in vitro* und *in vivo* wichtig sind, wurden die entwickelten Vektoren im Komplex mit Plasmid-DNA mit verschiedenen Methoden stabilisiert und unter verschiedenen Bedingungen gelagert. Nach Rekonstitution sollte die Stabilität durch Untersuchung der physikochemischen Eigenschaften sowie die Transfektionseffizienz der

rekonstituierten Komplexe getestet werden. Damit wäre eine lagerbare gebrauchsfertige Formulierung für die DNA auf Basis eines natürlichen Polymers entwickelt.

### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Polymere

Die Polymere wurden von der Arbeitsgruppe Professor Dr. Thomas Heinze am Institut für Organische und Makromolekulare Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena hergestellt. Die Struktur wurde chemisch mit Hilfe von Größenausschlusschromatografie, Asymmetrischer Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung,  $^{13}\text{C}$ -Kernspinresonanzspektroskopie, Infrarotspektroskopie und Elementaranalyse charakterisiert. Methylaminobutyrat (mab) wurde über eine Esterbindung an 75.000 g/mol Zellulose [166, 167] (CEL) bzw. 75.000 g/mol Dextran [168] (DEX) gekoppelt. Es erfolgte die Synthese einer Reihe von Derivaten mit verschiedenen Substitutionsgraden (Tabelle 5).

*Tabelle 5: Substitutionsgrad (DS) und Stickstoffgehalt [%] der mit Methylaminobutyrat (mab) substituierten Dextrane (DEX) und Cellulosen (CEL). (Daten zur Verfügung gestellt von Dr. Cintia S. P. Zarth, AG Prof. Heinze, Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie, Friedrich-Schiller-Universität, Jena) „x.xx“ in der Nomenklatur steht für den Substitutionsgrad (DS).*

Nomenklatur	Grundgerüst	DS	Stickstoffgehalt [%]
DEXmab-0.30	Dextran	0,30	2,08
DEXmab-0.39	Dextran	0,39	2,55
DEXmab-0.52	Dextran	0,52	3,14
CELMab-0.31	Zellulose	0,31	2,13
CELMab-0.62	Zellulose	0,62	3,38
CELMab-0.74	Zellulose	0,74	3,58

Zusätzlich wurde 60.000 g/mol Dextran mit den Aminosäuren Glycin (gly),  $\beta$ -Alanin (ala) und Lysin (lys) substituiert (Tabelle 6). Die Kopplung der mit tert-Butyloxycarbonyl geschützten Aminosäure erfolgte via Esterbindung über die Carboxylfunktion der Aminosäuren an die Hydroxylfunktion der Anhydroglukoseeinheiten des Dextrans. Anschließend wurde die Aminosäure entschützt [169].

Tabelle 6: Substitutionsgrad (DS) und Stickstoffgehalt [%] des mit verschiedenen Aminosäuren modifizierten 60.000 g/mol Dextrans (DEX). (Daten zur Verfügung gestellt von Konrad Hotzel, AG Prof. Heinze, Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie, Friedrich-Schiller-Universität, Jena) „x.xx“ in der Nomenklatur steht für den Substitutionsgrad.

Nomenklatur	DS Glycin (gly)	DS $\beta$ -Alanin (ala)	DS Lysin (lys)	Stickstoffgehalt [%]
DEXgly-0.29	0,29			2,16
DEXgly-0.39	0,39			2,78
DEXgly-0.53	0,53			3,52
DEXgly-0.57	0,57			3,60
DEXgly-0.62	0,62			4,02
DEXgly-0.83	0,83			4,65
DEXgly-0.88	0,88			4,86
DEXgly-1.09	1,09			5,53
DEXala-0.07		0,07		0,61
DEXala-0.21		0,21		1,58
DEXala-0.69		0,69		3,92
DEXala-1.16		1,16		5,31
DEXala-1.50		1,50		6,09
DEXala-1.68		1,68		6,40
DEXlys-0.33			0,33	3,79
DEXlys-0.61			0,61	5,61
DEXlys-0.68			0,68	6,00
DEXlys-0.77			0,77	6,51
DEXala-0.42 lys-0.21		0,42	0,21	4,57
DEXala-0.68 lys-0.19		0,68	0,19	5,17
DEXala-0.99 lys-0.16		0,99	0,16	5,82
DEXala-0.43 lys-0.39		0,43	0,39	5,65
DEXala-0.37 lys-0.53		0,37	0,53	6,17

### 3.2 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen mit Hilfe einer Laminar Air Flow Werkbank (Hera Safe HS 18, Thermo Scientific, Waltham, USA). Für die Bestimmung der In-vitro-Toxizität wurden L929 murine Fibroblasten (ACC-2, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Deutschland) und für die Untersuchung der Transfektionseffizienz chinesische Hamsterovarienzellen (CHO-K1-Zellen, ACC-110, DSMZ) verwendet. Die Kultivierung der L929 murinen Fibroblasten erfolgte in Roswell Park Memorial Institute Zellkulturmedium (RPMI 1640, PAA, Pasching, Österreich), welches mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % L-Glutamin (beides PAA) substituiert wurde. CHO-K1-Zellen wurden in Ham's F12 Medium (PAA) ebenfalls substituiert mit 10 % FCS und 1 % L-Glutamin kultiviert. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank (Binder CO<sub>2</sub> Incubator CB 150, Binder, Tuttlingen, Deutschland) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95 % relativer Luftfeuchte. Die Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) mit 15 ml

Medium inkubiert und nach Erreichen von 80 % Konfluenz passagiert. Zum Passagieren wurden die Zellen zweimal mit sterilem  $1,5 \times 10^{-3}$  M Phosphatpuffer (pH 7,4) (PBS) gewaschen. Die Herstellung des PBS erfolgte durch Auffüllen von 1,46 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat, 8 g Natriumchlorid, 0,2 g Kaliumchlorid (alle Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) mit deionisiertem Wasser (Q-Pod™ MilliQ, Millipore™, Billerica, USA) auf 1000,0 ml und Einstellen des pH-Wertes auf 7,4. Anschließend wurde die Lösung bei 121 °C für 15 Minuten bei 2 bar (Varioklav 65T, Thermo Scientific) autoklaviert und daraufhin das verdunstete Lösungsmittel ergänzt. Zu den L929 murinen Fibroblasten wurden 1,8 ml einer 0,25 % Trypsinlösung in PBS und zu den CHO-K1-Zellen 1,8 ml einer 0,25 % Trypsinlösung in 0,05 mM Ethylendiamintetraacetatlösung (EDTA) (beides PAA) gegeben und für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert, um sie vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen. Die abgelösten Zellen wurden in 6,8 ml Medium aufgenommen und für 5 Minuten bei 200 x g abzentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland), um das Trypsin zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt (Vacusafe comfort, IBS, Fernwald, Deutschland) und das Zellpellet mit 5 ml Medium resuspendiert. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Neubauer-improved-Zählkammer (Karl Hecht, Sondheim vor der Rhön, Deutschland) gezählt. Drei Tage vor Verwendung der Zellen in den entsprechenden Versuchen wurden 1,5 Millionen Zellen in eine neue T75 Zellkulturflasche ausgesät.

### 3.3 Plasmid-DNA

Ein Luciferase Reporter Gen (pGL3 Control vector, Promega, Madison, USA) wurde als DNA verwendet. Dabei handelte es sich um eine zirkuläre Plasmid-DNA (pDNA) mit 5256 Basenpaaren (bp), die für das Enzym Luciferase unter Kontrolle eines SV40 Promotors, kodiert. Das Einbringen und die Vermehrung der Plasmid-DNA erfolgte in kompetenten *Escherichia coli* TG1 (*E. coli* TG1, ATCC-11775, Hans-Knöll-Institut, Jena, Deutschland). Dazu wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut, 1 µg Plasmid-DNA zugegeben und vorsichtig auf- und abpipettiert. Die Mischung wurde für 60 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock durch Aufheizen auf 42 °C für 30 Sekunden im Wasserbad (Memmert WB 7, Memmert, Schwabach, Deutschland). Im Folgenden wurden 800 µl Lysogeny Broth-Medium ((LB-Medium, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) 6,25 g LB-Medium gelöst in 250,0 ml deionisiertem Wassers) zu den Zellen gegeben und bei 37 °C für eine Stunde bei 450 Umdrehungen pro Minute (rpm) auf einem Orbitalschüttler (Titramax 100, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) im Trockenschrank inkubiert. Eine 1:10, 1:20 und 1:50 Verdünnung der Bakteriensuspension wurde hergestellt und je 200 µl auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Zum Gießen der Platten wurden 6,25 g LB-Medium und 3,75 g Agar-Agar

(bakteriologisch, Carl Roth) in eine Borosilikatflasche (FisherBrand, Schwerte, Deutschland) eingewogen, mit deionisiertem Wasser auf 250 ml aufgefüllt und die Lösung bei 121 °C und 2 bar für 15 Minuten (Varioklav 65T, Thermo Scientific) autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 25 °C erfolgte die Zugabe von Ampicillin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml und das Ausgießen in, bei 160 °C für 2 Stunden hitzesterilisierte (Trockenschrank Function line, Heraeus instruments, Hanau, Deutschland), Glaspetrischalen (90 x 19 mm). Die Kultivierung der Zellen erfolgte über Nacht bei 37 °C im Trockenschrank (Binder FD 115, Binder). Anschließend konnten einzelne Kulturen gepickt und in ein mit 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin gefülltes Reagenzglas überführt werden. Das Reagenzglas wurde mit einer Aluminiumkappe verschlossen und für weitere 24 Stunden bei 450 rpm und 37 °C im Trockenschrank inkubiert. Aliquote von je 800 µl der Bakteriensuspension wurden in Cryogefäße (Greiner Bio-One) überführt, mit 200 µl 85 % Glycerol (Carl Roth) gemischt und bei -80 °C gelagert. Die Isolation des Plasmids erfolgte durch Inkubation eines 1 ml Aliquotes aus dem Cryogefäß in 200 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (Sigma-Aldrich) über Nacht bei 80 rpm und 37 °C im Brutschrank (InforsHT, Infors AG, Bottmingen, Schweiz). Die Extraktion des Plasmids wurde entsprechend der Herstelleranweisung und unter Verwendung der Chemikalien und Materialien des Plasmid Maxi Kits (Plasmid Maxi Kit E.Z.N.A.<sup>®</sup>, OMEGA bio-tek, Norcross, USA) durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mittels alkalischer Lyse zerstört und die Plasmide über eine Anionenaustauschersäule extrahiert. Dazu erfolgte die Aliquotierung der Kultur in 50 ml Falcons (Greiner Bio-One) und die anschließende Zentrifugation bei 4000 x g für 10 Minuten. Dadurch wurden die Zellen vom Medium getrennt. Nach Resuspension des Pellets in 12 ml Puffer 1 (RNase-haltige wässrige Lösung mit Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)/Salzsäure) erfolgte die Lyse der Zellen in 12 ml Puffer 2 (wässrige Lösung mit Natriumhydroxid (NaOH) und Natriumdodecylsulfat). Anschließend wurde der Zelldebris mit 16 ml Puffer 3 (Guanidiniumchlorid- und essigsäurehaltige Lösung) gefällt und konnte durch Zentrifugation bei 15.000 x g für 10 Minuten (Avanti 30, Beckmann Coulter, Brea, USA) abgetrennt werden. Der Überstand wurde steril auf die Anionenaustauschersäule aufgebracht, die vorher mit 3 M NaOH-Lösung äquilibriert wurde. Anschließend wurde das Plasmid durch Zentrifugation bei 4000 x g für 5 Minuten abgetrennt.

Es folgten mehrere Waschschrte, einmal mit 10 ml HB-Puffer (high salt concentration buffer) und zweimal mit je 15 ml Waschpuffer, um die Proteine von der Säule zu lösen. Im Anschluss erfolgte nach dem Trocknen der Säule das Ablösen der Plasmid-DNA mit 1,5 ml Elutionspuffer (wässrige Lösung mit Tris(hydroxymethyl)aminomethan/Salzsäure). Die Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) mittels UV-

Absorptionsmessung (Biophotometer, Eppendorf) einer 1:50 Verdünnung in Elutionspuffer bei 260 und 280 nm bestimmt und entsprechend Formel 1 berechnet.

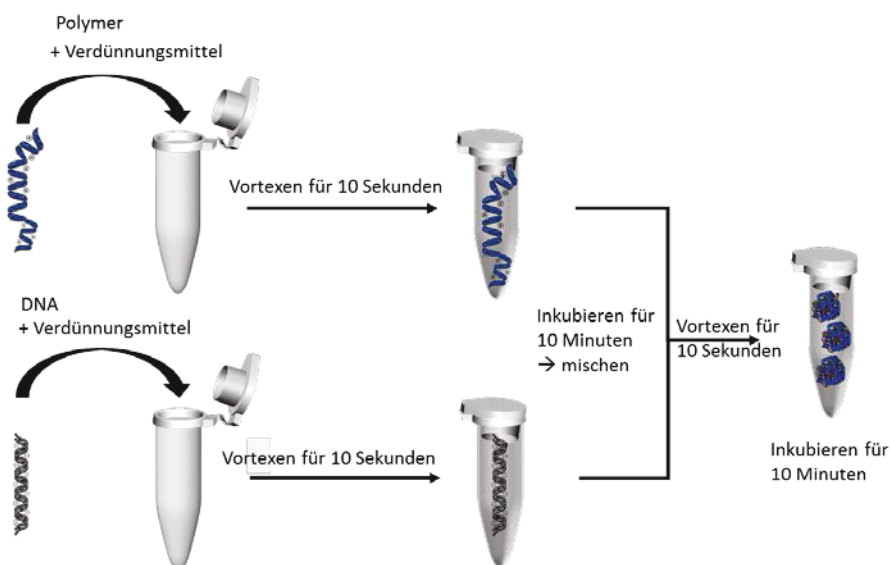
$$c \left[ \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] = \text{OD}_{260\text{nm}} \times 50 \times 50$$

*Formel 1: Berechnung der Plasmidkonzentration.*

Die Konzentration  $c$  in mg/ml errechnet sich aus der optischen Dichte bei 260 nm ( $\text{OD}_{260\text{nm}}$ ), multipliziert mit der Verdünnung (50) und einem Korrekturfaktor für Doppelstrang-DNA (50). Für die Reinheitsbestimmung der DNA erfolgte die Berechnung eines Verhältnisses von  $\text{OD}_{260\text{nm}}$  zu  $\text{OD}_{280\text{nm}}$ , da die  $\text{OD}_{280\text{nm}}$  Proteinverunreinigungen erfasst. Das Verhältnis sollte für Doppelstrang-DNA (dsDNA) zwischen 1,8 und 1,9 liegen.

### 3.4 Herstellung von Komplexen aus DNA und Polymeren

Vor der Herstellung der Komplexe wurde die für das N/P-Verhältnis nötige Polymermenge berechnet. Das N/P-Verhältnis errechnete sich aus dem Stickstoffgehalt der Polymere (N) im Verhältnis zum Phosphatgehalt der DNA (P). Die Herstellung der Polymerstammlösungen erfolgte durch Lösen des Polymers (5 mg/ml) in deionisiertem Wasser. Die Herstellung der Komplexe erfolgte nach einer Methode von Fischer et al. [170].



*Abbildung 4: Schematische Darstellung der Komplexherstellung.*

Ein Volumen entsprechend 2  $\mu\text{g}$  DNA und die entsprechende Menge Polymerstammlösung für das benötigte N/P-Verhältnis wurden in separaten 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf) auf je 50  $\mu\text{l}$  mit 150 mM NaCl-Lösung (Roth, 0,9 g auf 100,0 ml deionisiertes Wasser), eingestellt auf pH 7,4, aufgefüllt. Anschließend erfolgte das Vortexen für zehn Sekunden mittels Vortexer (Vortex Genie 2 Model G560E, Scientific Industries, New York, USA) und eine zehnmütige Inkubation

bei 25 °C. Im Anschluss wurde die Polymerlösung zur DNA-Lösung pipettiert und erneut zehn Sekunden gevortext. Nach einer weiteren 10 minütigen Inkubation bei 25 °C wurde der Komplex für weitere Untersuchungen verwendet. Eine schematische Darstellung der Herstellung von Komplexen zeigt Abbildung 4.

### 3.5 Untersuchung der Toxizität der Polymere

#### 3.5.1 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assay

Die Untersuchung der Toxizität der Polymere *in vitro* wurde mittels modifiziertem 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assay durchgeführt [171, 172]. Die, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, vorbereiteten L929 murinen Fibroblasten wurden passagiert und 200 µl Zellsuspension, entsprechend 8.500 Zellen/Well, in eine 96-Well-Platte (Greiner Bio-One) ausgesät. Die Durchführung der Arbeiten fand unter sterilen Bedingungen statt und die Inkubation erfolgte, wie unter 3.2 beschrieben, bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. Nach 24 Stunden Inkubation wurde das Medium entfernt und 100 µl einer 3,9; 7,8; 15,6; 31,3; 62,5; 125; 250 und 500 µg/ml Polymerlösung in Medium (n = 7) zugegeben. Die Bestimmung der Eigenabsorption des Mediums (Blank) erfolgte mit 200 µl zellfreiem Medium (n = 4). Die Behandlung der Zellen der Positivkontrollen erfolgte mit Hilfe einer 0,02 % Thiomersallösung (Caelo, Hilden, Germany) in Medium (n = 4). Die Zellen der Negativkontrollen wurden mit Medium behandelt (n = 7). Nach 24 Stunden Inkubation wurde das Medium entfernt und 200 µl MTT-Lösung (0,5 mg/ml in Medium, Sigma-Aldrich)/Well zugegeben. Nach weiteren 4 Stunden Inkubation wurde das MTT-haltige Medium abgesaugt und die Zellen mit 200 µl DMSO (Sigma-Aldrich)/Well lysiert. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption in der 96-Well-Platte mittels eines Plattenlesegeräts (Fluostar OPTIMA, BMG Labtech, Ortenberg, Germany) bei 25 °C und bei einer Wellenlänge von 570 nm. Die Messwerte (n = 3) wurden in Prozent der Negativkontrolle nach Abzug der Eigenabsorption (Blank) berechnet (Formel 2). Der Versuch wurde einmal wiederholt, der Mittelwert berechnet und Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt.

$$\text{Zellviabilität [\%]} = \frac{\text{Absorption}_{\text{Probe}} - \text{Absorption}_{\text{Blank}}}{\text{Absorption}_{\text{Negativkontrolle}} - \text{Absorption}_{\text{Blank}}} \times 100 \%$$

Formel 2: Berechnung der Zellviabilität.

Nach DIN EN ISO 10993-5 [173] wurden Polymere, welche eine Zellviabilität <70 % verursachten, als toxisch eingestuft.



### 3.5.2 Hämolyse

Die Lyse roter Blutzellen (Erythrozyten) wurde mittels absorptionsbasiertem Assay getestet. Die Durchführung des Assays erfolgte analog zur Beschreibung von Bauer et al. [171]. Dazu wurden die Polymere in PBS in Konzentrationen von 0,24 – 500 µg/ml gelöst. Heparinisiertes Schafsblut wurde vom Institut für Versuchstierkunde in Jena zur Verfügung gestellt. Die Aufreinigung des Blutes erfolgte durch dreimaliges Zentrifugieren bei 2880 x g für sieben Minuten in der Eppendorf Centrifuge 5804 R mit anschließendem Resuspendieren des Zellpellets auf das Ausgangsvolumen mit PBS. Eine 1:400 Verdünnung der Erythrozytensuspension in PBS wurde mittels Neubauer-improved-Zählkammer gezählt. Die roten Blutzellen wurden auf eine Konzentration von 1,8 Milliarden Zellen/µl eingestellt. Zu 200 µl der Polymerlösung wurden je 200 µl Erythrozytensuspension in 96-Well-Deepwellplatten (Masterblock 96-Well, Greiner Bio-One) pipettiert. Die Positivkontrolle bestand aus 200 µl 1 % Triton-X 100 Lösung (Ferak, Berlin, Deutschland) in deionisiertem Wasser mit 200 µl Zellsuspension (n = 3). Als Negativkontrolle wurden 200 µl PBS mit 200 µl Zellsuspension (n = 12) und zur Messung der Eigenabsorption (Blank) 400 µl PBS verwendet (n = 8).

$$\text{Hämolyse [\%]} = \frac{(\text{Absorption}_{\text{Probe}} - \text{Absorption}_{\text{Blank}}) - (\text{Absorption}_{\text{Negativkontrolle}} - \text{Absorption}_{\text{Blank}})}{\text{Absorption}_{\text{Positivkontrolle}} - \text{Absorption}_{\text{Blank}}} \times 100 \%$$

Formel 3: Berechnung der Hämolyse.

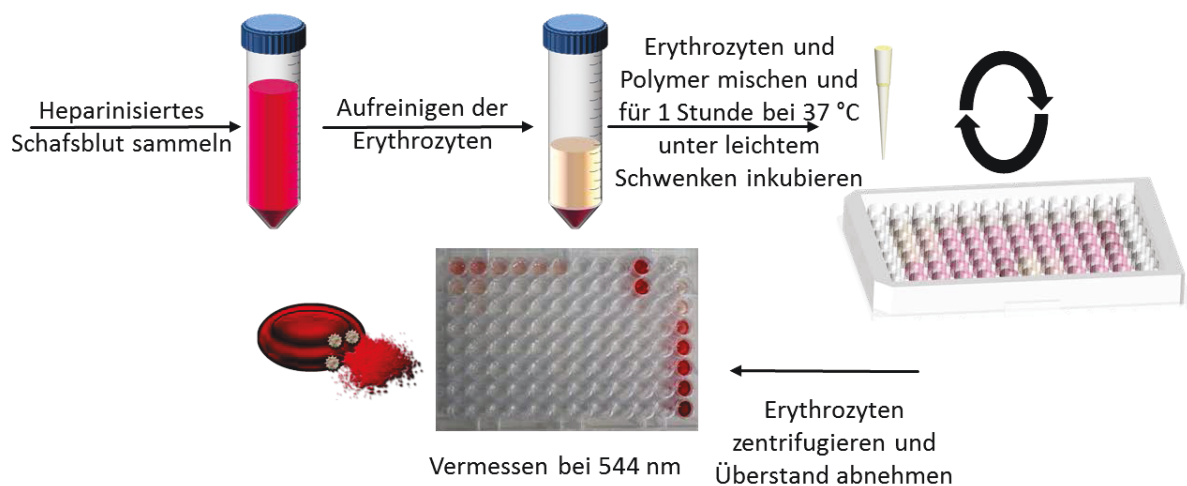


Abbildung 5: Versuchsschema Hämolyse.

Jedes Polymer wurde in Konzentrationen von 0,24; 0,49; 0,97; 1,95; 3,9; 7,8; 15,6; 31,3; 62,5; 125; 250 und 500 µg/ml (n = 3) zu den Zellen pipettiert. Anschließend erfolgte die Inkubation im Trockenschrank bei 37 °C für eine Stunde bei 450 rpm auf einem Orbitalschüttler. Nach der Inkubationszeit wurden die Deepwellplatten bei 2250 x g und 25 °C für 5 Minuten in der Eppendorf Centrifuge 5804 R zentrifugiert und 100 µl des Überstands in eine klare 96-Well-Platte

überführt. Anschließend wurde die Absorption bei 544 nm mittels Plattenlesegerät gemessen ( $n = 3$ ) (Abbildung 5). Die Berechnung der Hämolyse erfolgte in Prozent der Positivkontrolle nach Abzug des Blankwertes und der Negativkontrolle (Formel 3). Der Versuch wurde einmal wiederholt und Mittelwert +/- Standardabweichung aller errechneten Werte dargestellt. Nach ASTM F756-08 wurde Hämolyse  $<2\%$  als nicht hämolytisch, zwischen  $2 - 5\%$  als leicht hämolytisch und  $>5\%$  als stark hämolytisch eingestuft [174].

### 3.5.3 Aggregation roter Blutzellen

Die Untersuchung zur Aggregation der Erythrozyten erfolgte mittels absorptionsbasiertem Assay analog zu Bauer et al. [171] und Ogris et al. [28] unter Berücksichtigung der DIN EN ISO 10993-4 [175]. Die Vorbereitung der Erythrozyten aus heparinisiertem Schafsblut erfolgte analog zu Kapitel 3.5.2. Es wurde eine Erythrozytensuspension mit 20 Millionen Zellen pro ml hergestellt. Die Konzentration der Polymere betrug  $0,024 - 50 \mu\text{g/ml}$  in PBS. Zu  $100 \mu\text{l}$  der Polymerlösung wurden je  $100 \mu\text{l}$  Erythrozytensuspension in klare 96-Well-Platten gegeben. Als Positivkontrolle wurde  $100 \mu\text{l}$  einer  $30 \mu\text{g/ml}$  Lösung von  $25.000 \text{ g/mol}$  verzweigtem Polyethylenimin (bPEI, Sigma-Aldrich) mit  $100 \mu\text{l}$  Erythrozytensuspension ( $n = 3$ ) verwendet. Zur Messung der Eigenabsorption wurden  $200 \mu\text{l}$  PBS als Blank verwendet ( $n = 8$ ) und als Negativkontrolle  $100 \mu\text{l}$  PBS mit  $100 \mu\text{l}$  Erythrozytensuspension ( $n = 12$ ). Jedes Polymer wurde in Konzentrationen von  $0,024; 0,049; 0,097; 0,02; 0,039; 0,78; 1,56; 3,13; 6,25; 12,5; 25,0$  und  $50,0 \mu\text{g/ml}$  aufgetragen ( $n = 3$ ).

$$\Delta\text{Abs}_{\text{max}} = \text{Absorption}_{\text{Negativkontrolle}} - \text{Absorption}_{\text{Probe}}$$

Formel 4: Berechnung der Änderung der Absorption durch Aggregation der Erythrozyten ( $\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$ )

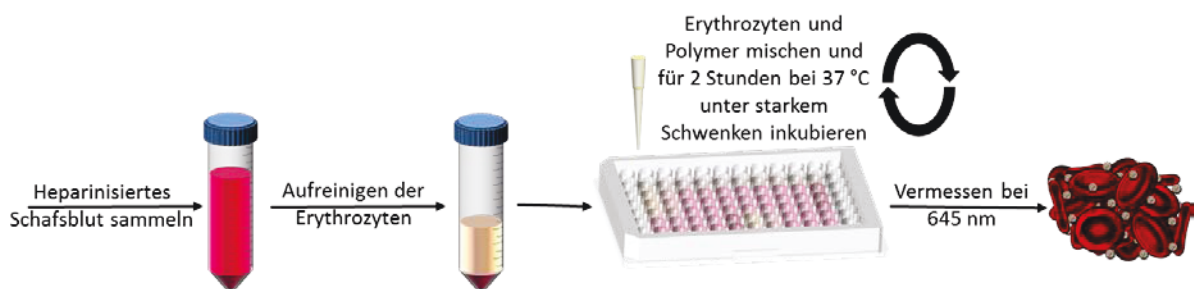


Abbildung 6: Versuchsschema Erythrozytenaggregation.

Im Anschluss wurden die Platten für 2 Stunden bei 1350 rpm auf einem Orbitalschüttler im Trockenschrank bei  $37\text{ °C}$  inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Absorption bei  $645 \text{ nm}$  mittels Plattenlesegerät (Fluostar OPTIMA, BMG Labtech) vermessen (Abbildung 6), der Versuch wurde einmal wiederholt, der Mittelwert der Einzelmessungen berechnet und gegen die Konzentration aufgetragen. Zusätzlich wurde eine makroskopische Begutachtung der

Aggregation unter dem Mikroskop (Primo Vert, CarlZeiss, Göttingen, Deutschland) mit Kamera (AxiCamErc5s, CarlZeiss) durchgeführt. Dabei wurde die Aggregation nach visueller Begutachtung in 3 Stadien eingeteilt (Stadium 1 = keine Aggregation, alle Erythrozyten liegen frei im Medium vor; Stadium 2 = leichte Aggregation, Bildung von „münzrollenartigen“ Strukturen, aber ein Großteil der Erythrozyten liegt frei im Medium vor; Stadium 3 = starke Aggregation, ein Großteil der Erythrozyten liegt als Cluster aggregiert vor) [171]. Außerdem wurde zur Ermittlung des Ausmaßes der Aggregation die Änderung der Absorption durch Abzug von der Absorption der Negativkontrolle ( $\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$ ) nach Formel 4 berechnet. Der Mittelwert der errechneten Werte wurde gebildet und mit Standardabweichung gegen die Konzentration aufgetragen.

### 3.6 Physikochemische Untersuchungen der Komplexe

#### 3.6.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Bindeeffizienz und die Stabilität der untersuchten Komplexe gegen DNasen konnte mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht werden [116]. Dafür wurden 40 ml eines 1% Agarosegels (peqGold Universal Agarose, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) in Trisacetat-EDTA-Laufpuffer (TAE Laufpuffer) hergestellt. Für den Laufpuffer wurde 0,48 g TRIS (Carl Roth GmbH + Co. KG), 1 ml Eisessig (99 % (V/V), Merck) und 0,036 g Natrium-EDTA x 2H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich) auf 100,0 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt und der pH-Wert auf 8 eingestellt. Nach Erwärmen des Gels in der Mikrowelle (M618, Samsung, Daegu, Korea) wurden 5 µl 1 % (V/V) Ethidiumbromidlösung (Carl Roth GmbH + Co. KG) in deionisiertem Wasser zugegeben und das Gel in die Kammer (Compact M, Whatman, Biometra, Göttingen, Deutschland) gegossen. Nach dem Gelieren wurden 200 ml TAE-Laufpuffer in die Kammer gefüllt. Zur Prüfung der Bindeeffizienz für DNA wurden Komplexe aus 2 µg Heringssperma-DNA (Typ XIV, Sigma-Aldrich) mit N/P 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 10; 20 und 40, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, hergestellt und mittels Trennung im Gel auf ihre Bindeeffizienz für DNA geprüft. Unkomplexierte DNA und freies Polymer wurden als Kontrolle verwendet. Bromphenolblau wurde zur Kontrolle der Lauffront eingesetzt. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit TAE-Ladepuffer (1 Teil Ladepuffer auf 10 Teile Probe) versetzt, um ein Absinken in die Geltaschen zu fördern. Zur Herstellung des Ladepuffers wurden 48,5 mg TRIS (Carl Roth GmbH + Co. KG), 5 ml Glycerol (85 %, Carl Roth GmbH + Co. KG) und 100 µl 3 % EDTA auf 10,0 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt und auf pH 7,4 eingestellt. Die Trennung im Gel erfolgte für 1 Stunde bei 80 V (PowerPAC 1000, BIO-RAD, Hercules, USA). Die Auswertung erfolgte auf dem Gel-Imager (Intas GmbH, Göttingen, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 254 nm, wo die Gele fotografiert wurden (Digimax A55W, Samsung, Schwalbach, Deutschland).

Zur Prüfung der Komplexe auf Schutz der DNA vor DNasen wurden Komplexe mit N/P 10, 20 und 40, wie im Kapitel 3.4 beschrieben, mit 2 µg pGL3 hergestellt. Nach Herstellung wurden 1,5 Kunitz-Einheiten DNase I (2,5 Kunitz-Einheiten/µl, Amersham Biosciences, Amersham, UK) /µg DNA zugegeben und für 45 Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Hitzeinaktivierung der Enzyme für 35 Minuten bei 70 °C im Wasserbad. Zum Freisetzen der DNA aus dem Komplex wurden 40 µl einer 10 mg/ml Dextransulfatlösung (500.000 g/mol, Sigma-Aldrich) mit der Komplexlösung gemischt und für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert, gefolgt vom Einfrieren der Komplexe für 4 Stunden bei -20 °C. Als Kontrollen wurden DNA ohne Polymer mit DNase behandelt, DNA ohne DNase verwendet und unbehandelte DNA direkt auf das Gel aufgetragen, um unspezifische Zersetzungen während des Versuches auszuschließen. Nach dem Auftauen wurden die Proben, wie oben beschrieben, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

### 3.6.2 *AccuBlue™-Assay*

Die Quantifizierung unkondensierter DNA erfolgte fluoreszenzspektroskopisch mittels AccuBlue™-Assay (AccuBlue™ High sensitivity dsDNA Quantitation Kit with 8 DNA Standards, Biotium, Hayward, USA). Zur Durchführung des AccuBlue™-Assays wurden die Komplexe mit 2 µg Heringssperma-DNA und N/P 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 10; 20 und 40, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, hergestellt und ein Volumen der Komplexlösung entsprechend von 100 ng DNA in eine schwarze 96-Well-Platte (Fluotrac 200, Greiner Bio-One) pipettiert (n = 3). Zur Kontrolle der unspezifischen Interaktionen zwischen Polymer und Fluoreszenzfarbstoff wurde freies Polymer ohne DNA (n = 3) verwendet, 150 mM NaCl-Lösung pH 7,4 wurde als Blank und DNA ohne Polymer wurde als Positivkontrolle eingesetzt (je n = 3). Anschließend erfolgte die Zugabe einer 1:100 Mischung der Enhancer- und Quantifyer-Lösung aus dem Kit, 5 Minuten Inkubation unter Lichtausschluss auf dem Orbitalschüttler bei 450 rpm und Dreifachmessung der Fluoreszenz bei 485 nm Anregungswellenlänge und 530 nm Emissionswellenlänge im Plattenlesegerät. Der Versuch wurde einmal wiederholt und die Berechnung der Ergebnisse erfolgte in Prozent der Positivkontrolle (unkomplexierte DNA) nach Abzug des Blankwertes (150 mM NaCl-Lösung). Die Darstellung erfolgte als Mittelwert der unkondensierte DNA [%] +/- Standardabweichung.

### 3.6.3 *Messung von hydrodynamischen Durchmesser und Zetapotential der Komplexe*

Der Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Herrenberg, Germany) wurde zum Messen des hydrodynamischen Durchmessers mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) und des Zetapotentials (ZP) mittels Laser-Doppler-Anemometrie (LDA) verwendet. Dafür wurden Komplexe mit N/P 10, 20 und 40 mit 2 µg pGL3 in deionisiertem Wasser hergestellt (Kapitel 3.4). Einhundert µl Komplexlösung wurden in eine Minimalvolumenküvette (Einmalküvette PS micro,

BRAND, Wertheim, Deutschland) überführt und mit einem Laser mit 633 nm Wellenlänge, bei einem Streuwinkel von  $173^\circ$  und einer Temperatur von  $25^\circ\text{C}$  nach 120 Sekunden Äquilibrierungszeit vermessen. Die Messung dauerte 240 Sekunden und wurde sechs Mal wiederholt. Die Messung der elektrophoretischen Mobilität erfolgte in einer Zetasizer Küvette (DTS1060, Malvern Instruments) dreimal nach 60 Sekunden Äquilibrierungszeit auf  $25^\circ\text{C}$ . Die Anzahl der Messungen wurde vom Gerät automatisch eingestellt. Sollte die Signalstärke nicht ausreichen, wurde die Messung in einer High concentration zeta cell (ZEN1010, Malvern Instruments) wiederholt. Die Versuche wurden einmal wiederholt und die Auswertung des hydrodynamischen Durchmessers, PDIs und Zetapotentials erfolgte durch Berechnung des Mittelwerts und der Standardabweichung der Messung mittels Zetasizer Software 7.11.

### 3.7 Untersuchung der Transfektionseffizienz der Komplexe

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden CHO-K1-Zellen verwendet. Vierundzwanzig Stunden vor dem Versuch wurden die Zellen passagiert und 50.000 Zellen/Well in 12-Well-Platten (Greiner Bio-One) ausgesät. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank, wie in Kapitel 3.2 beschrieben. Die Herstellung der Komplexe erfolgte wie in Kapitel 3.4 beschrieben. Die Komplexe wurden mit  $2\ \mu\text{g}$  pGL3 mit N/P 10, 20 und 40 ( $n = 2$ ) hergestellt. Als Positivkontrolle wurden  $2.500\ \text{g/mol}$  lineares Polyethylenimin (IPEI, Polysciences, Warrington, USA) mit N/P 20 ( $n = 2$ ); und als Negativkontrolle  $150\ \text{mM}$  Kochsalzlösung pH 7,4 ( $n = 2$ ) und freie DNA ( $n = 2$ ) verwendet. Direkt vor der Aufgabe der Komplexe auf die Zellen wurde das Medium gewechselt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Bei der Untersuchung der Lysin-Dextranester wurde nach Aufgabe der Komplexe zusätzlich ein Experiment durchgeführt, bei dem Chloroquin (Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von  $100\ \mu\text{M}$  zugegeben wurde [149]. Die Zellen wurden 4 Stunden mit den Komplexen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und das Medium gewechselt. Nach weiteren 44 Stunden Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit je  $120\ \mu\text{l}$  Zellkulturlysereagenz (CCLR Cell Culture Lysis Reagent, Promega, Madison, USA) lysiert. Danach wurde der Zelldebris bei  $12.450\ \text{x g}$  für 7 Minuten (MiniSpin, Eppendorf) zentrifugiert. Zweimal  $20\ \mu\text{l}$  Überstand pro Probe wurde in eine weiße 96-Well Lumineszenzplatte (LIA-Platte, Greiner Bio-One) und zweimal  $25\ \mu\text{l}$  in eine klare 96-Well-Platte (Greiner Bio-One) überführt (Abbildung 7).

Zur Bestimmung der Luciferaseaktivität wurden je  $2 \times 20\ \mu\text{l}$  Überstand in einer 96-Well Lumineszenzplatte (LIA-Platte, Greiner Bio-One) verwendet und je  $100\ \mu\text{l}$  Luciferase-Reagenz (Luciferase assay system, Promega) pro Well zugegeben. Die Messung erfolgte durch Zugabe des Luciferase-Reagenz mit Hilfe der Pumpen des Plattenlesegeräts mit  $110\ \mu\text{l/Sekunde}$  in jeweils 1 Well der Platte und Auslesen der Lumineszenz nach 2 Sekunden für 10 Sekunden im

Plattenlesegerät. Der Mittelwert und die Standardabweichung der Lumineszenz/Well wurden berechnet.

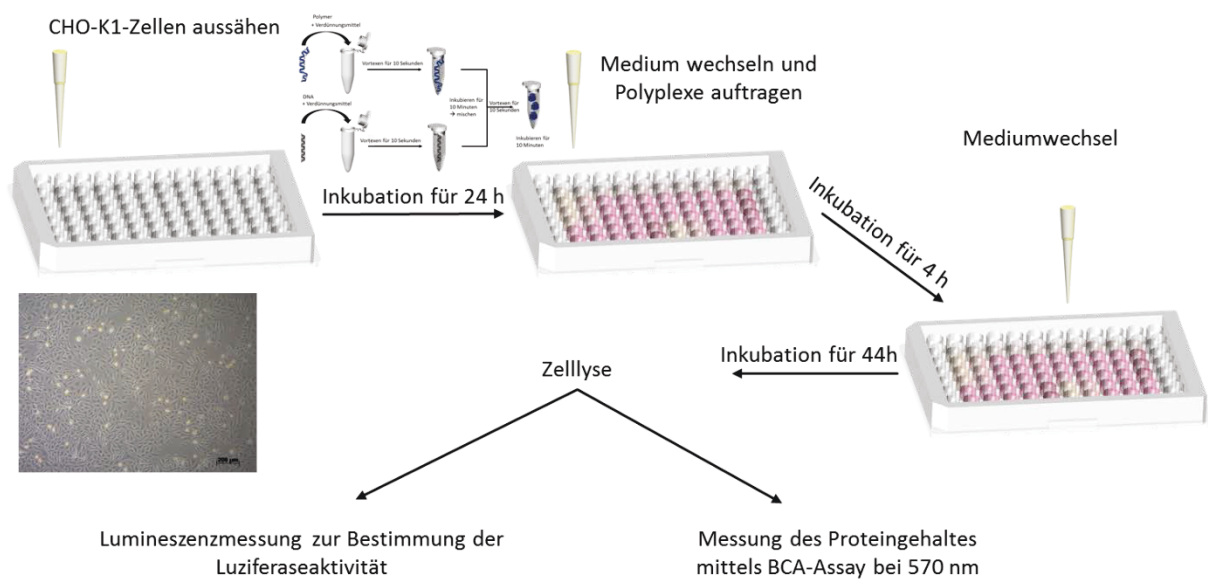


Abbildung 7: Versuchsschema Transfektionseffizienz.

Zur Bestimmung des Proteingehalts der Zellen wurde das Bicinchoninsäureassay-Kit (Pierce® BCA assay kit, Thermo Scientific) verwendet. Die Proben wurden vor Anwendung des Assays für 20 Minuten bei 37 °C im Trockenschrank mit 10 µl einer 0,05 M Iodacetamidlösung (Applchem, Darmstadt, Deutschland) behandelt, um das im Zellkulturlysereagenz vorhandene Dithiothreitol, das mit dem Assay interagieren würde, zu deaktivieren. Zur genauen quantitativen Bestimmung des Proteingehaltes wurde zusätzlich eine Albuminverdünnungsreihe aus dem Kit mit 0,025; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5 und 2 mg/ml BSA in die Wells aufgetragen. Das BCA-Reagenz A und B aus dem Kit wurde im Verhältnis 50:1 gemischt und 200 µl/Well zupipettiert. Nach Schütteln bei 450 rpm auf dem Orbitalschüttler für 30 Sekunden erfolgte eine Inkubation für 40 Minuten bei 37 °C im Trockenschrank. Nach Abkühlen auf 25 °C wurde die die Absorption bei 570 nm dreifach im Plattenlesegerät vermessen. Mit Hilfe der Albuminverdünnungsreihe wurde eine Kalibriergerade erstellt und jeder Probenwert in die Proteinkonzentration umgerechnet. Im Anschluss wurde der Mittelwert und die Standardabweichung des Proteingehaltes in µg/ml Lösung für jede Probe berechnet.

Die Experimente wurden einmal wiederholt. Der Mittelwert der Lumineszenz wurde ins Verhältnis zum Proteingehalt gesetzt und als Relative Lumineszenz pro µg Protein (RLU/µg Protein) für N/P 10, 20 und 40 jeder Probe aufgetragen.

### 3.8 Lagerstabilität der Komplexe

#### 3.8.1 *Untersuchung des Einflusses verschiedener Lagerbedingungen auf die Komplexe*

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Lagerbedingungen auf die Stabilität der Komplexe wurden diese mit 2 µg pGL3 mit N/P 10, 20 und 40 aus DEXala-1.50 und DEXala-0.99 lys-0.16, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, in deionisiertem Wasser oder 5 % Glukose hergestellt. Nach der Herstellung wurden die Proben entweder bei -20 °C eingefroren oder gefriergetrocknet (Epsilon 2-4 LSC, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode im Harz, Deutschland mit Software Martin Christ LPC-32). Während der Gefriertrocknung wurde erst mit 2 °C/Minute auf -30 °C abgekühlt. Daraufhin wurde ein Vakuum auf 0,01 bar gezogen und bei -20 °C für 10,5 Stunden hauptgetrocknet. Anschließend erfolgte das Aufwärmen auf 20 °C mit 0,5 °C/Minute und eine 11-stündige Nachrocknung. Zusätzlich wurden Komplexe in 5 % Glukose (eingestellt auf pH 7,4) hergestellt. Die Proben wurden entweder 24 Stunden nach dem Einfrieren bzw. unmittelbar nach Abschluss der Gefriertrocknung untersucht oder bei -20 °C, 4 °C und 25 °C gelagert. Die Lagerung erfolgte über eine Woche und einen Monat und drei Monate. Vor den Untersuchungen wurden die eingefrorenen Proben für 10 Minuten auf 25 °C im Wasserbad äquilibriert und die gefriergetrockneten Proben nach Rekonstitution mit 100 µl deionisiertem Wasser 10 Sekunden gevortext und für 10 Minuten bei 25 °C inkubiert. Die Untersuchung erfolgte mittels Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers und des Zetapotentials (Kapitel 3.6.3) sowie der Bestimmung der Transfektionseffizienz (Kapitel 3.7).

#### 3.8.2 *Untersuchung des Einflusses von Gefriertrocknungs- und Rekonstitutionszyklen auf die Komplexe*

Die Komplexe wurden, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, in 5 % Glukose hergestellt, jeweils sieben Mal gefriergetrocknet und rekonstituiert. Die Gefriertrocknung erfolgte, indem die Proben mit 2 °C/Minute auf -30 °C abgekühlt wurden. Daraufhin wurde ein Vakuum auf 0,01 bar gezogen und bei -20 °C für 6,5 Stunden hauptgetrocknet. Anschließend erfolgte das Aufwärmen auf 20 °C mit 0,5 °C/Minute und eine siebenstündige Nachrocknung. Unmittelbar nach der Gefriertrocknung wurden die Proben mit 100 µl deionisiertem Wasser rekonstituiert und für 10 Minuten bei 25 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung vom hydrodynamischen Durchmesser und Zetapotential, wie in Kapitel 3.6.3 beschrieben. Die Messung des hydrodynamischen Durchmessers erfolgte mit 120 Sekunden pro Messzyklus.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Einfluss des Grundgerüsts auf die biologischen und physikochemischen Eigenschaften der Vektoren

Um den Einfluss des Polysaccharidgrundgerüsts auf den Vektor zum Gentransfer zu untersuchen, sollten im Folgenden Zellulose (Abbildung 8A) und Dextran (Abbildung 8B) miteinander verglichen werden. Sowohl Dextran als auch Zellulose sind biokompatibel und bestehen aus verknüpften Anhydroglukoseeinheiten (AGUs). Allerdings unterscheidet sich die Art der Verknüpfung. Während die AGUs bei Zellulose  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-verknüpft sind und im Winkel von 180° zueinander stehen (Abbildung 8A) [176], sind sie bei Dextran hauptsächlich über  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)- und zusätzlich  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-,  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)- und  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glykosidische Bindungen verknüpft (Abbildung 3) [73].

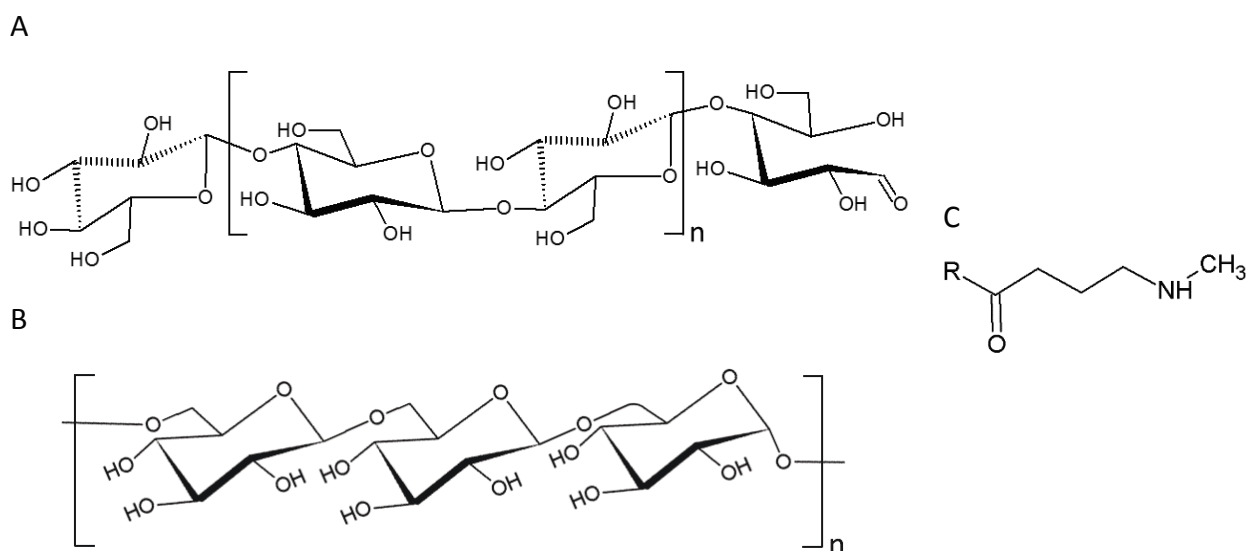


Abbildung 8: Strukturformel von Zellulose (A), der Hauptkette von Dextran (B), Methylaminobutyrat (C)

Die molare Masse beider Polysaccharide war 75.000 g/mol. Zur Modifikation der Polysaccharide wurden sie in *N*-Methyl-2-pyrrolidon/Lithiumchlorid gelöst und die Lösung mit etwas Pyridin versetzt. Die Ringöffnung des *N*-Methyl-2-pyrrolidon zum Methylaminobutyrat erfolgt durch Zugabe von Wasser am Ende der Reaktion [166-168]. Der Substitutionsgrad (DS) nach der beschriebenen Modifikation mit Methylaminobutyrat (Abbildung 8C) betrug für Zellulose 0,39; 0,62 sowie 0,74 und für Dextran 0,31; 0,39 sowie 0,52 (Kapitel 3.1, Tabelle 5).

#### 4.1.1 Untersuchung der Biokompatibilität der Methylaminobutyrat-substituierten Vektoren *in vitro*

Der Einfluss der Polymere auf die Viabilität von Fibroblasten und Erythrozyten wurde untersucht, um die Toxizität der Polymere für eine zukünftige Anwendung *in vitro* und *in vivo* abschätzen zu können. Zur Überprüfung des Worst-Case-Szenarios wurden die Methylaminobutyrat-



substituierten Dextrane und Zellulosen ohne DNA untersucht, da somit die kationische Ladung des Polymers nicht von der DNA gebunden wird sondern auf die Zellen wirkt.

Zur Prüfung der Zellviabilität wurde der von Mosmann entwickelte MTT-Assay an L929 murinen Fibroblasten angewandt [172]. Diese Zellen wurden als eine etablierte Referenzzelllinie, zur Untersuchung von Biomaterialien nach Standards der Internationalen Organisation für Normierung (ISO) sowie der ASTM International (früher American Society for Testing and Materials), gewählt [171]. Die Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Polymers erfolgte nach der Richtlinie über 24 Stunden [80]. Die Bestimmung der Viabilität erfolgte dabei durch anschließende Behandlung der Zellen mit MTT. Metabolisch aktive Zellen reduzieren gelbes MTT zu einem violetten Formazanfarbstoff ((E,Z)-5-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan) [172]. Anschließend konnte die Absorption des violetten Formazanfarbstoffes bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen und die Viabilität im Verhältnis zur Negativkontrolle berechnet werden. Als Negativkontrolle (mit einer Viabilität von 100 %) wurden unbehandelt Zellen verwendet. Das aufgrund seiner Toxizität als Positivkontrolle angewandte Thiomersal [177] führte zu einer Reduktion der Viabilität auf 1,55 +/- 0,94 % (Daten nicht gezeigt).

Die Toxizität der Polymere zeigte eine Abhängigkeit von Art des Grundgerüsts, Substitutionsgrad von Methylaminobutyrat am Grundgerüst und Konzentration des Polymers. Mit steigendem DS und steigender Konzentration stieg die Toxizität der untersuchten Polymere (Abbildung 9). Dies wurde deutlich, wenn man DS und Konzentration der Polymere betrachtet, bei denen der, nach DIN EN ISO 10993-5 [173], festgelegte Grenzwert für die Viabilität von 70 % unterschritten wurde. Dieser lag für DEXmab-0.52 bei  $\geq 7,81 \mu\text{g/ml}$ , für DEXmab-0.39 bei  $\geq 62,5 \mu\text{g/ml}$  und für DEXmab-0.30 bei  $\geq 125 \mu\text{g/ml}$  (Abbildung 9A). Vergleich man DEXmab-0.52 nun mit den höher substituierten Zellulosederivaten, mit einem DS von 0,62 und 0,74, bei denen der Grenzwert erst ab einer Polymerkonzentration von  $\geq 15,6 \mu\text{g/ml}$  unterschritten wurde, war die Toxizität der Zellulosederivate geringer (Abbildung 9B). Allerdings fiel auf, dass bei dem vergleichbaren DS von 0,30 bzw. 0,31 an Dextran bzw. Zellulose der Grenzwert bei Zellulose bereits bei  $\geq 31,3 \mu\text{g/ml}$  unterschritten wurde, während er für Dextran bei  $\geq 125 \mu\text{g/ml}$  lag. Zusätzlich zeigte sich beim Vergleich dieser beiden Derivate bei höheren Konzentrationen von  $500 \mu\text{g/ml}$  eine 1,5-fach höhere Viabilität des Dextranderivates. Auch die Viabilität von der mit DEXmab-0.52 behandelten Zellen war im Vergleich zu den mit CELmab-0.62 bzw. CELmab-0.74 behandelten bei einer Polymerkonzentration von  $500 \mu\text{g/ml}$  um den Faktor 2,1 bzw. 8,5 höher. Zusammenfassend ließ sich also feststellen, dass die modifizierten Dextrane nach DIN EN ISO 10993-5 eine höhere Toxizität zeigten, da der definierte Grenzwert bei DS  $\geq 0,52$  bereits bei

niedrigeren Konzentrationen im Vergleich zu Zellulose unterschritten wurde. Allerdings fiel die Viabilität mit steigender Konzentration für Dextran- weniger stark ab als für Zellulosederivate.

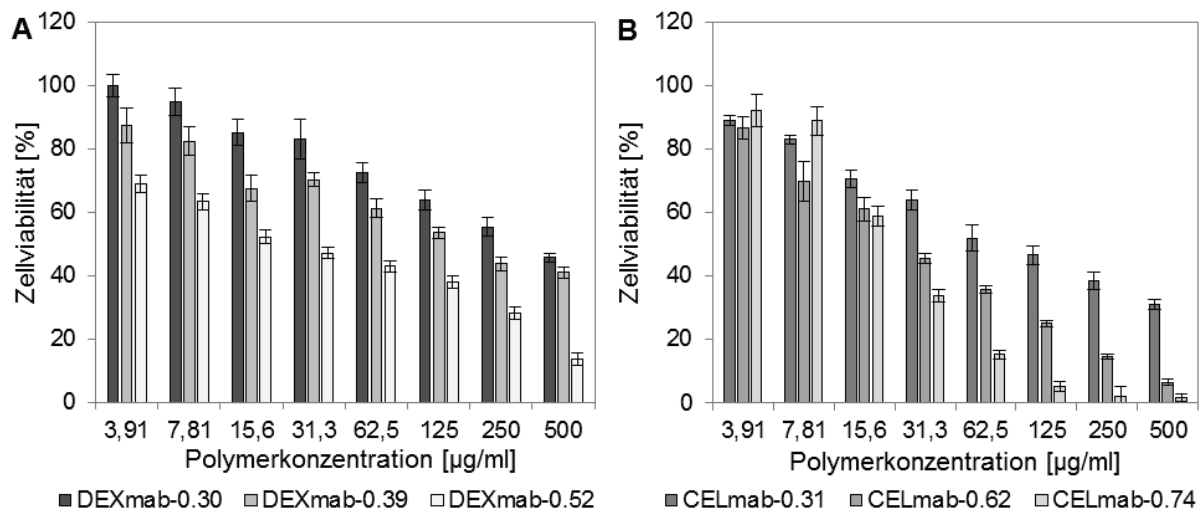


Abbildung 9: Zellviabilität von Methylaminobutyrat-substituierten Dextranen (A) und Zellulosen (B) in Abhängigkeit von Substitutionsgraden und Polymerkonzentrationen untersucht an L929 murinen Fibroblasten mittels MTT-Assay. Zellviabilität berechnet nach 24-stündiger Behandlung mit Polymer in Prozent der mit reinem Medium behandelten Zellen. [Mittelwert +/- Standardabweichung, n = 7, 1 Wiederholung]

Da Blut der erste Kontaktpartner der Polymere nach intravenöser Applikation ist, ist die Wirkung der Polymere auf Erythrozyten wichtig für eine toxikologische Einschätzung, da die roten Blutzellen den größten Anteil der im Blut vorkommenden Zellen ausmachen [28, 171].

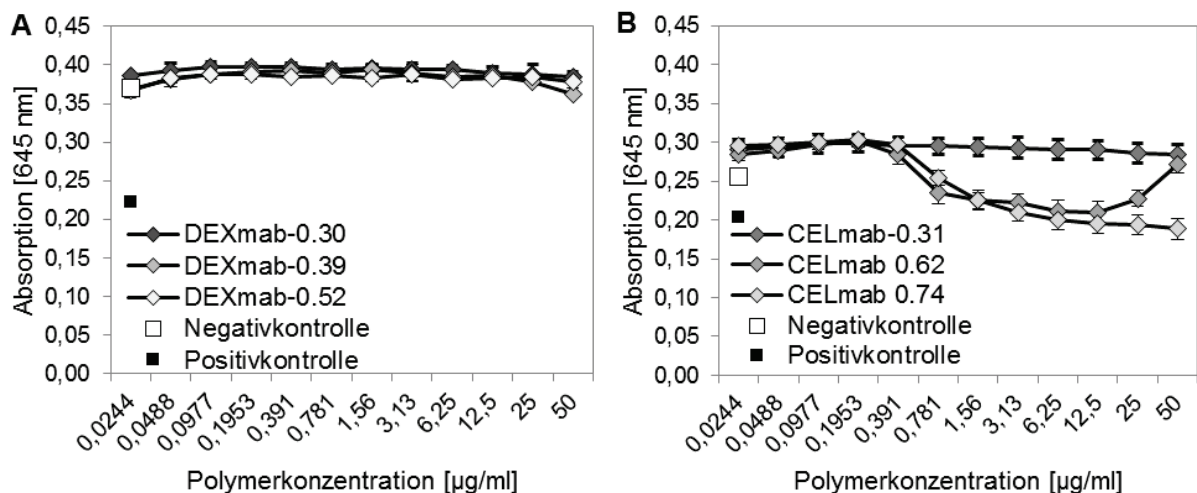


Abbildung 10: Absorption der Erythrozyten nach zweistündiger Behandlung mit Methylaminobutyrat-substituierten Dextranen (A) und Zellulosen (B) mit verschiedenen Substitutionsgraden und Polymerkonzentrationen getestet an Schafserythrozyten. Positivkontrolle = 30µg/ml 25.000 g/mol bPEI, Negativkontrolle = PBS. [Mittelwert +/- Standardabweichung, n = 6, 1 Wiederholung]

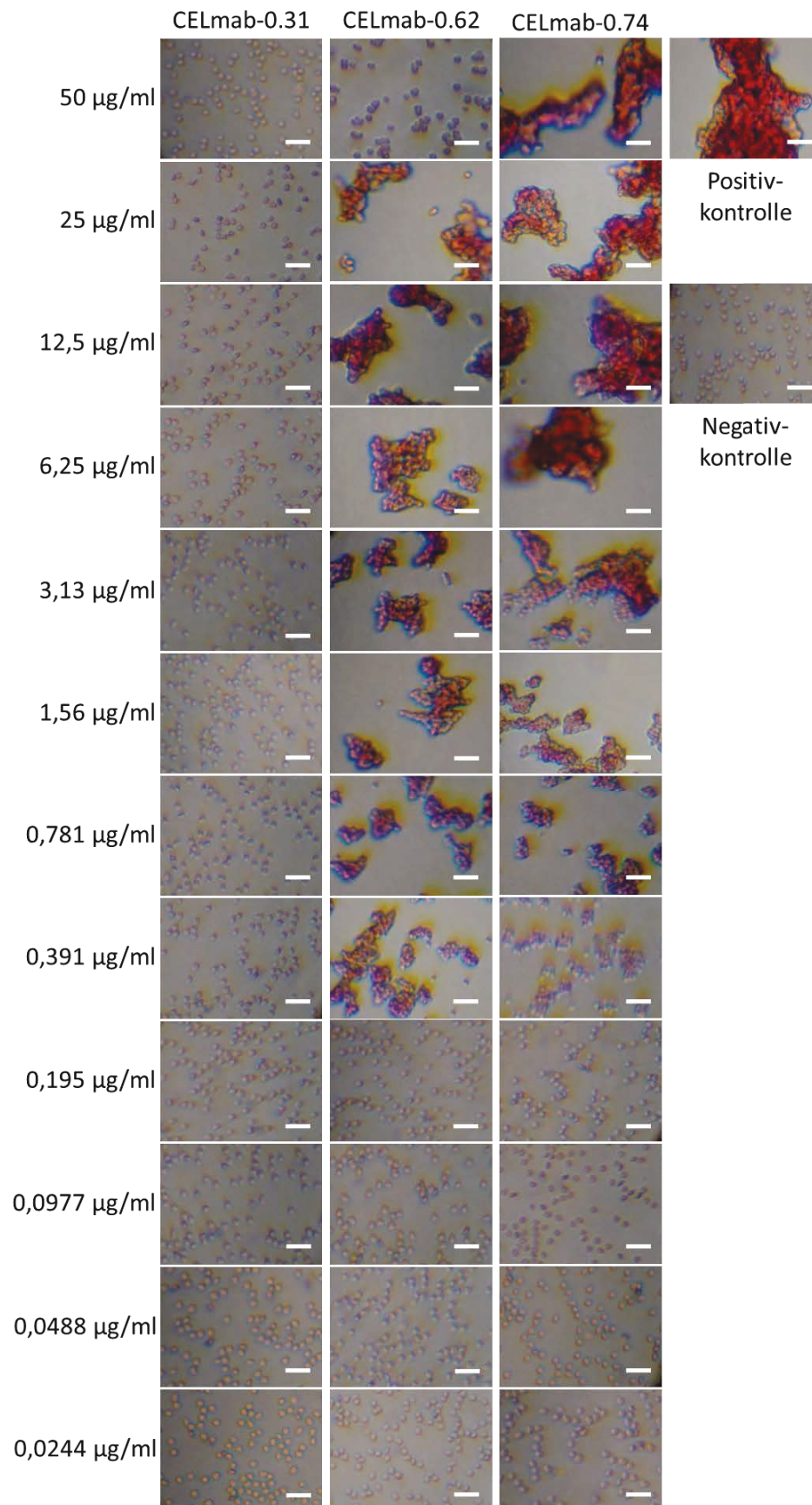


Abbildung 11: Mikroskopische Aufnahmen der Erythrozyten nach zweistündiger Behandlung mit CELMab mit verschiedenen Substitutionsgraden und Polymerkonzentrationen. Negativkontrolle = PBS. Positivkontrolle = 30 µg/ml 25.000 g/mol bPEI. [Balkenlänge = 20 µm]

Ein Aggregat aus Polymer und Erythrozyten kann, je nach Ablagerungsort im Organismus schwerwiegende gesundheitliche Beeinträchtigungen, durch z. B. Schlaganfall, Herzinfarkt oder Lungenembolie, hervorrufen. Zur Untersuchung der Aggregation roter Blutzellen wurde nach Inkubation mit dem Polymer die Absorption bei 645 nm gemessen. Diese Wellenlänge wurde gewählt, um störende Absorption durch Hämoglobin zu vermeiden [171]. Mit steigender Aggregation der Erythrozyten erfolgte eine verringerte Streuung des einfallenden Laserlichts, da freie suspendierte Erythrozyten eine größere Absorptionsfläche haben als sedimentierte Aggregate. Zusätzlich wurde die Aggregation der Erythrozyten makroskopisch beurteilt und in Stadien 1 (keine Aggregation) bis 3 (starke Aggregation) eingeteilt (Abbildung 12B). Als Positivkontrolle wurde 25.000 g/mol bPEI einer Konzentration von 30 µg/ml verwendet, da die kationische Ladung eine starke Aggregation (Stadium 3) der Erythrozyten verursacht [178] (Abbildung 11), was zu einer niedrigen Absorption führte (Abbildung 10).

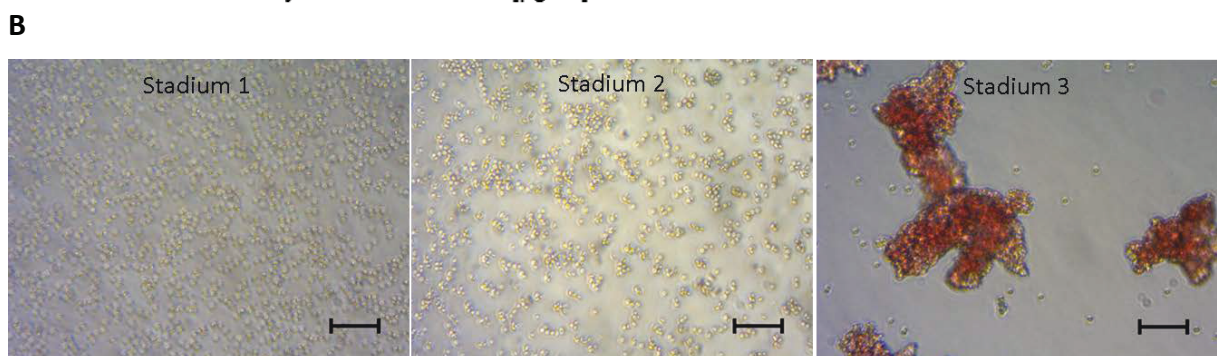
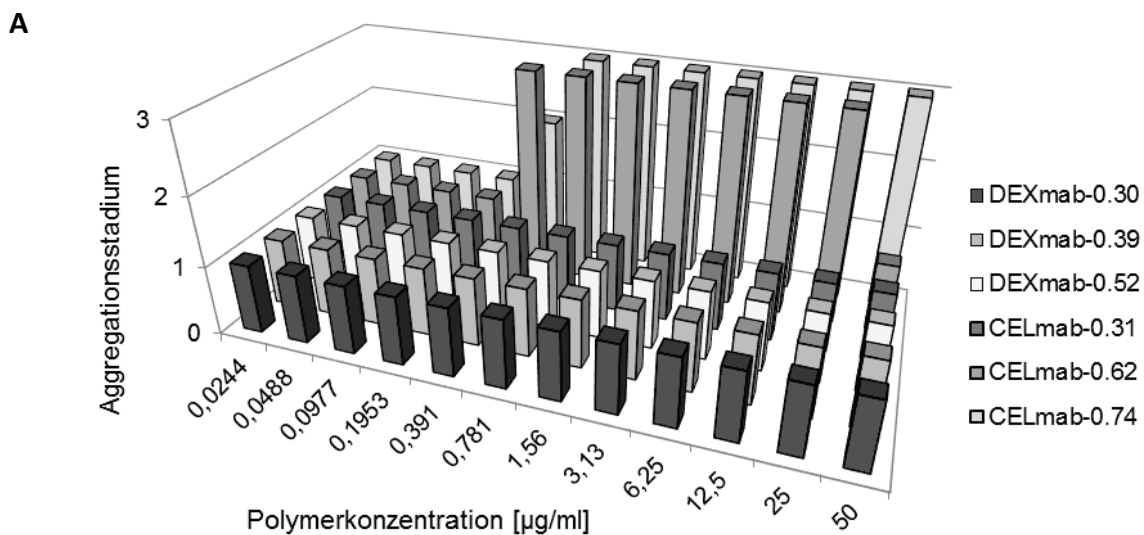


Abbildung 12: (A) Makroskopische Beurteilung der Aggregation roter Blutzellen nach zweistündiger Behandlung mit Methylaminobutyrat-substituierten Dextranen und Zellulosen mit verschiedenen Substitutionsgraden und Polymerkonzentrationen getestet an Schaferythrozyten. Einteilung erfolgte nach Aggregationsstadium dargestellt in (B) Referenzbilder: Stadium 1 = keine Aggregation (Behandlung mit PBS), Stadium 2 = leichte Aggregation (DEXala-0.69 lys-0.19 50 µg/ml, Kapitel 4.3.1), Stadium 3 = starke Aggregation (30 µg/ml 25.000 g/mol bPEI). [Balkenlänge = 100 µm]

Als Negativkontrolle wurde PBS verwendet, welches keine Interaktion mit den Erythrozyten zeigte (Abbildung 10 und Abbildung 11). Im Gegensatz zum Einfluss auf die Zellviabilität verursachten die Methylaminobutyrat-substituierten Dextrane keinerlei Aggregation der Erythrozyten, was sich an Absorptionswerten auf dem Niveau der Negativkontrolle von  $0,3702 \pm 0,0119$  (Abbildung 10A) sowie an fehlender makroskopisch beobachtbarer Aggregation (Abbildung 12, mikroskopische Aufnahmen aufgrund fehlender Aggregation nicht gezeigt) erkennen ließ. Auch Methylaminobutyrat mit einem DS von 0,31 an Zellulose verursachte keinerlei Aggregation der Erythrozyten. Die Absorptionswerte lagen bei der maximal untersuchten Polymerkonzentration von  $50 \mu\text{g/ml}$  mit  $0,2835 \pm 0,0131$  noch oberhalb der Negativkontrolle von  $0,2553 \pm 0,0065$  (Abbildung 10B). Auch makroskopisch ließ sich keine Aggregation erkennen (Abbildung 11), was zur Einteilung in Aggregationsstadium 1 (Abbildung 12) führte. Im Unterschied dazu zeigten sich ab einer Konzentration von  $\geq 0,391 \mu\text{g/ml}$  für CELmab-0.62 starke (Stadium 3) und CELmab-0.74 leichte (Stadium 2) Aggregation (Abbildung 11 und Abbildung 12), was auch an der sinkenden Absorption erkennbar war (Abbildung 10). Ab einer Konzentration von  $\geq 0,781 \mu\text{g/ml}$  wiesen beide Zellulosederivate eine starke Aggregation auf, die sich für CELmab-0.62 bei einer Konzentration von  $50 \mu\text{g/ml}$  sowohl anhand der Absorption als auch der mikroskopischen Aufnahmen nicht mehr beobachten ließ.

Zusammenfassend zeigte sich bei dem Einfluss der untersuchten Polymere auf die Aggregation roter Blutzellen eine Abhängigkeit von Grundgerüst, DS und Polymerkonzentration. Während die substituierten Dextranderivate keinerlei Aggregation verursachten, kam es bei Behandlung der Erythrozyten mit modifizierten Zellulosen ab einem DS  $\geq 0,62$  und Konzentration  $\geq 0,391 \mu\text{g/ml}$  zur Aggregation.

Zusätzlich zur Aggregation sollte der zelllytische Effekt der Polymere auf rote Blutzellen untersucht werden. Nach Behandlung der Erythrozyten mit den Polymeren wurde deren Lyse über das ausgetretene Hämoglobin bestimmt. Die Absorptionsmessung der Hämoglobinmenge erfolgte bei  $544 \text{ nm}$  und wurde ins Verhältnis zur Positivkontrolle gesetzt, um eine prozentuale Freisetzung zu berechnen. Das als Positivkontrolle verwendete Triton-X 100 ist ein nicht-ionisches Tensid, welches aufgrund seiner oberflächenaktiven Eigenschaften eine vollständige Zelllyse verursachte [171]. PBS wurde als Negativkontrolle verwendet und hatte keinerlei messbaren Einfluss auf die Erythrozyten (Daten nicht gezeigt). Die Hämolyse wurde nach ASTM F756-08 bewertet, wobei eine Hämolyse  $< 2 \%$  als nicht hämolytisch, zwischen  $2 - 5 \%$  als leicht hämolytisch und  $> 5 \%$  als stark hämolytisch eingestuft wurde [174]. Trotz der, im Vergleich zum Aggregationsversuch, zehnfach erhöhten Polymerkonzentrationen konnten weder für mit



Methylaminobutyrat substituierte Dextrane noch Zellulosen hämolytische Eigenschaften an den Erythrozyten festgestellt werden. Es zeigten sich hier weder eine Abhängigkeit vom Grundgerüst noch von DS oder Konzentration. Die gemessenen Hämolyse lagen <2 %.

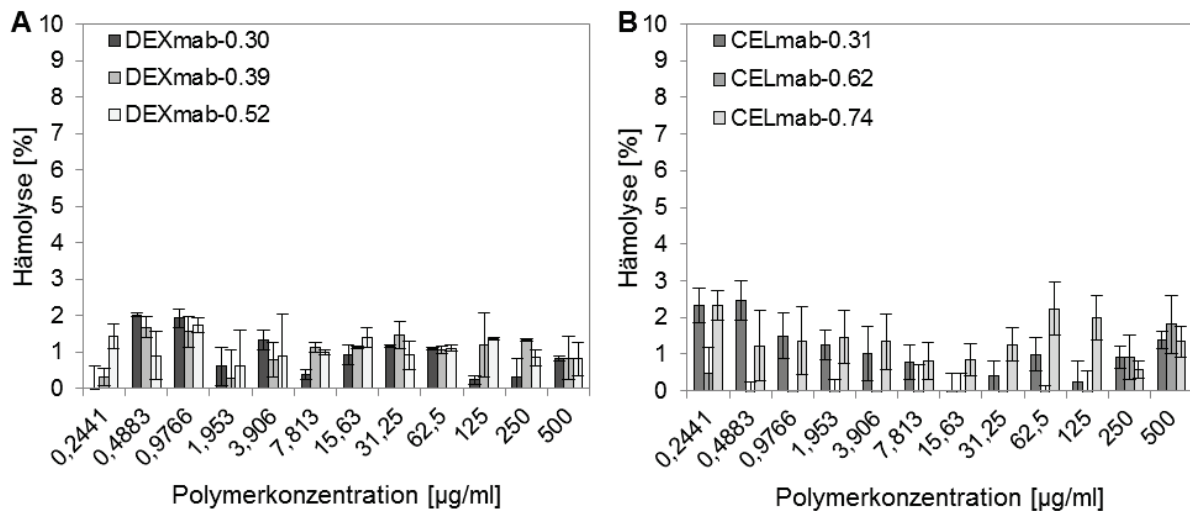


Abbildung 13: Lyse roter Blutzellen nach einstündiger Behandlung mit Polymeren in Prozent der Positivkontrolle. Zellen behandelt mit Methylaminobutyrat-substituierten Dextranen (A) und Zellulosen (B) mit verschiedenen Substitutionsgraden und Polymerkonzentrationen. Positivkontrolle = 1 % Triton-X 100. [Mittelwert +/- Standardabweichung, n = 6, 1 Wiederholung]

Fasst man die Untersuchungen der In-vitro-Biokompatibilität der Methylaminobutyrat-substituierten Dextrane und Zellulosen, bestehend aus Zellviabilitätsuntersuchungen an L929 murinen Fibroblasten sowie Aggregations- und Hämolyseuntersuchungen an Schafserythrozyten, zusammen, so zeigten sich Abhängigkeiten von Grundgerüst, Polymerkonzentration und DS. Während keines der beiden substituierten Polymere eine Lyse der Erythrozyten verursachte, zeigten die derivatisierten Zellulosen mit einem DS  $\geq 0,62$  ab einer Polymerkonzentration  $\geq 0,391 \mu\text{g/ml}$  eine Aggregation roter Blutzellen. Eine konzentrationsabhängige Verringerung der Zellviabilität muriner Fibroblasten konnte für beide Polymere festgestellt werden. Die Zellviabilität sank mit steigendem DS und steigender Polymerkonzentration, wobei Zellulose mit höherem DS von 0,62 und 0,74 geringere Viabilitäten zeigte als Dextran mit DS 0,52.

#### 4.1.2 Untersuchung der mit Methylaminobutyrat substituierten Vektoren auf Komplexierung, Kondensation, Größenreduktion und Schutz der DNA vor DNase

Die Komplexierung und Kondensation von DNA ist eine Grundvoraussetzung für die Eignung eines kationischen Polymers als Vektor und geht aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkung mit einer Reduktion der Größe einher [13, 14, 16]. Die so geformten Nanokomplexe haben einmal die Fähigkeit einer verbesserten Penetration der Zellmembran [15] und schützen, aufgrund der

Änderung der 3D-Struktur der DNA, im Komplex diese vor dem Abbau durch DNasen. Zur Untersuchung der Fähigkeit der Vektoren DNA zu binden, Komplexe in geeigneter Größe zu formen und durch Packung der DNA den Abbau durch DNasen zu verhindern, wurden Komplexe mit einem N/P-Verhältnis von 10 und 20 hergestellt. Dieses N/P-Verhältnis wurde gewählt, da es sich in Voruntersuchungen (Daten nicht gezeigt) für die Transfektion als geeignet zeigte.

Die Untersuchungen der Komplexe aus Polymer und pGL3 auf unkondensierte DNA wurden mittels Gelelektrophorese und AccuBlue™-Assay durchgeführt. Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Untersuchung der Komplexe auf unkondensierte und unkomplexierte DNA, bei dem die DNA abhängig von ihrer Ladung, dreidimensionalen Struktur, Größe und der angelegten elektrischen Spannung wandert. Der AccuBlue™-Assay wurde zur Quantifizierung unkondensierter DNA eingesetzt. Beide Methoden basieren auf Interkalationsfarbstoffen, die sich in unkondensierte DNA einlagern und sich qualitativ makroskopisch (Gel) bzw. quantitativ mittels Fluoreszenzmessung (AccuBlue™-Assay) auswerten lassen. Zur Kontrolle der Lauffront im Gel wurde Bromphenolblau eingesetzt. Dieses wanderte aufgrund seiner geringen Größe und negativen Ladung in die gleiche Richtung wie DNA, allerdings mit der Lauffront. Plasmid-DNA (pGL3) wurde als Negativkontrolle verwendet und zeigte die typischen zwei Banden der supercoiled DNA (untere Bande) und linearen DNA (obere Bande) im Gel (Abbildung 14A). Supercoiled DNA läuft dabei aufgrund ihres geringen Volumens im Gel schneller als die stäbchenförmige lineare DNA, die aufgrund des Netzwerks des Gels sterisch gehindert wird. Im AccuBlue™-Assay wurde die Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle, also eine analog zur Komplexbildung eingesetzte Menge freier DNA, gleich 100 % gesetzt und der Anteil unkondensierter DNA nach Herstellung der Komplexe aus DEXmab bzw. CELmab und pGL3 anhand der Fluoreszenzintensität im Verhältnis berechnet. Reines Polymer wurde zur Untersuchung unspezifischer Interaktionen getestet. Komplexe aus DNA mit 2.500 g/mol IPEI in einem N/P-Verhältnis von 20 wurden als Positivkontrolle verwendet. Wie in Abbildung 14A (Bande „IPEI“) zu sehen ist, band die Positivkontrolle DNA fast vollständig, was an der fehlenden Fluoreszenz im Gel erkennbar war und sich im geringen Signal im AccuBlue™-Assay, berechnet auf 3,9 +/- 0,2 % unkondensierte DNA, darstellte (Abbildung 14B). Als reine Polymere zeigten weder DEXmab-0.52 noch CELmab-0.74 unspezifische Interaktion mit Ethidiumbromid im Gel oder ein Signal im AccuBlue™-Assay (Daten nicht gezeigt). Die fehlende Bewegung der Komplexe aus pGL3 und CELmab bzw. DEXmab aus den Taschen des Gels wies auf eine erfolgreiche Komplexierung des pGL3 hin, da aufgrund der Maskierung der anionischen Ladung durch das kationische Polymer die Plasmid-DNA nicht mehr im Gel wanderte. Außerdem sind die Komplexe aufgrund ihrer Größe an der Bewegung im Gel gehindert. Die Fluoreszenzstärke im Gel

(Abbildung 14A) nahm dabei mit zunehmender Kondensation der DNA ab, da der Fluoreszenzfarbstoff aufgrund der, mit der Kondensation einhergehenden, strukturellen Veränderung nicht mehr mit der DNA interkalieren konnte.

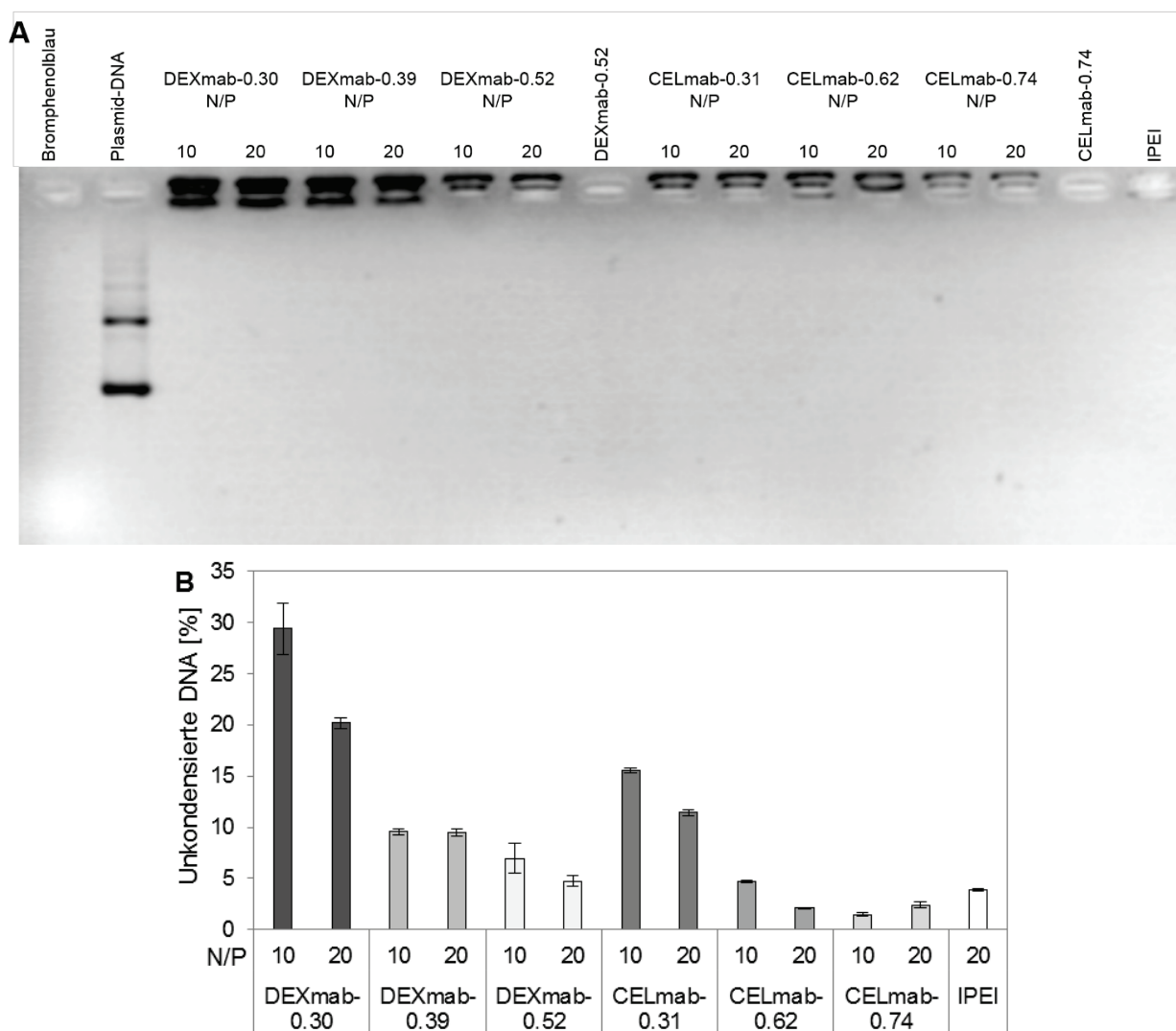


Abbildung 14: Untersuchung der Komplexe aus pGL3 und mit Methylaminobutyrat substituierten Dextranen (DEXmab) und Zellulosen (CELmab) mit verschiedenen Substitutionsgraden und N/P-Verhältnissen von 10 und 20 auf unkondensierte DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese (A) und AccuBlue™-Assay (B). Positivkontrolle = Komplexe aus 2.500 g/mol IPEI und pDNA. Bromphenolblau = Kontrolle der Lauffront im Gel. Negativkontrolle = Plasmid DNA (pGL3). DEXmab-0.52 und CELmab-0.74 ohne pGL3 zur Kontrolle auf unspezifische Interaktionen. Im AccuBlue™-Assay: Berechnung unkondensierte DNA in Prozent der Negativkontrolle. [Mittelwert +/- Standardabweichung, n = 3, 1 Wiederholung]

Die makroskopisch erkennbare Abnahme der Fluoreszenzintensität im Gel war dabei mit der quantitativ mittels AccuBlue™-Assay errechneten vergleichbar. Es zeigte sich eine Abhängigkeit der Kondensation der DNA von Polymer, DS und N/P-Verhältnis. Mit steigendem N/P-Verhältnis und steigendem DS sank die Konzentration unkondensierter DNA. Dabei war im AccuBlue™-Assay (Abbildung 14B) für DEXmab-0.30 N/P 10 und N/P 20 im Vergleich zu CELmab-0.31 bei



gleichen N/P-Verhältnissen eine um den Faktor 2 höhere Konzentration unkondensierter DNA nachweisbar. Vergleich man den Einfluss des N/P-Verhältnisses auf die Kondensation der DNA, so lag der Anteil unkondensierter DNA für DEXmab-0.30 bei N/P 10 1,5-fach höher als bei N/P 20. Ähnliches ließ sich auch für CELmab-0.31 zeigen, wo der Anteil unkondensierter DNA bei N/P 10 1,4-fach höher als bei N/P 20 lag. Für die derivatisierten Dextrane lag ab einem DS von 0,52 und einem N/P-Verhältnis von 20 der Anteil unkondensierter DNA mit 4,7 +/- 0,6 % auf Höhe der Positivkontrolle (3,9 +/- 0,2 %). Dies konnte für CELmab ab einem DS von  $\geq 0,62$  festgestellt werden. Der höhere DS der Zellulosederivate könnte dabei für die starke Kondensation der DNA verantwortlich sein, die für CELmab-0.62 N/P 20 und CELmab-0.74 N/P 10 und 20 mit einem Anteil von 1,5 +/- 0,2 bis 2,4 +/- 0,3 % unkondensierter DNA der Positivkontrolle (3,9 +/- 0,2 %) überlegen war.

Zusammenfassend wiesen sowohl mit Methylaminobutyrat substituierte Dextrane als auch Zellulosen die Fähigkeit auf, DNA zu komplexieren. Die Kondensation hing von Grundgerüst, N/P-Verhältnis und DS ab. Bei vergleichbaren DS zeigte modifizierte Zellulose eine stärkere Kondensation als die Dextranderivate. Der Anteil unkondensierter DNA war bei beiden Polymeren ab DS  $\geq 0,52$  gleich oder lag sogar unterhalb der Positivkontrolle, was auf eine höhere Bindeeffizienz der Methylaminobutyrat-substituierten Vektoren im Vergleich zum Goldstandard hinweist.

Doch nicht nur die Komplexierung der DNA war eine wichtige Voraussetzung zum Einsatz des Vektors zum Gentransfer, sondern auch die mit der Kondensation einhergehende Reduktion der Größe der Komplexe. Wie in der Literatur beschrieben, liegt die bevorzugte Größe für Komplexe zum Gentransfer zwischen 20 und 200 nm [15, 32]. Nach elektrostatischer Interaktion des Vektors mit der DNA ist ein Überschuss an positiver Ladung für die Interaktion mit der Zellmembran von Vorteil, da dies eine Aufnahme in die Zelle begünstigt [31, 32]. Aus diesem Grund wurde der hydrodynamische Durchmesser der Komplexe mit der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) und das Zetapotential mit Hilfe der Laser-Doppler-Anemometrie (LDA) gemessen. Die Komplexe aus Methylaminobutyrat-substituierten Dextranen und Zellulosen mit pGL3 bei N/P 10 und 20 wurden in deionisiertem Wasser hergestellt, um Einflüsse der Ionenstärke des Lösungsmittels auszuschließen. Nach Untersuchung auf Komplexierung und Kondensation der DNA wurde angenommen, dass sowohl die derivatisierten Dextrane als auch Zellulosen kationische Nanokomplexe formten. Wie erwartet, zeigten Methylaminobutyrat-substituierte Dextrane mit pGL3, unabhängig vom N/P-Verhältnis und Substitutionsgrad Komplexe im Größenbereich von 84 +/- 3 bis 113 +/- 2 nm (Abbildung 15A). Der PDI lag zwischen 0,228 +/- 0,014 und 0,386 +/- 0,011. Die Messung der Brownschen Bewegung der Komplexe aus

Zellulose und pGL3 mittels DLS ergab keine Korrelationskurve, so dass eine Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers sowie die diffusionsbasierte Messung des Zetapotentials mittels Laser-Doppler-Anemometrie nicht möglich waren.

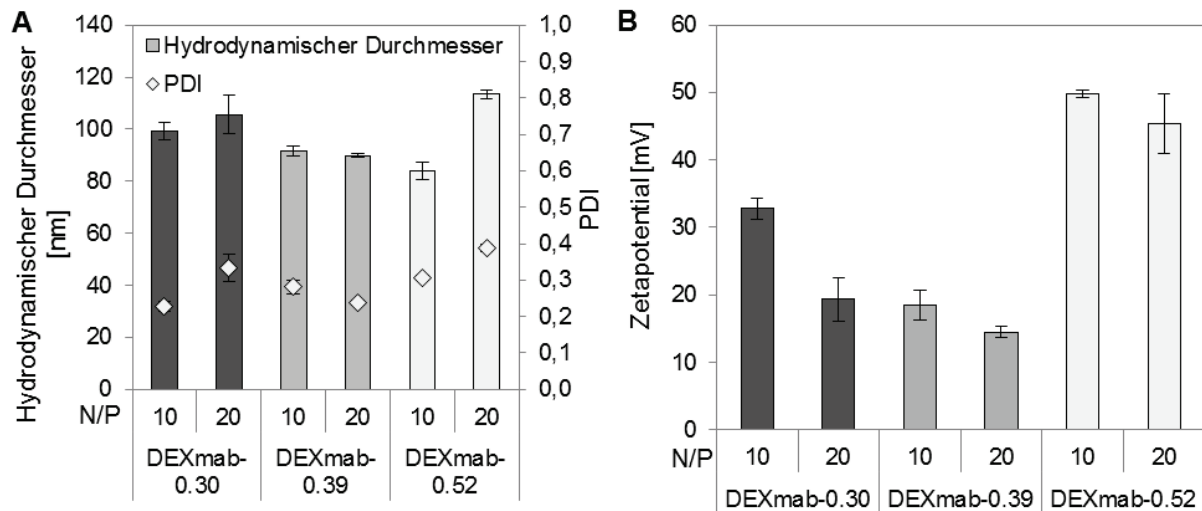


Abbildung 15: Hydrodynamischer Durchmesser und PDI bestimmt mittels dynamischer Lichtstreuung (A) sowie Zetapotential bestimmt mittels Laser-Doppler-Anemometrie (B) von Komplexen aus pGL3 und Methylaminobutyrat-substituierten Dextranen (DEXmab) mit verschiedenen Substitutionsgraden und N/P-Verhältnissen von 10 und 20. [Mittelwert +/- Standardabweichung, n = 1, 1 Wiederholung]

Da für die Herstellung der Komplexe aus DEXmab und pGL3 ein Überschuss des kationischen Polymers (N/P-Verhältnis von 10 und 20) verwendet wurde, wurde ein positives Zetapotential der Komplexe erwartet. Tatsächlich bildeten die mit Methylaminobutyrat substituierten Dextrane mit pGL3 kationische Komplexe mit einem Zetapotential von +14,5 +/- 0,8 bis +49,8 +/- 0,6 mV. Dabei hatten die mit einem DS von 0,52 substituierten Dextrane im Komplex mit pGL3 ein Zetapotential von +49,8 +/- 0,6 mV und +45,4 +/- 4,4 mV, während das Zetapotential der niedriger substituierten Dextrane (DS 0,30 und 0,39) im Komplex mit pGL3 mit steigendem DS und N/P-Verhältnis auf +32,8 +/- 1,6 mV bis 14,5 +/- 0,8 mV abfiel.

Es konnte nachgewiesen werden, dass Methylaminobutyrat-substituierte Dextrane kationische Nanokomplexe formten. Dabei war der hydrodynamische Durchmesser und PDI unabhängig von N/P-Verhältnis und DS, wohingegen mit einem DS von 0,52 ein höheres kationisches Zetapotential des Komplexes im Vergleich zu DS 0,30 und 0,39 messbar war.

Wie zu Beginn des Kapitels beschrieben, geht mit der Komplexierung und Kondensation der pDNA durch elektrostatische Interaktion zwischen kationischem Polymer und anionischer DNA eine Stabilisierung der DNA vor DNasen einher, da durch die Änderung der räumlichen Anordnung der DNA im Komplex die DNase am Abbau der DNA gehindert wird [160]. Zur Untersuchung des Schutzes vor DNasen wurden die Komplexe aus pGL3 und

Methylaminobutyrat-substituierten Dextranen bzw. Zellulosen mit DNase I über 45 Minuten behandelt. Anschließend wurde das Enzym hitzeinaktiviert und pGL3 mittels Dextransulfat aus dem Komplex gelöst und mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Bromphenolblau wurde zur Ermittlung der Lauffront verwendet. Die unbehandelte DNA wurde ohne Vektor auf das Gel aufgetragen und zeigte zwei Banden der supercoiled DNA (untere Bande) und linearen DNA (obere Bande) im Gel (Abbildung 16). Die gleichen Banden waren auch für die behandelte DNA ohne Inkubation mit DNase I erkennbar. Diese wurde mit allen Versuchsschritten außer der Zugabe von DNase behandelt, um unspezifische Einflüsse des Versuchs, wie die Inkubation in der Hitze oder Zugabe von Dextransulfat, auszuschließen.

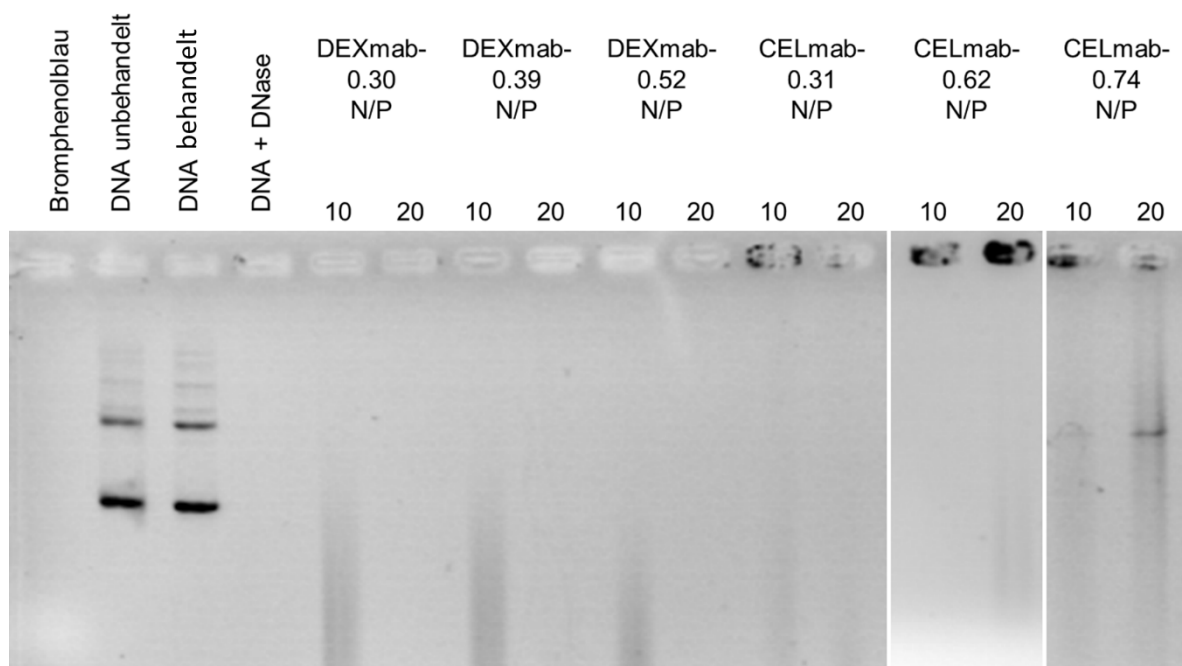


Abbildung 16: Stabilität der Komplexe aus pGL3 und Methylaminobutyrat-substituierten Dextranen (DEXmab) und Zellulosen (CELmab) mit unterschiedlichen Substitutionsgraden und N/P-Verhältnissen von 10 und 20 gegen enzymatische Abbau durch DNase I. Kontrollen: Bromphenolblau = Kontrolle der Lauffront im Gel. DNA unbehandelt = Kontroll-DNA, die nicht behandelt wurde. DNA behandelt = DNA ohne Inkubation mit DNase während des Versuchsverlaufs. DNA + DNase = DNA ohne Vektor behandelt mit DNase während des Versuchsverlaufs.

Die Positivkontrolle bestehend aus pGL3 und DNase zeigte eine vollständige Zersetzung der DNA, da keine Fluoreszenz erkennbar war. Die mit derivatisierten Dextranen geformten Komplexe zeigten keinen Schutz vor DNasen. Dies war an den fehlenden scharf definierten Banden im Vergleich zur unbehandelten Plasmid-DNA erkennbar. Die langgezogenen Banden zeigten Zersetzungsprodukte des enzymatischen Abbaus der DNA. Auch in den Banden der Komplexe aus derivatisierten Zellulosen und pGL3 zeigten sich Abbauprodukte des enzymatischen Verdauens. Allerdings waren in den Taschen noch Fluoreszenzen erkennbar, die eine Stabilisierung der DNA zeigten. Die DNA wurde teilweise unvollständig durch Dextransulfat aus den Komplexen

freigesetzt. Ob die restliche im Komplex gebundene DNA intakt war, konnte nicht abgeschätzt werden. Eine Ausnahme bildet CELmab-0.74 N/P 20, bei dem eine definierte Bande erkennbar ist.

Fasst man die physikochemischen Eigenschaften der Methylaminobutyrat-substituierten Dextrane und Zellulosen zusammen, so ließ sich eine erfolgreiche Komplexierung und Kondensation von pGL3 feststellen, was eine Grundvoraussetzung für die Anwendung als Vektor zum Gentransfer ist. Die Kondensation der Zellulosen mit  $DS \geq 0,62$  übertraf dabei die des 2.500 g/mol IPEI. Die Untersuchung des hydrodynamischen Durchmessers und des Zetapotentials zeigte für Methylaminobutyrat-substituierte Dextrane kationische Nanokomplexe, die eine geeignete Größe zum Einsatz als Vektor zum Gentransfer hatten. Unter den gewählten Bedingungen zur Untersuchung des Schutzes der DNA im Komplex vor enzymatischen Abbau konnte eine ungenügende Stabilisierung der DNA im Komplex festgestellt werden.

#### 4.1.3 *In-vitro-Transfektionseffizienz Methylaminobutyrat-modifizierter Dextrane und Zellulosen*

Um die Eignung der Methylaminobutyrat-substituierten Dextrane und Zellulosen als Träger für DNA zu untersuchen, wurde die Transfektionseffizienz der Polymere im Komplex mit pGL3 im N/P-Verhältnis von 10 und 20 *in vitro* getestet. Diese N/P-Verhältnisse wurden gewählt, da ein Überschuss kationischer Ladung für die Interaktion mit der Zellmembran, Aufnahme in die Zelle und folglich die Transfektion günstig ist [31]. Dafür wurden die Komplexe aus Polymer und pGL3 in 150 mM Kochsalzlösung hergestellt, um isoton zum Medium zu sein, zu CHO-K1-Zellen gegeben und für vier Stunden mit den Zellen im Medium inkubiert. CHO-K1-Zellen wurden verwendet, da sie für die Herstellung von rekombinanten Proteinen seit mehr als 25 Jahren genutzt werden und als Standardzelllinie für Transfektionsexperimente Anwendung finden [179]. Nach anschließendem Waschen der Zellen und Wechsel des Mediums inkubierten die Zellen für weitere 44 Stunden, um den transfizierten Zellen Zeit für Transkription und Translation der Luciferase zu geben. Im Anschluss wurde die Transfektionseffizienz bestimmt, indem Luciferin zum Zelllysate gegeben wurde, welches durch die von der Zelle synthetisierte Luciferase, oxidiert wird, wobei eine Lumineszenz auftritt. Die Transfektionseffizienz wurde als relative Lumineszenz, bestimmt durch die Aktivität der Luciferase, im Verhältnis zur Gesamtkonzentration der, durch die Zelle synthetisierten, Proteine (RLU/ $\mu$ g Protein) berechnet.

Die Messung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure(BCA)-Assay basierte auf der Reduktion zweiwertiger Kupferionen in Anwesenheit von Proteinen zu einwertigen Kupferionen,

die wiederum mit BCA eine Violettfärbung ergaben, welche bei 570 nm absorbierte. Die Konzentration der Proteine wurde mit Hilfe einer Kalibriergerade bestimmt, welche mit Hilfe einer Bovines-Serum-Albumin(BSA)-Verdünnungsreihe ermittelt wurde. DNA ohne Vektor sowie 150 mM Kochsalzlösung, welche als Herstellungsmedium der Komplexe verwendet wurde, wurden als Negativkontrollen untersucht, um den Einfluss der Komplexe auf die Proteinkonzentration und Transfektion zu bestimmen. Die Proteinkonzentration und die Transfektionseffizienz zeigten eine Abhängigkeit von Grundgerüst, DS und N/P-Verhältnis.

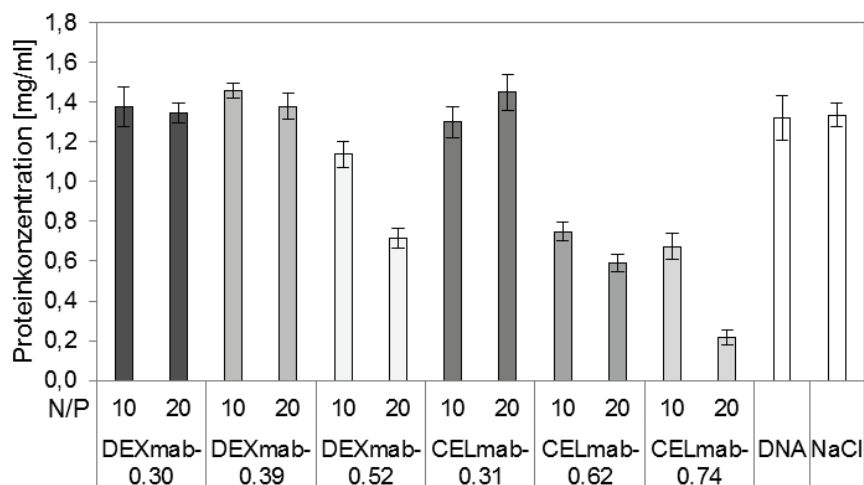


Abbildung 17: Proteinkonzentration nach Behandlung der CHO-K1-Zellen mit Komplexen aus Methylaminobutyrat-substituierten Dextranen (DEXmab) und Zellulosen (CELmab) mit pGL3 in verschiedenen Substitutionsgraden und N/P-Verhältnissen von 10 und 20 nach Transfektion für 4 Stunden und Inkubation für 44 Stunden. DNA ohne Vektor und 150 mM Kochsalzlösung, als Herstellungsmedium der Komplexe, als Negativkontrolle. [Mittelwert +/- Standardabweichung, n = 2]

Ab einem DS  $\geq 0,52$  von Methylaminobutyrat an Dextran sowie DS  $\geq 0,62$  von Methylaminobutyrat an Zellulose konnte mit steigendem N/P-Verhältnis eine sinkende Proteinkonzentration festgestellt werden. Dieses Absinken der Proteinkonzentration entsprach dem Absinken der Zellviabilität (Kapitel 4.1.1), was in der Literatur bereits beschrieben ist [111]. So blieb die Proteinkonzentration (Abbildung 17) der niedrig substituierten Polymere (DEXmab-0.31, -0.39 und CELmab-0.31) von  $1,30 \pm 0,08$  bis  $1,46 \pm 0,04$  mg/ml auf dem Niveau der Negativkontrollen von  $1,32 \pm 0,11$  (DNA) und  $1,33 \pm 0,06$  mg/ml (NaCl). Mit steigendem DS und N/P-Verhältnis sank die Proteinkonzentration von DEXmab-0.52 N/P 20, CELmab-0.62 N/P 10 und 20 und CELmab-0,74 N/P 10 auf ca. 50 % der Negativkontrollen und für CELmab-0.74 N/P 20 weiter auf 16 % der Negativkontrollen.

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz von pGL3 wurde die Lumineszenz nach Zugabe von Luciferase Assay Reagenz gemessen und, im Verhältnis zur Proteinkonzentration, aufgetragen. Das transfizierte pGL3 kodierte für Luciferase. Im Luciferase Assay Reagenz ist Luciferin

enthalten, welches oxidiert wurde und in Folge eine messbare Lumineszenz ergab. Ohne Vektor ließ sich eine vernachlässigbare Transfektionseffizienz von  $269 \pm 282$  RLU/ $\mu$ g Protein (Negativkontrolle, Abbildung 18) feststellen. Mit steigendem DS und steigendem N/P-Verhältnis stieg die Transfektionseffizienz der mit Methylaminobutyrat-substituierten Dextrane und Zellulosen. So stieg die Transfektionseffizienz von DEXmab-0.30 N/P 20 zu DEXmab-0.52 N/P 20 um den Faktor 72 und von DEXmab-0.52 N/P 10 zu DEXmab-0.52 N/P 20 um den Faktor 3. Für die Methylaminobutyrat-substituierten Zellulosen stieg z. B. von CELmab-0.31 N/P 20 zu CELmab-0.74 N/P 20 die Transfektionseffizienz um den Faktor 37 und von CELmab-0.74 N/P 10 zu CELmab-0.74 N/P 20 um den Faktor 8.

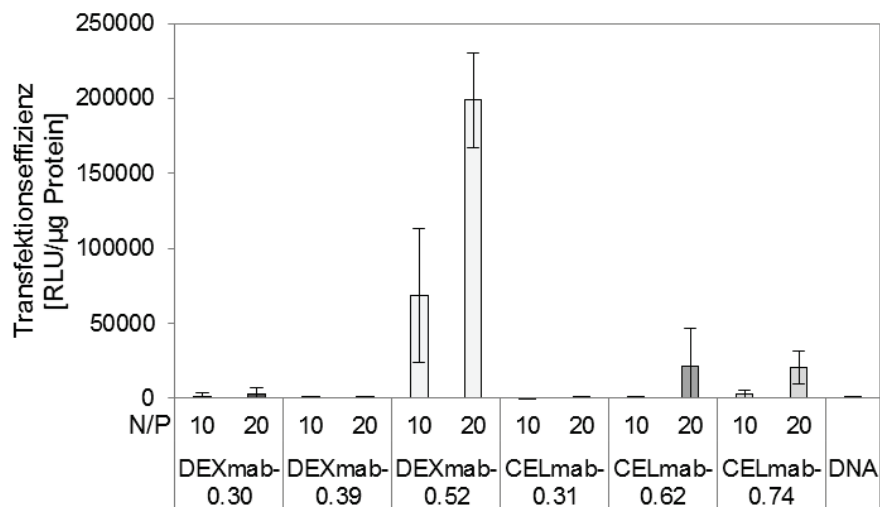


Abbildung 18: Transfektionseffizienz berechnet aus der Lumineszenz des Luciferins nach Inkubation mit der, von pGL3 kodierten und in den Zellen synthetisierten Luciferase, im Verhältnis zur Gesamtproteinkonzentration bestimmt mittels BCA-Assay. CHO-K1-Zellen transfiziert über 4 Stunden mit Komplexen und anschließender Inkubation über 44 Stunden, aus Methylaminobutyrat-substituierten Dextranen (DEXmab) und Zellulosen (CELmab) mit verschiedenen DS, und pGL3 in N/P-Verhältnissen von 10 und 20. [Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 2$ ]

Der Anstieg der Transfektionseffizienz fiel für die substituierten Dextrane größer aus als für die Zellulosen. So zeigte sich für DEXmab-0.52 bei einem N/P-Verhältnis von 20 ein um den Faktor 10 höhere Transfektionseffizienz als CELmab-0.74 bei gleichem N/P-Verhältnis. Das Grundgerüst schien für die Transfektion einen größeren Einfluss zu haben als der DS, im Gegensatz zur Komplexierung und Kondensation der DNA, wo der höhere Substitutionsgrad der Zellulose eine stärkere Kondensation der DNA verursachte (Kapitel 4.1.2). Im Vergleich zu 2.500 g/mol IPEI (Daten nicht gezeigt), welches als Positivkontrolle eingesetzt wurde, da eine hohe Transfektionseffizienz IPEIs dieser molaren Masse lang bekannt ist [180], zeigte DEXmab-0.52 eine um den Faktor 64 niedrigere Transfektionseffizienz.

#### 4.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen von Dextranen und Zellulosen als Grundgerüst für einen potentiellen Vektor zum Gentransfer

In dieser Studie sollte der Einfluss des Grundgerüsts auf die Eigenschaften des Vektors zum Gentransfer untersucht werden. Als Grundgerüste wurden Dextran und Zellulose aufgrund ihrer Biokompatibilität und einfachen Modifizierbarkeit gewählt. Die Modifizierbarkeit war für das Einbringen kationischer Gruppen relevant, wobei in dieser Studie eine etablierte Modifikation mit Methylaminobutyrat gewählt wurde. Beide Polymere wurden mit Methylaminobutyrat mit DS von 0,31; 0,39 und 0,52 für Dextran und 0,30; 0,62 und 0,74 für Zellulosen derivatisiert und verglichen. Fasst man die physikochemischen und biologischen Daten des synthetisierten Vektors zusammen, so zeigte sich eine Abhängigkeit der Eigenschaften von Grundgerüst, Konzentration und Substitutionsgrad. Während sowohl Zellulose als auch Dextran eine konzentrationsabhängige Senkung der Zellviabilität von L929 murinen Fibroblasten *in vitro* verursachten, zeigte Zellulose im Gegensatz zu Dextran ab  $DS \geq 0,31$  konzentrationsabhängige Aggregation von Erythrozyten. Die Ausbildung kationischer Nanokomplexe konnte mittels dynamischer Lichtstreuung und Laser-Doppler-Anemometrie nur für Komplexe aus Dextran und pGL3 nachgewiesen werden. Beim Vergleich der Komplexierung und Kondensation der DNA zeigte sich sowohl für Dextran als auch für Zellulosen eine hohe Bindeeffizienz mit DNA, wobei die Kondensation der mit DS von 0,62 und 0,74 substituierten Zellulose stärker war als die Positivkontrolle 2.500 g/mol IPEI. Sowohl Dextran als auch Zellulose zeigten mit steigendem DS eine steigende Transfektionseffizienz, welche für Dextran allerdings stärker ausgeprägt war, so dass zusammenfassend Dextran aufgrund seiner geringeren Toxizität und höheren Transfektionseffizienz für weitere Studien zur Entwicklung eines optimierten Vektors zum Gentransfer verwendet werden sollte.

#### 4.2 Einfluss verschiedener Substituenten auf die Eigenschaften von Dextran zum Gentransfer

Auf dem Weg zur Entwicklung maßgeschneiderter Polymere zum Gentransfer wurde im vorangegangenen Kapitel 4.1 Dextran, aufgrund seiner niedrigen Toxizität und hohen Transfektionseffizienz nach Kationisierung mit Methylaminobutyrat, als vorteilhaftes Grundgerüst für einen Vektor zum Gentransfer identifiziert. Zur weiteren Optimierung sollten im Folgenden eine Reihe von Substituenten unterschiedlicher Struktur verglichen werden. Aufgrund positiver Erkenntnisse bei der Anwendung natürlicher Substanzen wie Spermin [113, 133, 142, 144], Oligopeptiden [100-103] und Agmatin (decarboxyliertes Argininderivat) [123, 124] an Dextran, fiel die Wahl auf Aminosäuren. Aufgrund des endogenen Vorkommens sind Aminosäuren biokompatibel.

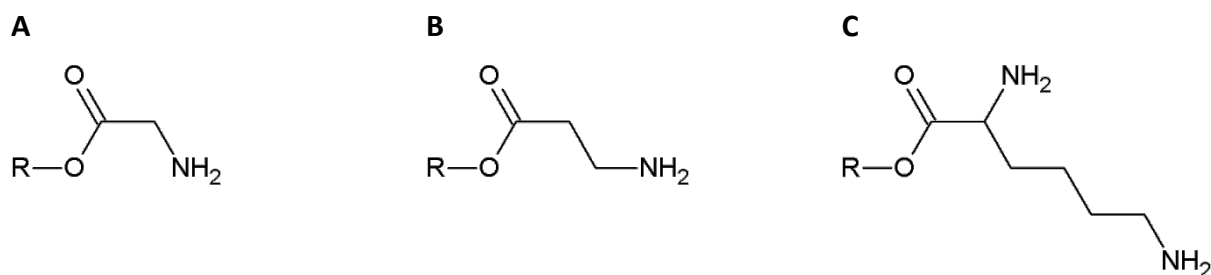


Abbildung 19: Struktur der Glycin- (A),  $\beta$ -Alanin- (B) und Lysinsubstituenten (C).

Ihre Carboxylgruppe brachte den Vorteil einer einfachen Kopplung mittels Esterbindung an die Hydroxylgruppe des Dextrans mit sich. Die kationisierbare Aminfunktion der Aminosäuren sorgte wiederum für die notwendige elektrostatische Interaktion mit DNA. Um die Struktur-Aktivitäts-Beziehung zu untersuchen wurden Glycin,  $\beta$ -Alanin und Lysin als Aminosäuren mit unterschiedlicher Stellung der Aminfunktion gewählt. So befand sich die Aminfunktion für Glycin am  $\alpha$ -, für  $\beta$ -Alanin am  $\beta$ - und für Lysin am  $\alpha$ - und  $\epsilon$ -Kohlenstoff der Aminosäure (Abbildung 19). Zusätzlich wiesen die Aminfunktionen der verschiedenen Aminosäuren unterschiedliche  $pK_a$ -Werte auf. So hatte die  $\alpha$ -Aminfunktion von Glycin einen  $pK_a$  von 7,7; die  $\beta$ -Aminfunktion von  $\beta$ -Alanin 8,9 und die  $\alpha$ - bzw.  $\epsilon$ -Aminfunktion von Lysin 6,8 bzw. 9,9 (Daten zur Verfügung gestellt von Konrad Hotzel, AG Prof. Heinze, Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie, Friedrich-Schiller-Universität, Jena). Glycin,  $\beta$ -Alanin und Lysin (Kapitel 3.1, Tabelle 6) wurden mittels Esterbindung an 60.000 g/mol Dextran gekoppelt und diese Aminosäuredextranester auf ihre biologischen und physikochemischen Eigenschaften und damit ihre Eignung als Vektor zum Gentransfer untersucht.

#### 4.2.1 Einfluss der mit Glycin, $\beta$ -Alanin oder Lysin substituierten Dextrane auf die Zellviabilität von Fibroblasten und Erythrozyten *in vitro*

Für die Überprüfung der Zellviabilität sollte als Worst-Case-Szenario der Einfluss der mit Glycin,  $\beta$ -Alanin oder Lysin substituierten Dextrane ohne DNA auf murine Fibroblasten und Schafserythrozyten untersucht werden.

Die Fibroblasten wurden über 24 Stunden mit den mit Glycin,  $\beta$ -Alanin oder Lysin substituierten Dextranen im Konzentrationsbereich von 3,9 bis 500  $\mu\text{g/ml}$  behandelt. Zelltoxisches Thio-mersal [177] mit einer Konzentration von 0,02 % wurde als Positivkontrolle verwendet und verursachte eine Reduktion der Zellviabilität auf 1,78 +/- 1,74 %. Der Einfluss der mit Aminosäuren substituierten Dextrane auf die Zellviabilität L929 muriner Fibroblasten zeigte eine klare Abhängigkeit von der ausgewählten Aminosäure, DS und Konzentration. So konnte für Glycin-substituierte Dextrane bis zur maximal getesteten Polymerkonzentration von 500  $\mu\text{g/ml}$  keine Toxizität festgestellt werden (Abbildung 20A). Im Unterschied dazu zeigte sich beim Einsatz



von  $\beta$ -Alanin und Lysin als Substituent eine DS und konzentrationsabhängige Toxizität. Für  $\beta$ -Alanin (Abbildung 20B) mit einem DS  $\leq 0,21$  war bis zu einer Konzentration von 500  $\mu\text{g/ml}$  keine Toxizität nach DIN EN ISO 10993-5 messbar. Für DS  $\geq 0,69$  sank die Viabilität mit steigender Polymerkonzentration ab und unterschritt bei  $\geq 62,5$   $\mu\text{g/ml}$  die 70 %-Grenze. Im Vergleich zu  $\beta$ -Alanin lag die Viabilität von mit Lysin substituierten Dextranen bei gleichem DS höher (Abbildung 20C). So unterschritten mit Lysin substituierte Dextrane mit DS  $\geq 0,68$  erst bei einer Konzentration von  $\geq 125$   $\mu\text{g/ml}$  die 70 %-Grenze. Außerdem zeigte sich z. B. beim direkten Vergleich von DEXala-0.69 und DEXlys-0.68 bei einer Polymerkonzentration von 500  $\mu\text{g/ml}$  für das mit Lysin substituierte Dextran eine um den Faktor 6 höhere Zellviabilität.

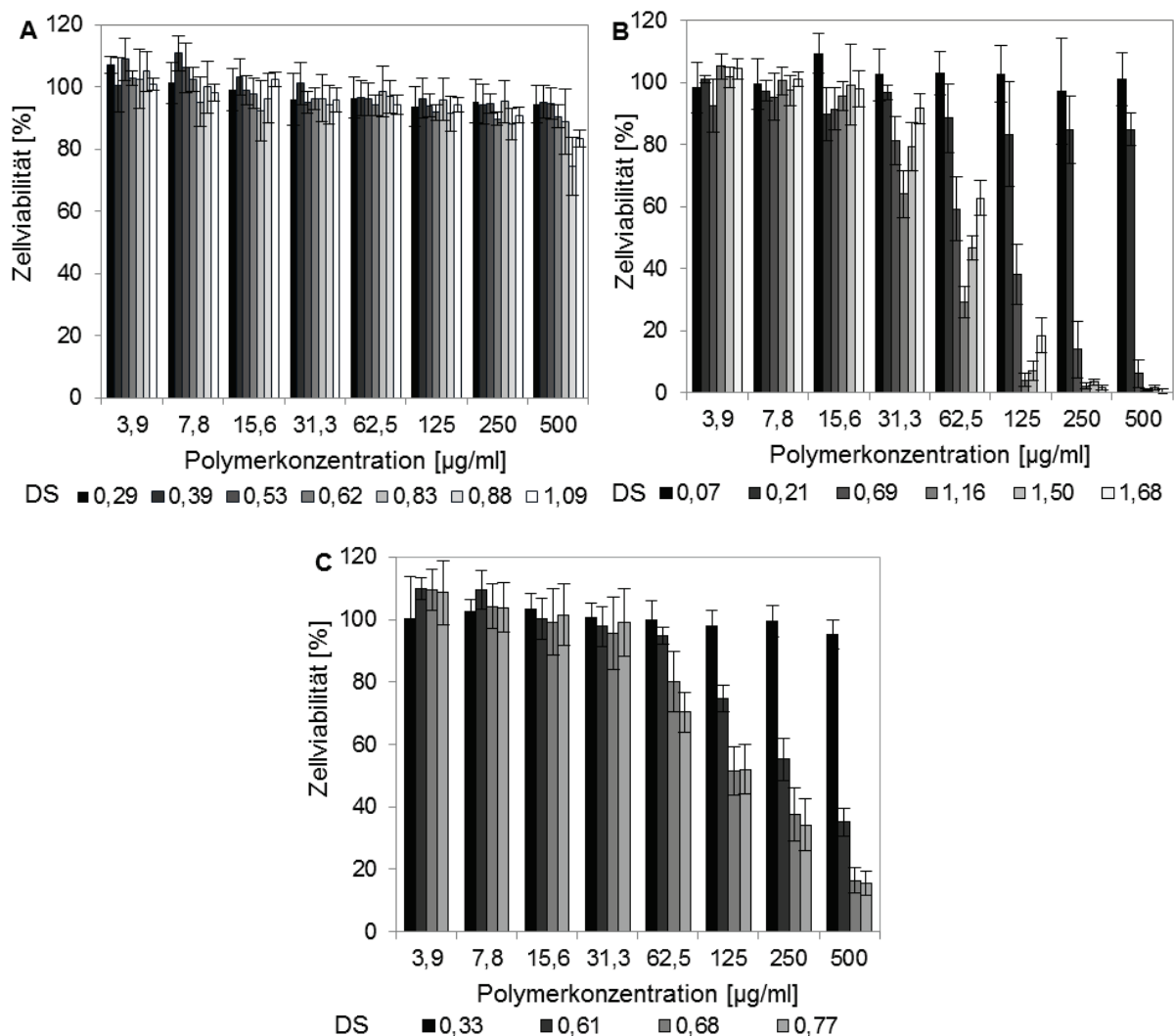


Abbildung 20: Zellviabilität nach 24-stündiger Behandlung von L929 murinen Fibroblasten mit Glycin (A),  $\beta$ -Alanin (B) oder Lysin (C) substituierten Dextran mit verschiedenen Substitutionsgraden (DS) und Polymerkonzentrationen untersucht mit Hilfe des MTT-Assays. Zellviabilität berechnet in Prozent der mit reinem Medium behandelten Zellen. [Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 7$ , 1 Wiederholung]

Zusammenfassend war bei der Untersuchung der Toxizität der mit Glycin,  $\beta$ -Alanin oder Lysin substituierten Dextrane ein konzentrations- und DS-abhängiger Einfluss für die mit  $\beta$ -Alanin oder

Lysin substituierten Dextrane feststellbar. Während mit Glycin substituierte Dextrane keine Toxizität im untersuchten Konzentrationsbereich zeigten, verursachten ab einem DS  $\geq 0,68$   $\beta$ -Alanin-substituierte Dextrane ab einer Polymerkonzentration  $\geq 62,5 \mu\text{g/ml}$  und Lysin-substituierte Dextranen ab  $\geq 125 \mu\text{g/ml}$  eine Viabilität  $< 70\%$  bei murinen Fibroblasten. Auch bei höheren Polymerkonzentrationen zeigte mit Lysin substituiertes Dextran eine geringere Toxizität als mit  $\beta$ -Alanin substituieretes.

Die toxikologische Bewertung des Einflusses der mit Glycin,  $\beta$ -Alanin oder Lysin substituierten Dextrane auf Erythrozyten war wichtig, da Blut der erste Kontaktpartner nach intravenöser Applikation der Komplexe ist [28, 171].

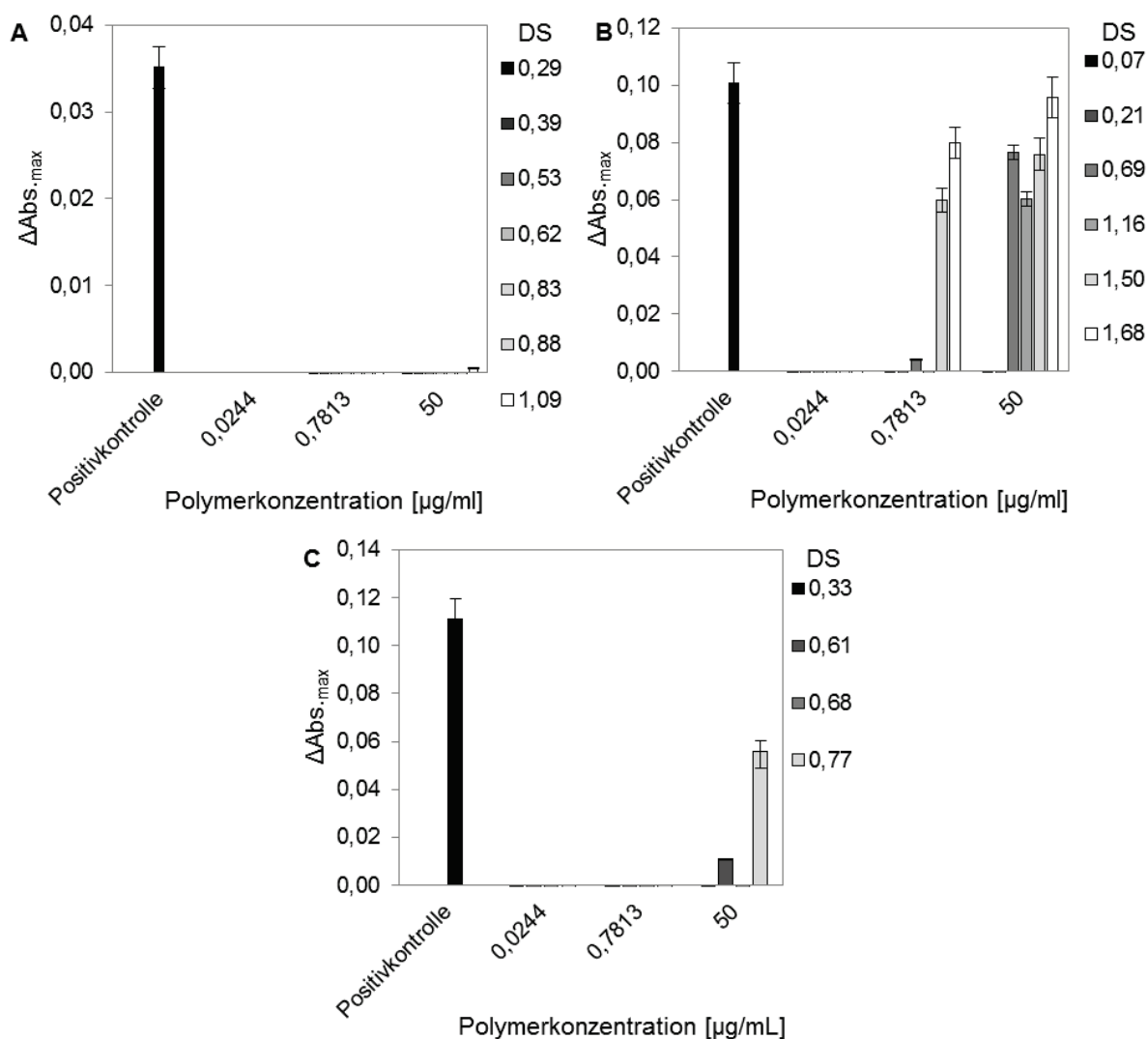


Abbildung 21: Aggregation roter Blutkörperchen nach zweistündiger Inkubation mit Glycin (A),  $\beta$ -Alanin (B) oder Lysin (C) substituierten Dextranen mit verschiedenen Substitutionsgraden (DS) und Polymerkonzentrationen. Berechnung als  $\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$  durch Subtraktion der Absorption bei 645 nm von der Absorption der Negativkontrolle (PBS). Positivkontrolle = 25.000 g/mol bPEI. [Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 6$ , 1 Wiederholung]

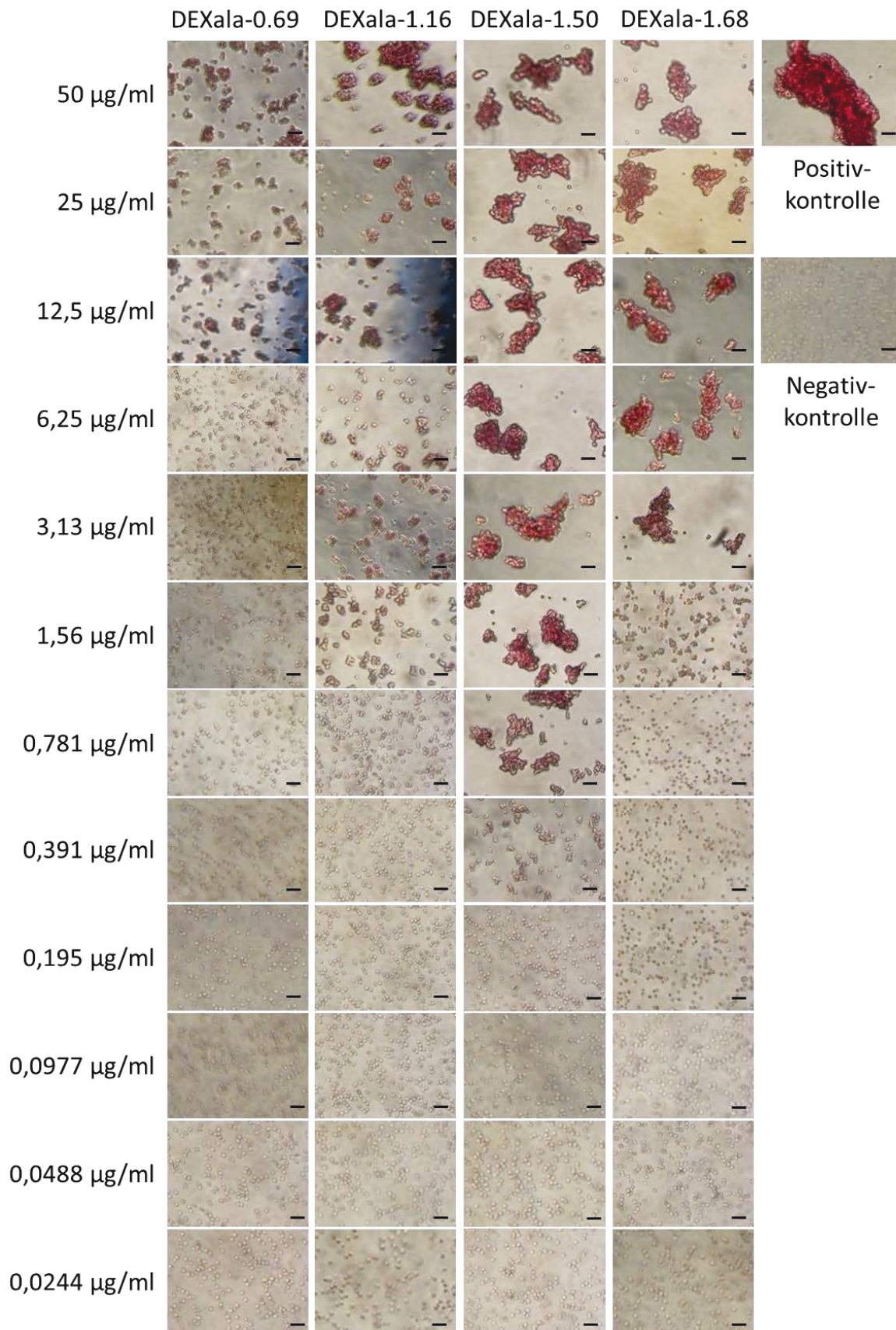


Abbildung 22: Mikroskopische Aufnahmen der Erythrozyten nach zweistündiger Inkubation mit  $\beta$ -Alanin-substituierten Dextranen mit Substitutionsgraden von 0,69; 1,16; 1,50 und 1,68 und verschiedenen Polymerkonzentrationen. Negativkontrolle = PBS. Positivkontrolle = 30 µg/ml 25.000 g/mol bPEI. [Balkenlänge = 20 µm]



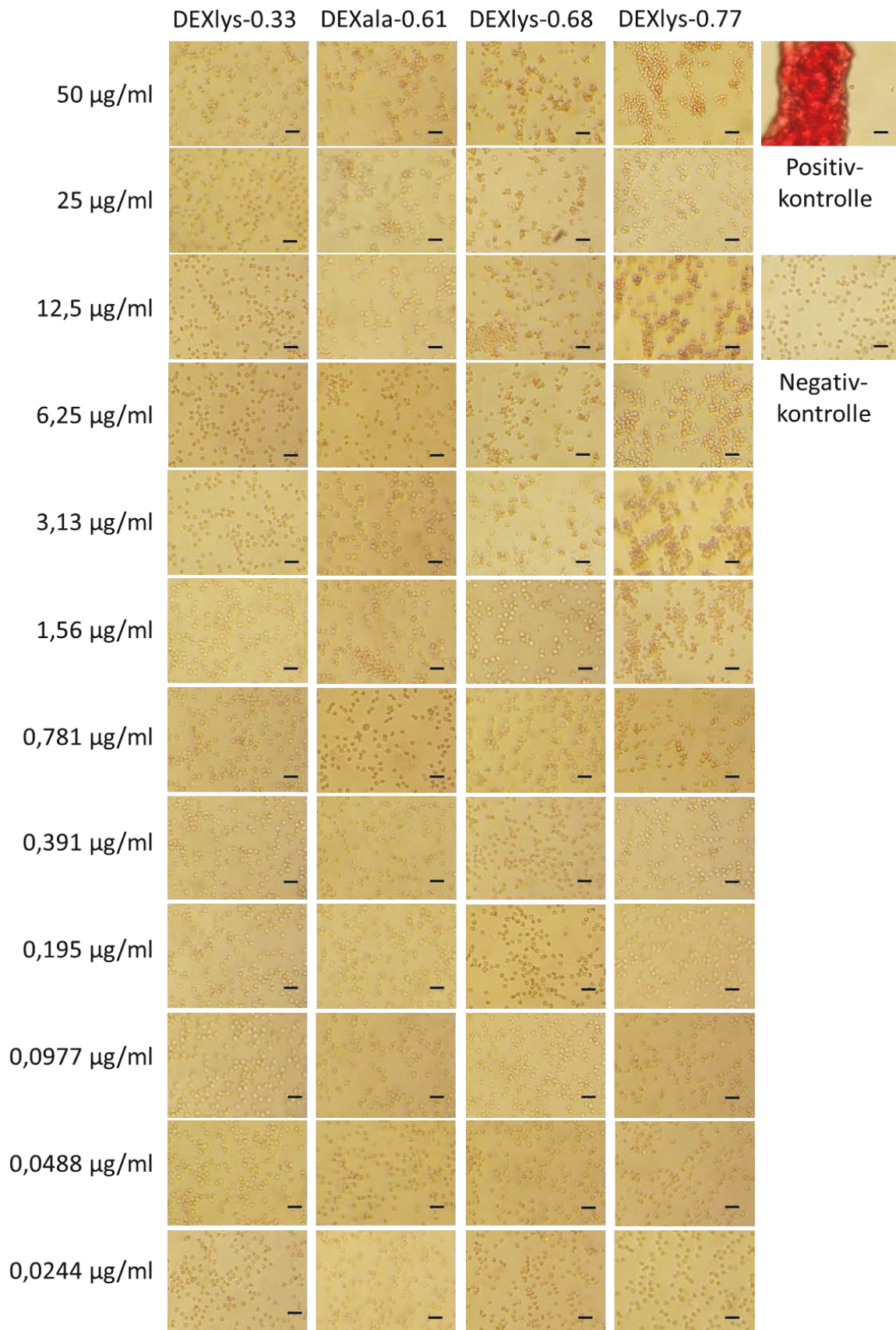


Abbildung 23: Mikroskopische Aufnahmen der Erythrozyten nach zweistündiger Inkubation mit Lysin-substituierten Dextranen mit Substitutionsgraden von 0,33; 0,61; 0,68 und 0,77 und verschiedenen Polymerkonzentrationen. Negativkontrolle = PBS. Positivkontrolle = 30 µg/ml 25.000 g/m [Balkenlänge = 20 µm]

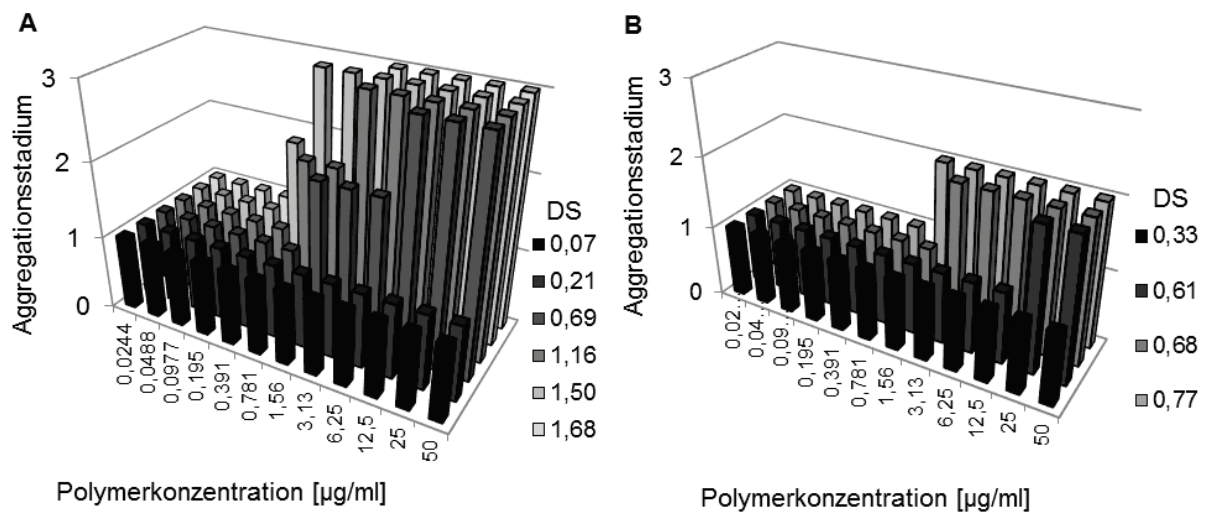


Abbildung 24: Makroskopische Beurteilung der Aggregation roter Blutzellen nach zweistündiger Behandlung mit  $\beta$ -Alanin (A) oder Lysin (B) substituierten Dextranen mit verschiedenen Substitutionsgraden (DS) und Konzentrationen getestet an Schafserythrozyten. (Stadium 1 = leichte Aggregation bis Stadium 3 = starke Aggregation)

Zur Untersuchung der Aggregation roter Blutzellen bei Kontakt mit den Polymeren wurden diese, nach zweistündiger Inkubation, bei 645 nm analysiert. Die Absorption der mit den Proben inkubierten Erythrozyten wurde dann von der Absorption der Negativkontrolle (PBS) subtrahiert, um die maximale Absorptionsdifferenz zu berechnen. Dieser Wert stieg mit steigender Aggregation der Erythrozyten nach Behandlung mit den Proben an. In Abbildung 21 wird der  $\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$  direkt mit der Aggregation der Erythrozyten nach Behandlung der Positivkontrolle (30 µg/ml 25.000 g/mol bPEI) verglichen. Die Ergebnisse der Zelltoxizität an L929 murinen Fibroblasten spiegelten sich in der Aggregation roter Blutzellen wieder. So war auch in diesen Experimenten keine Toxizität der mit Glycin substituierten Dextrane in Form von Erythrozytenaggregation erkennbar. Weder bei der Messung der Absorption (Abbildung 21A) noch bei der makroskopischen Begutachtung (Daten aufgrund fehlender Aggregation nicht gezeigt). Für die mit  $\beta$ -Alanin substituierten Dextrane zeigte sich, wie bei der Zellviabilität eine Abhängigkeit der Aggregation roter Blutzellen von DS und Polymerkonzentration. So waren auch hier bei der Untersuchung von DEXala mit  $\text{DS} \leq 0,21$  keine Aggregation mess- (Abbildung 21B) und beobachtbar (Abbildung 24A, mikroskopische Aufnahmen aufgrund fehlender Aggregation nicht gezeigt). Bei einem DS von  $\geq 0,69$  kam es zur Aggregation ab einer Polymerkonzentration von 0,391 µg/ml bei DEXala-1.50, von 0,781 µg/ml bei DEXala-1.16 und -1.68 sowie bei 1,56 µg/ml bei DEXala-0.69. Dies war ebenfalls am beobachteten Aggregationsstadium 2 erkennbar (Abbildung 22, Abbildung 24A), dass sich bei DEXala-1.50 bei 0,781 µg/ml, bei DEXala-1.16 und -1.68 bei 3,13 µg/ml und bei DEXala-0.69 bei 12,5 µg/ml im Stadium 3 widerspiegelte. Diese Aggregationsstadien waren mit denen der Aggregationsberechnung ( $\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$ , Abbildung 21B)

vergleichbar. Bei einer Polymerkonzentration von 50 µg/ml zeigten sich für die DEXala mit DS  $\geq 0,69$  starke Aggregationen (Stadium 3), die auch an den  $\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$ -Werten erkennbar waren, die auf dem Niveau der Positivkontrolle lagen. Wie bei der Bestimmung der Zellviabilität war für DEXlys-0.33 ebenfalls keine Toxizität in Form von Erythrozytenaggregation feststellbar. Und auch für die höher substituierten DEXlys-Derivate zeigte sich eine geringere Toxizität im Vergleich zu den mit  $\beta$ -Alanin substituierten Dextranen. So war für DEXlys-0.77 erst eine leichte Aggregation (Stadium 2, Abbildung 23, Abbildung 24B) bei einer Polymerkonzentration von 1,56 µg/ml erkennbar. Für DEXlys-0.61 bzw. -0.68 trat diese leichte Aggregation (Stadium 2) erst bei Polymerkonzentrationen von 25 bzw. 3,13 µg/ml auf. Die geringere Aggregation war auch an den  $\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$ -Werten erkennbar, die bei 50 µg/ml mit für DEXlys-0.77 um den Faktor 2 niedriger lagen als die Positivkontrolle und eine Stadium 2 Aggregation zeigten.

Fasst man die Daten der Untersuchung der Erythrozytenaggregation, verursacht durch mit Aminosäure substituierten Dextrane, zusammen, so lässt sich analog zur Zelltoxizitätsuntersuchung an Fibroblasten keine Aggregation roter Blutzellen durch Glycin-substituierte Dextrane finden. Auch mit  $\beta$ -Alanin und Lysin substituierte Dextrane mit einem DS  $\leq 0,33$  verursachten keine Aggregation roter Blutzellen, wohingegen es bei höheren DS konzentrationsabhängig zur Erythrozytenaggregation kam, die für Lysin-substituierte Dextrane maximal Stadium 2 erreichte und für  $\beta$ -Alanin-substituierte Dextrane bis auf das Niveau der Positivkontrolle anstieg (Stadium 3).

Neben der Aggregation roter Blutzellen durch die Polymere sollte als weitere Untersuchung der Toxizität die Lyse roter Blutzellen getestet werden. Dafür wurden die Erythrozyten mit den Glycin-,  $\beta$ -Alanin- bzw. Lysin-substituierten Dextranen behandelt, die Absorption des ausgetretene Hämoglobin bei 544 nm gemessen und ins Verhältnis zu Positivkontrolle als prozentuale Hämolyse berechnet. Als Positivkontrolle kam Triton-X 100 zur Anwendung, welches durch seine oberflächenaktiven Eigenschaften eine vollständige Zelllyse verursacht [171]. Das als Negativkontrolle verwendete PBS zeigte keine Lyse der Erythrozyten (Daten nicht gezeigt). Wie in Abbildung 25 zu sehen, war selbst bei der höchsten getesteten Konzentration von 500 µg/ml keine Hämolyse für die mit Glycin und Lysin substituierten Dextrane zu erkennen. Die ASTM F756-08 legt einen Wert von  $< 2$  % Hämolyse für nicht hämolytische Substanzen fest. Zwischen 2 - 5 % besteht eine leichte Hämolyse. Die mit DS von 1,50 und 1,68 mit  $\beta$ -Alanin substituierten Dextrane zeigten bei der maximal getesteten Polymerkonzentration von 500 µg/ml 2,7 +/- 1,8 bzw. 2,5 +/- 0,2 % Hämolyse, die nach ASTM F756-08 zwischen der Einteilung nicht- und leicht hämolytisch lagen.

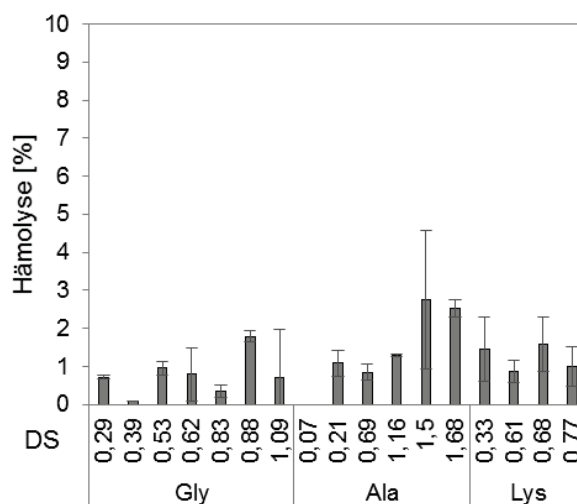


Abbildung 25: Lyse roter Blutzellen ermittelt nach einstündiger Behandlung mit Glycin- (Gly),  $\beta$ -Alanin- (Ala) oder Lysin-(Lys)substituierten Dextranen mit verschiedenen Substitutionsgraden (DS) und bei einer Konzentration von 500  $\mu\text{g/ml}$ . Berechnet in Prozent der Positivkontrolle (1% Triton-X 100) [Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 6$ , 1 Wiederholung]

Zusammenfassend konnte bei der Untersuchung der Toxizität der Polymere unter den gewählten Bedingungen keine Hämolyse festgestellt werden. Die Zelltoxizität an murinen Fibroblasten und die Erythrozytenaggregation zeigten eine Abhängigkeit vom Substituenten mit  $\beta$ -Alanin > Lysin > Glycin sowie eine steigende Toxizität mit steigendem DS der Substituenten am Dextran und Konzentration des Polymers. Während Glycin als Substituent in allen Viabilitätsuntersuchungen keine Toxizität zeigte, stieg ab einem DS von  $\geq 0,61$  von mit  $\beta$ -Alanin bzw. Lysin substituierten Dextranen die Toxizität konzentrationsabhängig an.

#### 4.2.2 Untersuchung der Fähigkeit zur Kondensation, Größenreduktion und Schutz von DNA vor DNase von mit Glycin, $\beta$ -Alanin oder Lysin substituierten Dextranen

Zur Untersuchung der Fähigkeit der mit Glycin,  $\beta$ -Alanin oder Lysin substituierten Dextrane zur Kondensation von Plasmid-DNA wurden Komplexe mit verschiedenen N/P-Verhältnissen untersucht.

Nach Komplexbildung erfolgte die Quantifizierung unkondensierter DNA mittels AccuBlue<sup>TM</sup>-Assay. Der Anteil unkondensierter DNA wurde über die Fluoreszenzintensität des DNA-Interkalationsfarbstoffes nach Inkubation mit den Komplexen im Verhältnis zu DNA ohne Polymer berechnet. Bei der Untersuchung der DNA-Bindeeffizienz als eine der wichtigsten Eigenschaften eines Trägers zum Transport von DNA zeigte sich eine Abhängigkeit der Komplexierung und Kondensation der pDNA von substituierten Aminosäure, DS und N/P-Verhältnis. Mit Glycin substituierte Dextrane zeigten eine geringe Kondensation der DNA. In den im Vorversuch untersuchten N/P-Verhältnissen von 10 und 20 wurde weniger als 30% der

DNA kondensiert (Abbildung 26A). Das als Positivkontrolle verwendete 2.500 g/mol IPEI zeigte bei N/P 20  $2,27 \pm 0,05$  % unkondensierte DNA. Die mit in dieser Untersuchung mit Glycin substituierten Dextrane mit einem DS bis 1,09 wurden nicht weiter auf ihre Eignung als Vektor zum Gentransfer untersucht. Im Gegensatz dazu fand sowohl bei mit  $\beta$ -Alanin als auch mit Lysin substituierten Dextranen eine Kondensation der DNA statt. Hier zeigte sich, wie auch bei den Toxizitätsuntersuchungen (Kapitel 4.2.1), eine Abhängigkeit von DS und N/P-Verhältnis. Für DEXala mit  $DS \leq 0,21$  lag unabhängig vom N/P-Verhältnis  $\geq 32,9$  % DNA unkondensiert vor (Abbildung 26B). Ab einem DS von 0,69 allerdings waren bereits ab einem N/P von 0,5  $< 15$  % DNA unkondensiert. Ab  $N/P \geq 2$  war  $< 5$  % DNA unkondensiert. Bei  $DS > 0,69$  lagen selbst ab  $N/P 0,5$  weniger als 5 % DNA unkondensiert vor (Abbildung 26B).

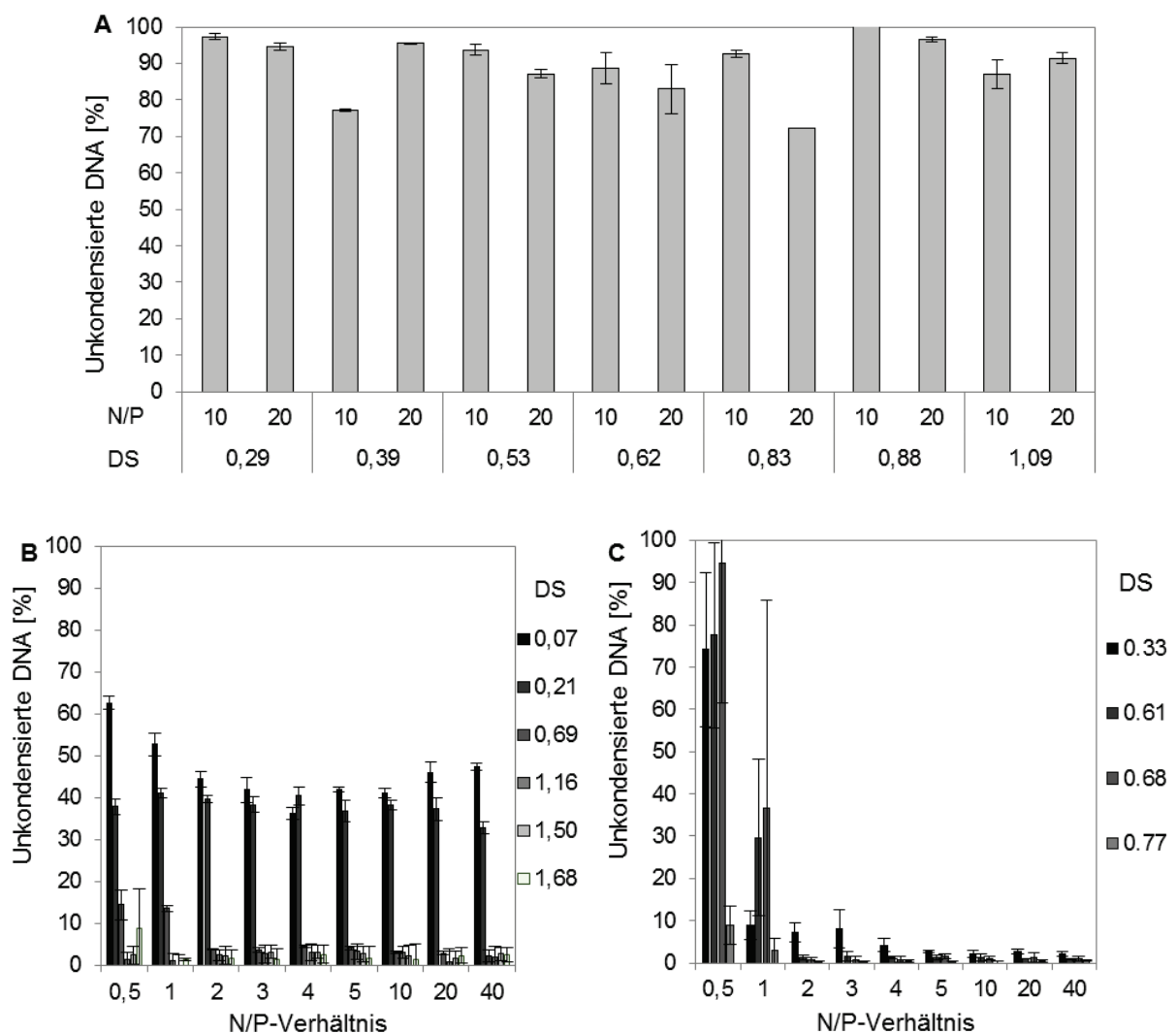


Abbildung 26: Unkondensierte DNA in Komplexen aus pGL3 und mit Glycin (A),  $\beta$ -Alanin (B) oder Lysin (C) substituierte Dextrane mit verschiedenen Substitutionsgraden (DS) und N/P-Verhältnissen untersucht mittels AccuBlue<sup>TM</sup>-Assay. Anteil unkondensierter DNA berechnet in Prozent der DNA ohne Vektor. [Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 3$ , 1 Wiederholung]



Bei mit Lysin substituierten Dextranen waren bei N/P 0,5 und DS <0,77 noch mehr als 70 % der DNA unkondensiert, während man bei N/P 1 anhand der hohen Standardabweichungen den Umschlagpunkt der Komplexbildung zur Kondensation erkennen konnte (Abbildung 26C). Ab einem N/P-Verhältnis von  $\geq 2$  lag bei Komplexen aus mit Lysin substituierten Dextranen weniger als 10 % DNA unkondensiert vor.

Fasst man die Erkenntnisse aus den mit DEXala bzw. DEXlys und pGL3 hergestellten Komplexen zusammen so ist ein bereits ab einem N/P-Verhältnis  $\geq 2$  oder ein DS >0,69 eine fast vollständige Kondensation von Plasmid-DNA zu erreichen.

Für eine spätere Anwendung als Vektor ist jedoch zusätzlich zur Kondensation auch eine kationische Ladung des Komplexes von Vorteil, um die Interaktion mit negativ geladener Zellmembran sowie die Aufnahme in die Zelle zu begünstigen [31, 32]. Aufgrund der Ergebnisse der Voruntersuchungen (Daten nicht gezeigt) wurden für die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers und des Zetapotentials N/P-Verhältnisse von 10, 20 und 40 untersucht. Polymere deren DNA-Bindung nicht ausreichend war, nämlich die mit Glycin substituierten Dextrane sowie DEXala-0.07 und DEXala-0.21, wurden im Folgenden nicht weiter untersucht. Der hydrodynamische Durchmesser der Komplexe wurde mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung und das Zetapotential mit Hilfe der Laser-Doppler-Anemometrie bestimmt.

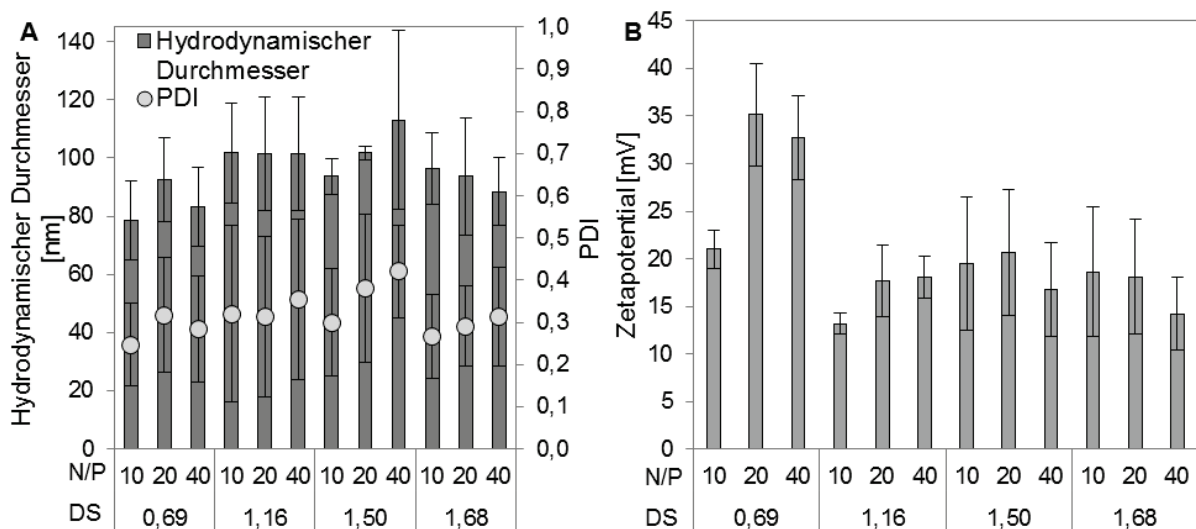


Abbildung 27: Hydrodynamischer Durchmesser und PDI (A) bestimmt mittels DLS sowie Zetapotential (B) bestimmt mittels LDA von Komplexen aus mit  $\beta$ -Alanin substituierten Dextranen mit verschiedenen Substitutionsgraden (DS) und pGL3 in N/P-Verhältnissen von 10, 20 und 40. [Mittelwert +/- Standardabweichung, n = 1, 1 Wiederholung]

Die untersuchten Komplexe aus mit  $\beta$ -Alanin oder Lysin substituierten Dextranen und pGL3 zeigten unabhängig von DS und N/P-Verhältnis hydrodynamische Durchmesser zwischen 69 +/- 7 und 113 +/- 31 nm in mono- oder bimodaler Partikelgrößenverteilung (PDI von 0,206 +/- 0,034

bis  $0,420 \pm 0,109$ ) sowie Zetapotentiale zwischen  $13,2 \pm 1,1$  und  $35,1 \pm 5,3$  mV, was ihre Eignung zum Einsatz als Vektor zum Gentransfer nahelegte. Die bimodale Partikelgrößenverteilung kann Folge von Aggregatbildung sein, was sich an einem 2. Peak der Korrelationskurve zeigte (Daten nicht gezeigt). Ein Unterschied zwischen  $\beta$ -Alanin-substituierten und Lysin-substituierten Dextranen ließ sich nicht feststellen. So lag der hydrodynamische Durchmesser der mit  $\beta$ -Alanin substituierten Dextrane zwischen  $78 \pm$  und  $113$  nm (Abbildung 27A) und für mit Lysin substituierte Dextrane zwischen  $69 \pm 7$  und  $106 \pm 26$  nm (Abbildung 28A). Das Zetapotential von  $13,2 \pm 1,1$  bis  $35,1 \pm 5,3$  mV für DEXala mit pGL3 (Abbildung 27B) lag ebenfalls auf dem Niveau der DEXlys mit pGL3 mit  $15,4 \pm 6,1 - 24,3 \pm 3,9$  mV (Abbildung 28B).

Zusammenfassend waren sowohl mit  $\beta$ -Alanin als auch mit Lysin substituierte Dextrane in der Lage mit pGL3 kationische Nanokomplexe zu formen, was eine Voraussetzung zum Einsatz als Vektor zum Gentransfer ist.

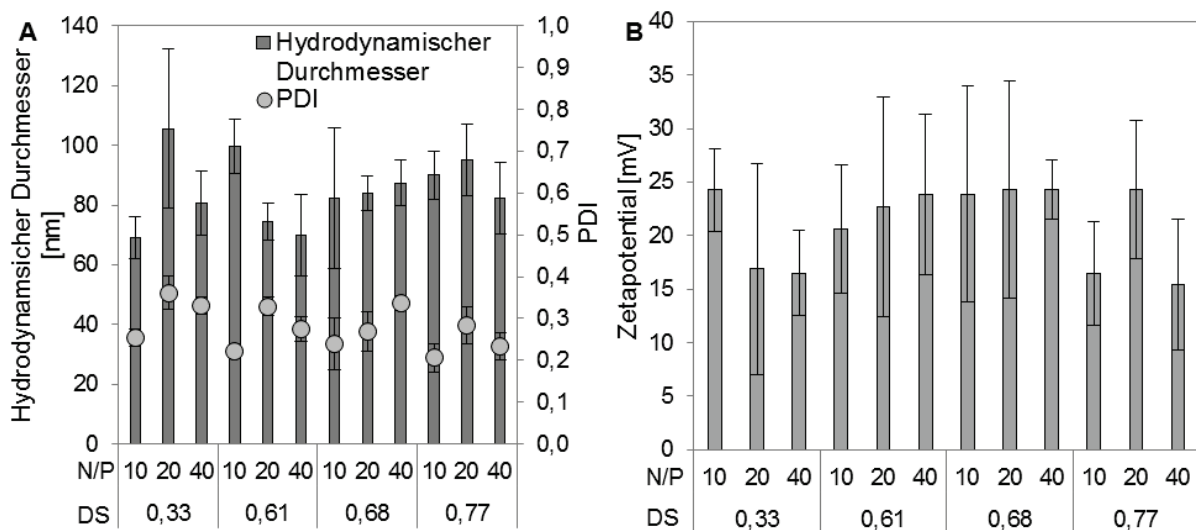


Abbildung 28: Hydrodynamischer Durchmesser und PDI (A) bestimmt mittels DLS sowie Zetapotential (B) bestimmt mittels LDA von mit Lysin substituierten Dextran mit verschiedenen Substitutionsgraden (DS) und N/P-Verhältnissen. [Mittelwert +/- Standardabweichung,  $n = 1$ , 1 Wiederholung]

Da in Blut und Zytosol Nucleasen vorkommen [10], ist eine Stabilisierung von DNA in den Komplexen essentiell für den Einsatz des Polymers als Vektor zum Gentransfer. Wie in den Gelen zu sehen (Abbildung 29A und B) zeigten unbehandeltes pGL3 und behandeltes pGL3, welches im Versuch mitlief, aber nicht mit DNase inkubiert wurde, typische Banden der supercoiled Plasmid-DNA und linearer Plasmid DNA. In Abbildung 29A ist zusätzlich die Bande der offenen zirkulären Plasmid-DNA (oberhalb der linearen pDNA) erkennbar. Im Gegensatz zu dem intakten Plasmid der unbehandelten und behandelten DNA zeigte die Kontrolle mit DNase einen Abbau der DNA, was als fehlende bzw. langgezogene undefinierte Bande im Gel erkennbar war. Beim Schutz der

DNA in den Komplexen zeigte sich in der mittels Gelelektrophorese untersuchten Stabilität gegen DNase I eine deutliche Abhängigkeit von den gewählten Aminosäure, DS und N/P-Verhältnis.

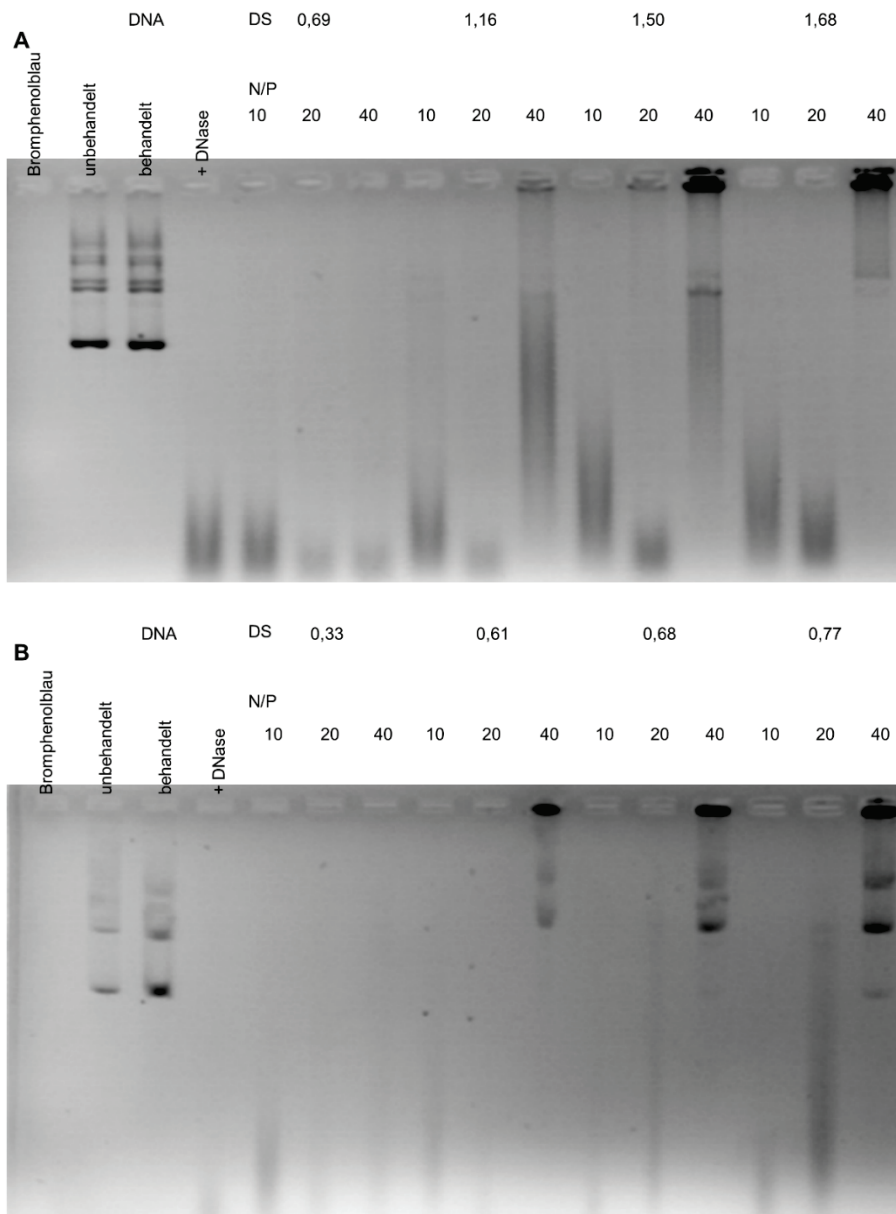


Abbildung 29: Stabilität der Komplexe aus pGL3 und mit  $\beta$ -Alanin (A) bzw. Lysin (B) substituierten Aminosäuredextranestern mit unterschiedlichen Substitutionsgraden (DS) und N/P-Verhältnissen von 10, 20 und 40 gegen enzymatischen Abbau durch DNase I. Kontrollen: Bromphenolblau = Kontrolle der Lauffront. DNA unbehandelt = Kontroll-DNA, die nicht behandelt wurde. DNA behandelt = DNA ohne Inkubation mit DNase während des Versuchsverlaufs. DNA + DNase = DNA ohne Vektor behandelt mit DNase während des Versuchsverlaufs.

So war für mit  $\beta$ -Alanin konjugierte Dextrane ab einem DS von  $\geq 1,50$  und einem N/P-Verhältnis von 40 ein Schutz der DNasen erkennbar (Abbildung 29A). Dies zeigte sich an den klar definierten, mit der unbehandelten pDNA vergleichbaren, Banden im Gel. Zusätzlich war es mit dem Einsatz von Dextransulfat nicht gelungen alle DNA aus dem Komplex zu lösen. Es war aber zu vermuten, dass die Komplexe intakt waren. Ein Nachweis fehlte, da die DNA gebunden an den Vektor in der

Tasche verblieb. Für die mit Lysin substituierten Dextrane war ebenfalls ein N/P-Verhältnis von 40 notwendig, um vor dem Abbau durch DNase I zu schützen (Abbildung 29B). Es zeigte sich bereits ab einem DS von  $\geq 0,61$  ein Schutz vor DNase I, was an den Banden im Gel und den, wie bei den Komplexen aus mit  $\beta$ -Alanin konjugierten Dextranen und pGL3, in der Tasche retardierten Komplexen erkennbar war.

Zusammenfassend waren die untersuchten Aminosäuredextranester in der Lage pGL3 vor DNase I zu schützen, wobei für Lysin ein geringerer DS an Dextran als für  $\beta$ -Alanin notwendig war. Die Untersuchung der mit  $\beta$ -Alanin oder Lysin substituierten Dextrane auf Schutz vor DNase I zeigte bei NP 40 für erstere ab einem DS  $\geq 1,50$  und für die zweite ab einem DS  $\geq 0,61$  einen Schutz vor DNasen. Zusätzlich konnte im Rahmen der Untersuchungen der physikochemischen Eigenschaften für  $\beta$ -Alanin-Dextranester mit einem DS  $\geq 0,69$  eine erfolgreiche Komplexierung und Kondensation der Plasmid-DNA ab einem N/P-Verhältnis von 0,5 sowie die Bildung von kationischen Nanokomplexen bei N/P 10, 20 und 40 nachgewiesen werden. Lysin-Dextranester zeigten ab einem N/P-Verhältnis von 2 ebenfalls erfolgreiche Komplexierung und Kondensation der DNA und auch für diese Komplexe konnte eine Größe im Nanometerbereich und eine kationische Ladung bei N/P 10, 20 und 40 festgestellt werden. Die physikochemischen Daten legten einen erfolgreichen Einsatz zur Transfektion nahe, die im Folgenden untersucht werden sollte.

#### 4.2.3 *In-vitro-Transfektionseffizienz der mit $\beta$ -Alanin bzw. Lysin substituierten Dextrane*

Für die Untersuchung der Aminosäuredextranester auf Eignung als Vektor zum Gentransfer sollte ihre Transfektionseffizienz *in vitro* getestet werden. Dazu wurden aus den Polymeren mit passenden physikochemischen Eigenschaften (Kapitel 4.2.2) und pGL3 Komplexe mit einem N/P-Verhältnis von 10, 20 und 40 gebildet. Der Überschuss an kationischen Polymer durch die gewählten N/P-Verhältnisse sollte die Interaktion mit der Zellmembran und folglich die Aufnahme in die Zelle zur Transfektion verbessern [31]. Als Vektoren fanden DEXala mit einem DS von 0,69; 1,16; 1,50 und 1,68 sowie DEXlys mit einem DS von 0,33; 0,61; 0,68 und 0,77 Anwendung. Die Zellen wurden 4 Stunden mit den Komplexen inkubiert und anschließend weitere 44 Stunden wachsen gelassen, um Zeit für Transkription und Translation der mit pGL3 transfizierten Luciferase zu geben. Bei der Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration mittels BCA-Assay kam pGL3 ohne Vektor und 150 mM Kochsalzlösung (Herstellungsmedium der Komplexe) als Negativkontrolle zum Einsatz. Im Vergleich zur Negativkontrolle zeigte sich eine Verringerung der Proteinkonzentration bei mit  $\beta$ -Alanin substituierten Dextranen abhängig vom N/P Verhältnis. So sank die Proteinkonzentration von ca. 75 - 85 % der Negativkontrolle (DNA) bei N/P 10 auf 6 - 31 % bei N/P 40 ab (Abbildung 30A). Die verringerte Synthese von Proteinen

nach Inkubation mit steigenden Polymermengen verhielt sich analog zu den Untersuchungen der Zellviabilität *in vitro* an murinen Fibroblasten (Kapitel 4.2.1).

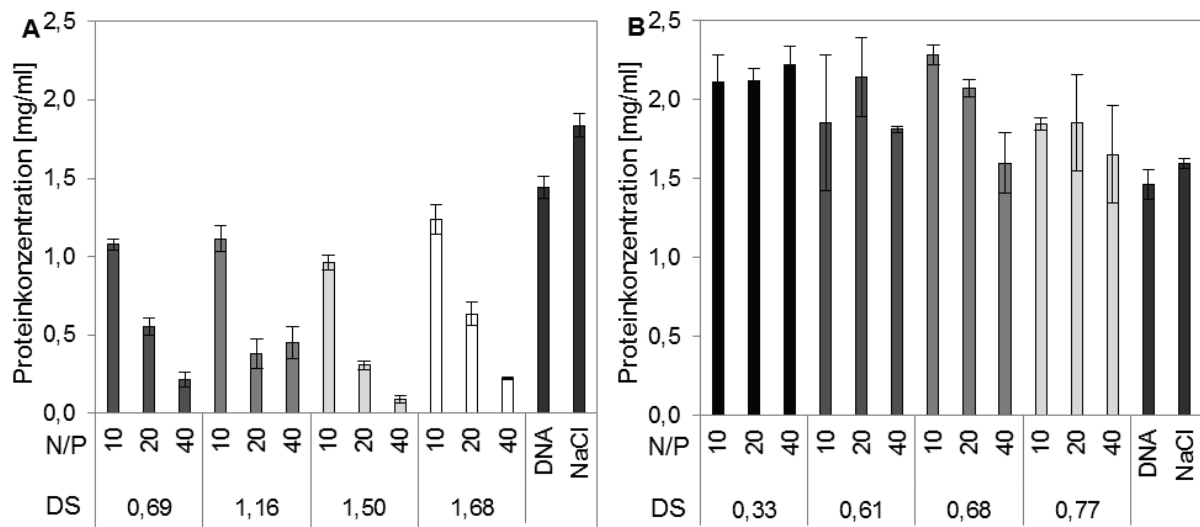


Abbildung 30: Proteinkonzentration bestimmt mittels BCA-Assay nach Behandlung der CHO-K1-Zellen mit Komplexen, aus  $\beta$ -Alanin-(A) bzw. Lysin-(B) substituierten Dextranen mit verschiedenen Substitutionsgraden (DS) und pGL3 in N/P-Verhältnissen von 10, 20 und 40 nach Transfektion für 4 Stunden und Inkubation für 44 Stunden. DNA ohne Vektor und 150 mM Kochsalzlösung als Negativkontrollen. [Mittelwert +/- Standardabweichung, n = 2]

Im Unterschied zu den mit  $\beta$ -Alanin substituierten Dextranen lag die Proteinkonzentration Lysin-substituierter Dextrane um den Faktor 1,2 – 1,6 höher als die Negativkontrolle (DNA) (Abbildung 30B). Auch war der für  $\beta$ -Alanin-substituierte Dextranester beobachtete Trend der sinkenden Proteinkonzentration mit steigendem N/P-Verhältnis lediglich für DEXlys-0.68 beobachtbar, wo bei N/P 40 die Proteinkonzentration um den Faktor 1,1 über der Negativkontrolle lag. Im Gegensatz zu DEXala zeigte DEXlys also eine Proteinkonzentration oberhalb der Negativkontrolle bei allen untersuchten DS und N/P-Verhältnissen, wohingegen die Proteinkonzentration nach Behandlung mit DEXala unterhalb der Negativkontrolle lag und mit steigendem N/P-Verhältnis sank.

Beim Auftragen der Lumineszenz geteilt durch die Proteinkonzentration (Abbildung 31) zeigte sich eine fehlende Transfektionseffizienz der DNA ohne Vektor (Negativkontrolle). Für die Transfektionseffizienz waren Unterschiede zwischen DEXala und DEXlys erkennbar. Bei DEXala lag eine starke Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von DS und N/P-Verhältnis vor. Wie in Abbildung 31A erkennbar stieg die Transfektionseffizienz für mit  $\beta$ -Alanin substituierte Dextrane mit DS  $\geq 1,50$  mit steigendem N/P-Verhältnis, während ein DS von 0,69 von  $\beta$ -Alanin an Dextran keine messbare Transfektionseffizienz zeigte. Anhand der mit steigendem N/P-Verhältnis steigenden Transfektionseffizienz ließ sich eine günstige Wirkung eines Überschusses des kationischen Polymers auf die Transfektionseffizienz feststellen. Außerdem zeigen die Daten,

dass ein DS von mindestens 1,16 war nötig, um unter den gewählten Bedingungen eine Transfektion zu erreichen. Die mit einem DS von 1,50 bzw. 1,68 substituierten  $\beta$ -Alanin-Dextranester erreichten bei N/P 40 eine Transfektionseffizienz von 26,5 % bzw. 21,7 % der Positivkontrolle (2.500 g/mol IPEI N/P 20, Daten nicht gezeigt). Im Unterschied zur Transfektionseffizienz der mit  $\beta$ -Alanin substituierten Dextrane zeigte sich bei mit Lysin substituierten Dextranen keine Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von DS oder N/P-Verhältnis (Abbildung 31B). Für alle untersuchten Lysin-Dextranester lag die Transfektion bei  $<0,02$  % der Positivkontrolle (2.500 g/mol IPEI N/P 20, Daten nicht gezeigt) und um den Faktor 360 niedriger als DEXala-1.50 bei N/P 40.

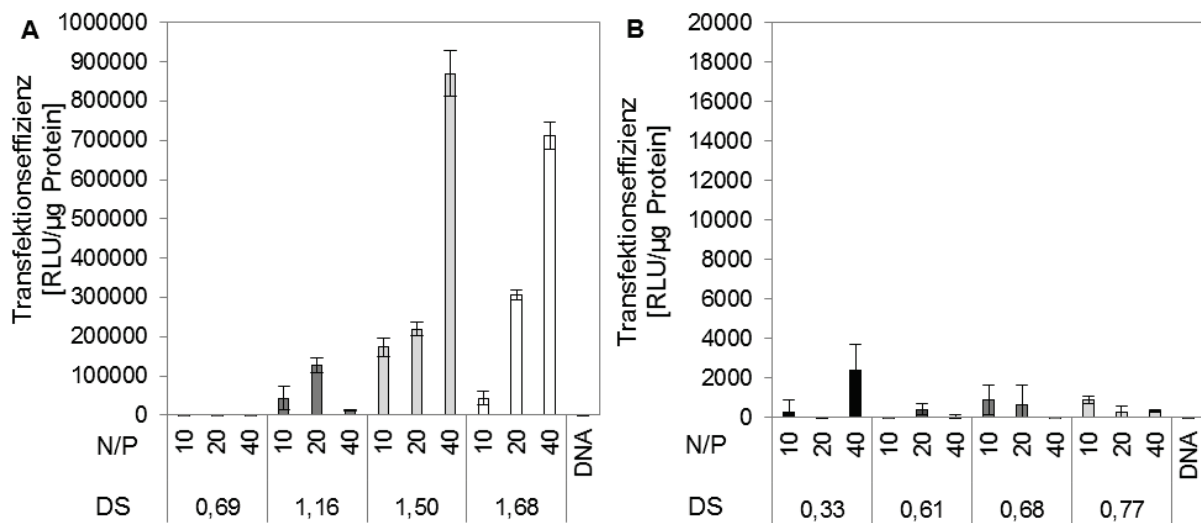


Abbildung 31: Transfektionseffizienz bestimmt als Lumineszenz des Luciferins oxidiert durch die, nach Transfektion von CHO-K1-Zellen synthetisierte, Luciferase über der Gesamtproteinmenge der Zellen. Transfektion über 4 Stunden mit Komplexen aus mit  $\beta$ -Alanin (A) oder Lysin (B) substituierten Dextranen mit verschiedenen Substitutionsgraden (DS) und pGL3 in N/P-Verhältnissen von 10, 20 und 40 und Inkubation für 44 Stunden. [Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 2$ ]

Um die Ursache für die niedrige Transfektionseffizienzen herauszufinden, wurden die mit Lysin substituierten Dextrane mit Chloroquin behandelt, da eine ungenügende Freisetzung aus dem Endosom für Poly-L-Lysin als Grund niedriger Transfektionseffizienz bekannt ist [165]. Chloroquin ist eine stark basische Substanz, welche zusammen mit den Komplexen bei Aufnahme in die Zellen im Endosom vorliegt. Dort verstärkt Chloroquin durch Pufferung des pH-Wertes im Endosom den Protonenschwammeneffekt, was nach Bindung der Wasserstoffionen zum verstärkten Nachströmen von Salzen und folglich Wasser in das Endosom und zum Platzen des Endosoms mit Freigabe der Komplexe führt [181]. Wie in Abbildung 32 zu sehen, nahm die Luciferaseexpression der mit Chloroquin und den Komplexen aus DEXlys-0,77 und pGL3 behandelten Zellen im Vergleich zu mit DEXlys-0,77 und pGL3 ohne Chloroquin behandelten Zellen deutlich zu. So stieg die Transfektionseffizienz um den Faktor 5 bei N/P 20 bis 250 bei

N/P 10. Damit erreichte DEXlys-0.77 N/P 40 3,1 % der Transfektionseffizienz der Positivkontrolle (2.500 g/mol IPEI N/P 20, Daten nicht gezeigt).

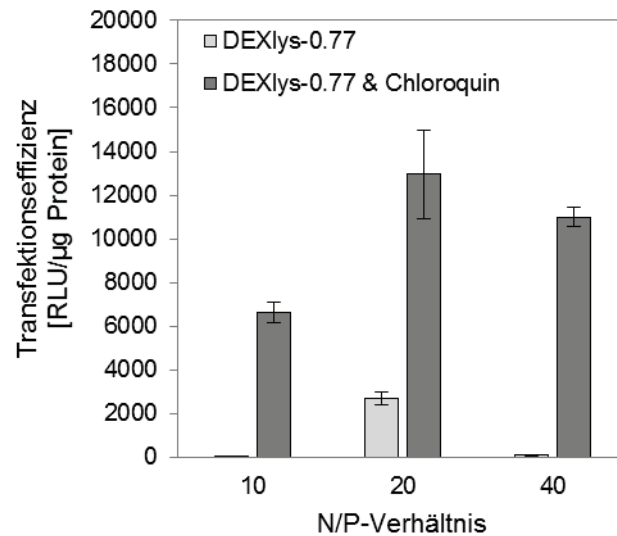


Abbildung 32: Transfektionseffizienz der mit Lysin substituierten Dextrane mit Substitutionsgraden (DS) 0,77 und N/P-Verhältnissen von 10, 20 und 40 mit und ohne Zusatz von Chloroquin nach Transfektion für 4 Stunden und Inkubation für 44 Stunden. Transfektionseffizienz berechnet als Lumineszenz von Luciferin nach Inkubation mit der, von pGL3 kodierten und von CHO-K1-Zellen synthetisierten, Luciferase über der synthetisierten Gesamtproteinmenge der Zellen. [Mittelwert +/- Standardabweichung, n = 2]

Zusammenfassend zeigten mit  $\beta$ -Alanin substituierte Dextrane eine DS und N/P-Verhältnis abhängige Transfektionseffizienz, wohingegen sich die Transfektionseffizienz von mit Lysin substituierten Dextranen unter Zugabe von Chloroquin (zur verbesserten Freisetzung aus dem Endosom) steigern ließ.

#### 4.2.4 Zusammenfassung der Untersuchungen von Dextran substituiert mit Glycin, $\beta$ -Alanin oder Lysin auf Eignung als Vektor zum Gentransfer

In dieser Studie sollte eine Bibliothek von Aminosäuren, konjugiert an Dextran, systematisch untersucht werden, um die Eignung der synthetisierten kationischen Polymere als Vektor zum Gentransfer zu prüfen. Aufgrund der Erfahrungen aus der Literatur [161-163], wo verschiedene Aminosäuren als kationische Kopfgruppe an lipophile Grundgerüste konjugiert wurden, wurden Glycin,  $\beta$ -Alanin und Lysin gewählt. Diese drei Aminosäuren unterschieden sich nicht nur durch die Stellung ihrer Aminfunktion am  $\alpha$ - (Glycin),  $\beta$ - (Alanin) bzw.  $\alpha$ - und  $\epsilon$ - (Lysin) Kohlenstoff, sondern auch durch die  $pK_a$ -Werte der Aminfunktionen, die für die  $\alpha$ -Aminfunktion von Glycin bei 7,7; die  $\beta$ -Aminfunktion von  $\beta$ -Alanin bei 8,9 und die  $\alpha$ - bzw.  $\epsilon$ -Aminfunktion von Lysin 6,8 bzw. 9,9 lagen. Über ihre Carboxylfunktion konnten die Aminosäuren über eine Esterbindung an die Hydroxylfunktionen von Dextran konjugiert und damit eine Reihe von kationischen Dextranen unterschiedlicher Substitutionsgrade synthetisiert werden. Die biologischen und physikochemischen Eigenschaften der neuen Vektoren zeigten eine Abhängigkeit von Art der

Aminosäure, DS und Polymerkonzentration. So zeigten mit Glycin substituierte Dextrane keinerlei Toxizität in den Untersuchungen. Allerdings war für sie nur eine geringfügige Kondensation von DNA feststellbar, weshalb sie für die weiteren Untersuchungen auf Eignung als Vektor ausschieden. Im Unterschied dazu waren sowohl mit  $\beta$ -Alanin als auch mit Lysin konjugierte Dextrane in der Lage DNA ab einem  $DS \geq 0,33$  fast vollständig zu kondensieren. Allerdings wiesen beide Polymere auch eine konzentrations- und DS-abhängige Reduktion der Zellviabilität ab einem  $DS \geq 0,33$  auf. Diese war für Lysin-substituierte Dextrane geringer ausgeprägt als für  $\beta$ -Alanin-substituierte. Obwohl die mit  $\beta$ -Alanin oder Lysin substituierten Dextrane mit  $DS \geq 0,33$  kationische Nanokomplexe formten, deren Größe und Ladung unabhängig von DS oder N/P-Verhältnis war, zeigten sie in der Stabilisierung der DNA gegen DNase I und der Transfektionseffizienz *in vitro* Unterschiede. So genügte mit Lysin substituierten Dextranen ein DS von  $\geq 0,61$ , um bei einem N/P-Verhältnis von 40 pGL3 vor dem Abbau durch DNase I zu schützen. Dahingegen war für  $\beta$ -Alanin-substituierte Dextrane ein DS von  $\geq 1,50$  nötig. Mit  $\beta$ -Alanin substituierte Dextrane wiesen eine vom N/P-Verhältnis abhängige Steigerung der Transfektionseffizienz ab  $DS \geq 1,50$  auf, wohingegen für die Steigerung der Transfektionseffizienz von mit Lysin substituierten Dextranen der Einsatz von Chloroquin zur Unterstützung der endosomalen Freisetzung nötig war. Zusammenfassend zeigten sich bei geringer Toxizität für  $\beta$ -Alanin an Dextran eine hohe Transfektionseffizienz und für Lysin an Dextran ein hervorragender Schutz vor DNasen. Um diese Eigenschaften in einem Vektor zum Gentransfer zu kombinieren sollte im Folgenden  $\beta$ -Alanin und Lysin an ein Dextran Grundgerüst konjugiert werden.

#### 4.3 Kombination der vorteilhaften Eigenschaften von $\beta$ -Alanin und Lysin konjugiert an Dextran zum Einsatz als Vektor zum Gentransfer

Wie im Kapitel 4.2 beschrieben, hatten Glycin,  $\beta$ -Alanin und Lysin konjugiert an Dextran unterschiedlichen Einfluss auf die Eigenschaften des Vektors. Besonders herausragend waren dabei die hohe Transfektionseffizienz der mit  $\beta$ -Alanin substituierten sowie der Schutz vor DNasen von mit Lysin substituierten Dextranen. Aus diesem Grund wurden für die folgenden Versuche sowohl  $\beta$ -Alanin als auch Lysin mit unterschiedlichen DS (Kapitel 3.1, Tabelle 6) an ein Dextran Grundgerüst konjugiert und diese neuen „gemischten“ Aminosäuredextranester auf ihre Eignung als Vektor zum Gentransfer untersucht. Um den Einfluss der beiden Aminosäuren an Dextran zu untersuchen wurde ausgehend von einem DS von 0,42 für  $\beta$ -Alanin zwei weitere Vektoren (DEXala-0.68 lys-0.19 und DEXala-0.99 lys-0.16) mit steigendem DS für  $\beta$ -Alanin von 0,68 bzw. 0,99 an Dextran synthetisiert, wobei der DS von Lysin ausgehend von 0,21 mit 0,19 bzw. 0,16 annähernd konstant blieben. Zum Vergleich wurden ebenfalls zwei Polymere mit



steigendem DS von Lysin synthetisiert. Der DS von Lysin lag, wie bereits erwähnt am ersten Polymer (DEXala-0.42 lys-0.21) bei 0,21 und an den beiden weiteren Derivaten (DEXala-0.43 lys-0.39 und DEXala-0.37 lys-0.53) bei 0,39 bzw. 0,53, wohingegen der DS von  $\beta$ -Alanin mit 0,43 bzw. 0,37 annähernd konstant blieb. Anhand dieser verschiedenen DS sollte der Einfluss der einzelnen Aminosäure kombiniert an einem Grundgerüst untersucht werden, mit dem Ziel die positiven Eigenschaften beider Aminosäuren, wie niedrige Toxizität, Schutz vor DNase und hohe Transfektionseffizienz zu kombinieren.

#### 4.3.1 Untersuchung der Toxizität von mit $\beta$ -Alanin und Lysin substituierten Dextranen an murinen Fibroblasten und Erythrozyten *in vitro*

Um den Einfluss der mit  $\beta$ -Alanin und Lysin substituierten Dextrane auf die Viabilität von Zellen für eine spätere Anwendung *in vivo* abzuschätzen, sollte, wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben, ihr Verhalten an murinen Fibroblasten und Erythrozyten *in vitro* untersucht werden. In der Untersuchung der Zellviabilität an L929 murinen Fibroblasten zeigte das als Positivkontrolle verwendete Thiomersal zeigte keine Viabilität der behandelten Zellen (Daten nicht gezeigt). Bei der Untersuchung der Toxizität konnte ein Verhalten analog zu den monosubstituierten Dextranestern beobachtet werden. Dabei hatte der Lysinanteil der Mischester einen günstigen Einfluss auf die Viabilität der Polymere während mit steigendem DS und Polymerkonzentration und insbesondere mit steigendem Anteil an  $\beta$ -Alanin die Zellviabilität sank (Abbildung 33).

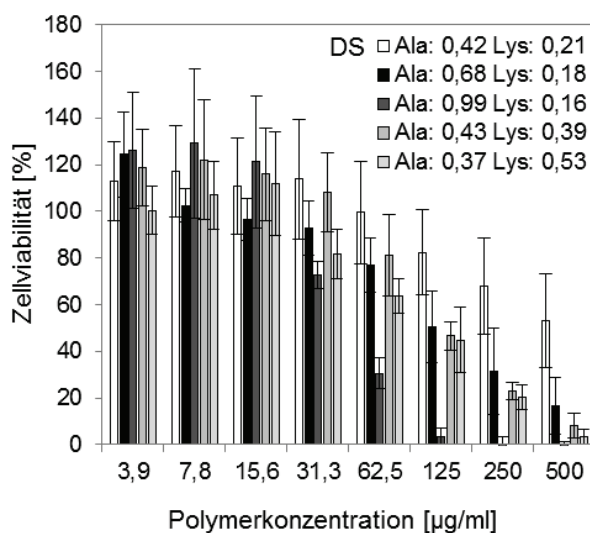


Abbildung 33: Viabilitätsuntersuchung *in vitro* von mit  $\beta$ -Alanin und Lysin substituierten Dextranen an L929 murinen Fibroblasten mit verschiedenen Substitutionsgraden (DS) und Konzentrationen. Zellviabilität bestimmt mittels MTT-Assay nach 24-stündiger Behandlung der Zellen mit den Polymeren. Zellviabilität berechnet in Prozent der mit reinem medium behandelten Negativkontrolle [Mittelwert +/- Standardabweichung, n = 7, 1 Wiederholung]

So fiel die mittels MTT-Assay getestete Zellviabilität von DEXala-0.99 lys-0.16 bei einer Konzentration von 62,5 µg/ml unter die nach DIN EN ISO 10993-5 festgelegte Grenze von 70 %

Viabilität für untoxische Substanzen (Abbildung 33) ab. Dabei verhielt sich das Polymer in Bezug auf die Toxizität an L929 murinen Fibroblasten wie DEXala-1.16 (Kapitel 4.2.1, Abbildung 20B), welches einen annähernd gleichen Gesamt-DS hatte. Vergleich man wiederum die mit reinem  $\beta$ -Alanin substituierte Probe DEXala-0.69, deren DS annähernd dem von DEXala-0.42 lys-0.21 gleichkam, so fiel die geringere Toxizität des Mischesters auf, die erst bei einer Konzentration von 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  als toxisch nach DIN EN ISO 10993-5 einzustufen war, während DEXala-0.69 bereits bei 62,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (DEXala, Kapitel 4.2.1, Abbildung 20B) in diese Kategorie fiel. Dies wies auf einen günstigen Einfluss des Lysinanteils im Mischester auf die Zellviabilität hin, der für DEXala-0.99 lys-0.16 vermutlich zu niedrig war, um sich günstig auf die Zellviabilität auszuwirken. Ähnlich der mit Lysin substituierten Proben (DEXlys, Kapitel 4.2.1, Abbildung 20C) sank auch für die Mischester mit hohem Lysinanteil (DEXala-0.43 lys-0.39 und DEXala-0.37 lys-0.53) die Viabilität erst bei einer Konzentration von 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$  unter die 70 % Grenze, was ebenfalls den günstigen Einfluss von Lysin in Kombination mit  $\beta$ -Alanin substituiert an Dextran bewies.

Da eine intravenöse Applikation des Vektors Ziel der Entwicklung war, war die Untersuchung des Einflusses der mit  $\beta$ -Alanin und Lysin substituierten Dextrane auf Erythrozyten wichtig, da sie den größten Anteil der im Blut vorkommenden Zellen ausmachen. Die Aggregation roter Blutzellen wurde nach zweistündiger Inkubation der Erythrozyten mit  $\beta$ -Alanin- und Lysin-substituierten Dextranen bestimmt.

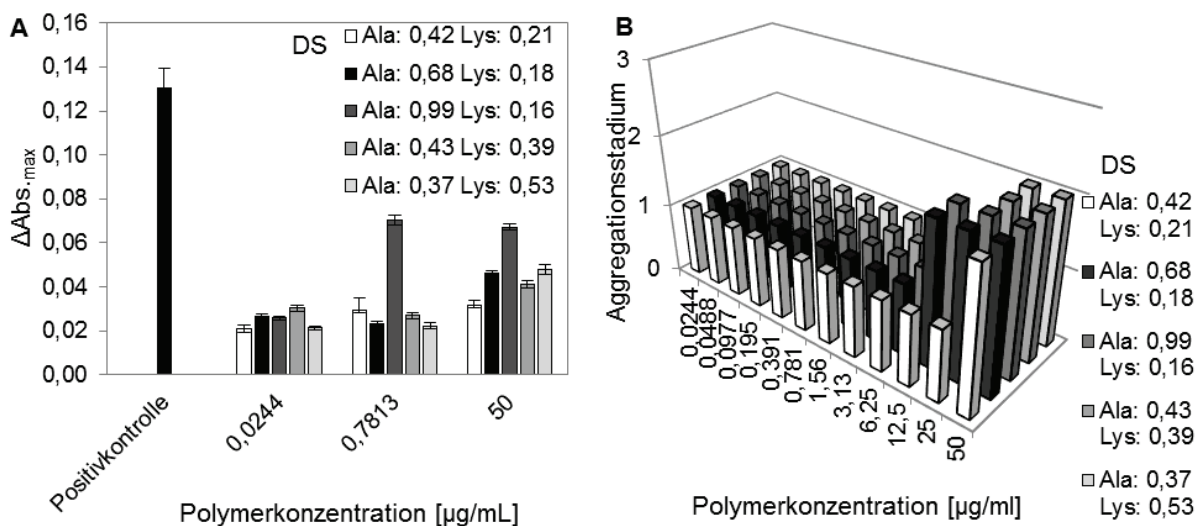


Abbildung 34: Beurteilung der Aggregation roter Blutzellen nach zweistündiger Behandlung mit  $\beta$ -Alanin- und Lysin-substituierten Dextranen mit verschiedenen Substitutionsgraden (DS) und Polymerkonzentrationen. (A) Darstellung der Aggregation mittels Absorptionsmessung bei 645 nm und anschließender Berechnung des  $\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$  durch Abzug der Absorption nach Behandlung mit Polymeren von der Absorption der Negativkontrolle (PBS). Positivkontrolle = 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  25.000 g/mol bPEI. [Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 6$ , 1 Wiederholung] (B) Makroskopische Beurteilung der Aggregation roter Blutzellen und Einteilung in Aggregationsstadien (1 = leichte Aggregation - 3 = starke Aggregation)

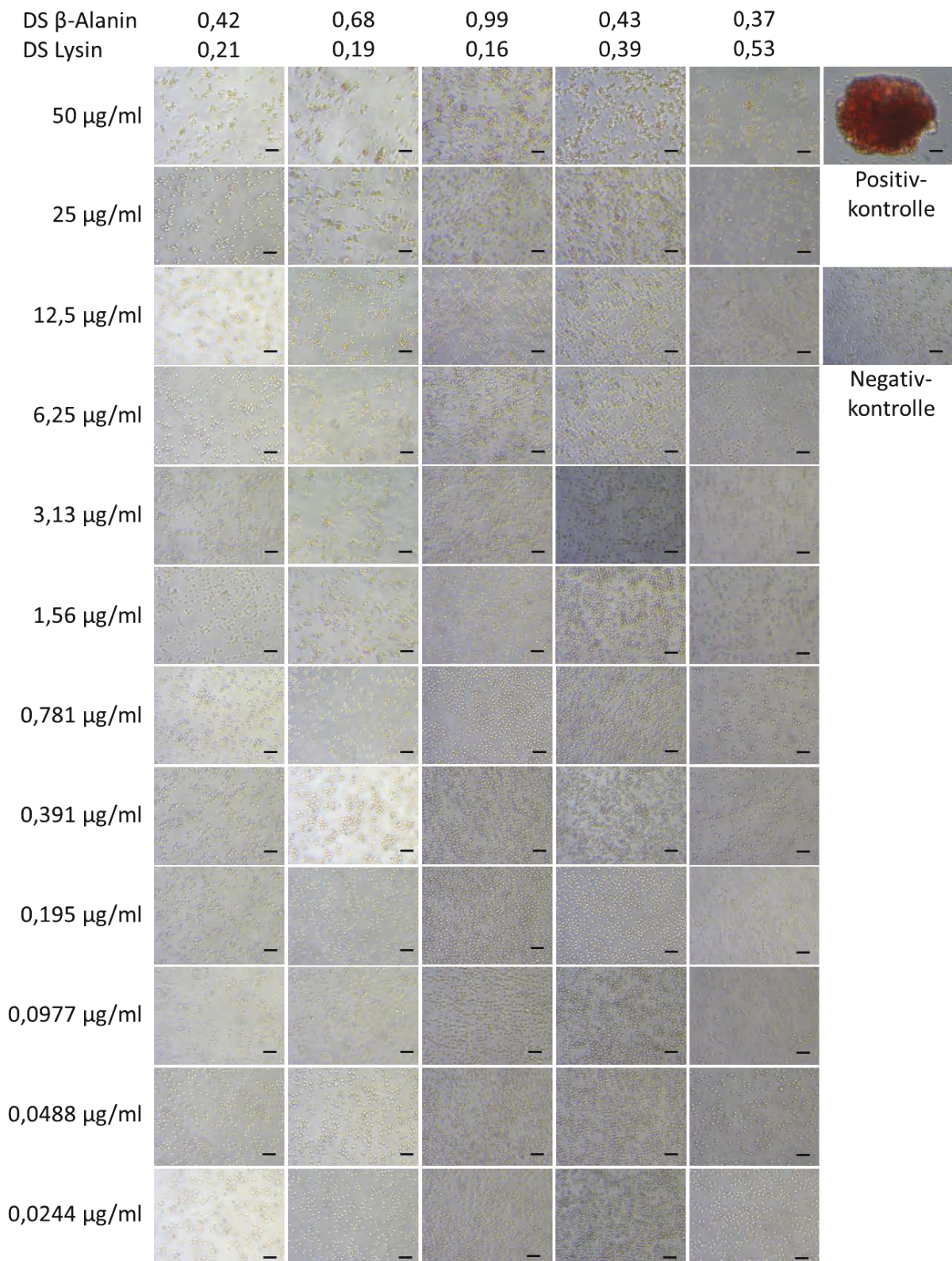


Abbildung 35: Mikroskopische Aufnahmen der Erythrozyten nach zweistündiger Behandlung mit Aminosäuredextranestern substituiert mit  $\beta$ -Alanin und Lysin mit verschiedenen Substitutionsgraden und Polymerkonzentrationen. Negativkontrolle = PBS. Positivkontrolle = 30  $\mu\text{g/ml}$  25.000 g/mol bPEI. [Balkenlänge = 20  $\mu\text{m}$ ]

Während die Positivkontrolle bestehend aus 25.000 g/mol bPEI eine starke Aggregation (Stadium 3, Abbildung 34 und Abbildung 35) verursachte, war für die

Negativkontrolle keine Aggregation mess- und erkennbar (Stadium 3, Abbildung 34B und Abbildung 35). Eine Aggregation roter Blutzellen konnte einem hohen  $\beta$ -Alanin-Anteil zugeordnet werden (Abbildung 34A&B und Abbildung 35). Allerdings fiel hier die Aggregation geringer aus als die der  $\beta$ -Alanin-substituierten Dextranen (Kapitel 4.2.1, Abbildung 21B und Abbildung 22). So erreichte keiner der Mischester ein Aggregationsstadium 3 und ein Unterschied zwischen den Mischestern mit einem höheren DS an  $\beta$ -Alanin (DEXala-0.68 lys-0.19 und DEXala-0.99 lys-0.16) war lediglich an einem beginnenden Stadium 2 ab einer Konzentration von 12,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  im Gegensatz zu 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  für DEXala-0.42-lys-0.21, DEXala-0.43 lys-0.39 und DEXala-0.37 lys-0.53 erkennbar. Dies war auch an den geringen  $\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$ -Werten ersichtlich, die für DEXala-0.42-lys-0.21, DEXala-0.43 lys-0.39 und DEXala-0.37 lys-0.53 um den Faktor 3 niedriger als die Positivkontrolle lagen. Einzig DEXala-0.99 lys-0.16 lag um den Faktor 2 niedriger als die Positivkontrolle. Dies war im Vergleich zu den mit  $\beta$ -Alanin substituierten Dextranen, die die gleichen  $\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$ -Werte wie die Positivkontrolle zeigten (Kapitel 4.2.1, Abbildung 21B), gering. Wie auch bei der Untersuchung der Toxizität an L929 murinen Fibroblasten zeigte sich hier ein günstiger Einfluss des Lysins im mit  $\beta$ -Alanin und Lysin substituierten Aminosäuredextranester.

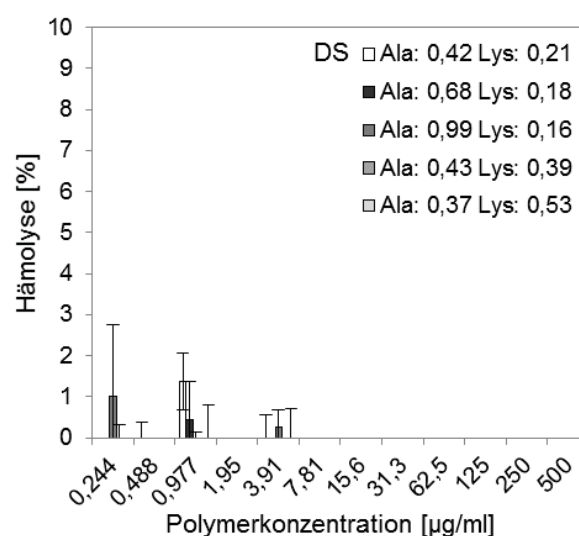


Abbildung 36: Lyse roter Blutzellen nach einstündiger Behandlung mit Polymeren verschiedener Konzentrationen in Prozent der Positivkontrolle. Zellen behandelt mit Dextranen mit verschiedenen Substitutionsgraden (DS) von  $\beta$ -Alanin und Lysin. Positivkontrolle = Triton-X 100 1%. [Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 6$ , 1 Wiederholung]

Um die mögliche Lyse von Erythrozyten zu untersuchen, wurden diese, wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben, über eine Stunde mit den  $\beta$ -Alanin- und Lysin-substituierten Dextranen behandelt. Zur Auswertung wurde die Hämolyse in Prozent der Positivkontrolle (Triton-X 100) nach Messung des aus lysierten Erythrozyten freigesetzten Hämoglobins bei 544 nm berechnet. Das als Negativkontrolle verwendete PBS zeigte keinerlei Lyse roter Blutzellen (Daten nicht gezeigt). Eine hämolytische Eigenschaft der gemischten Ester war, wie auch bei den mit Glycin,  $\beta$ -Alanin oder



Lysin substituierten Dextranen (Kapitel 4.2.1, Abbildung 25), nicht erkennbar (Abbildung 36). Alle gemessenen Absorptionen berechneten sich zur Negativkontrolle mit <2 %, was nach ASTM F756-08 [174] nicht-hämolytische Substanzen bezeichnet.

Zusammenfassend zeigte die Untersuchung des Einflusses der mit  $\beta$ -Alanin und Lysin substituierten Dextrane auf die Viabilität einen positiven Einfluss des Lysinanteils. So konnte zwar an den murinen Fibroblasten wie auch bei den bereits untersuchten Aminosäuredextranestern (Kapitel 4.2.1, Abbildung 20) eine sinkende Viabilität der Zellen mit steigendem DS und Polymerkonzentration erkannt werden. Allerdings zeigte sich, dass die nach DIN EN ISO 10993-5 festgelegte Grenze von 70 % Viabilität für untoxische Substanzen bei höheren Polymerkonzentrationen unterschritten wurde, wenn Lysin zusätzlich zum  $\beta$ -Alanin mit Dextran konjugiert wurde. Auch bei der Untersuchung der Erythrozytenaggregation für mit  $\beta$ -Alanin und Lysin substituierten Dextrane war lediglich eine Aggregation Stadium 2 bei Polymerkonzentrationen bis 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  erkennbar. Im Unterschied dazu zeigten mit  $\beta$ -Alanin substituierte Vektoren mit vergleichbarem DS, aber ohne Lysinanteil, bereits Blutaggregation Stadium 3 (Kapitel 4.2.1, Abbildung 24).

#### 4.3.2 Untersuchung der Kondensation, Größenreduktion und des Schutzes vor DNasen von Plasmid-DNA durch $\beta$ -Alanin- und Lysin-substituierte Dextrane

Zur Untersuchung der Komplexe auf unkondensierte DNA wurden Komplexe aus Aminosäuredextranestern mit pGL3 im N/P-Verhältnis von 0,5 bis 40 gebildet und mittels AccuBlue<sup>TM</sup>-Assay analysiert.

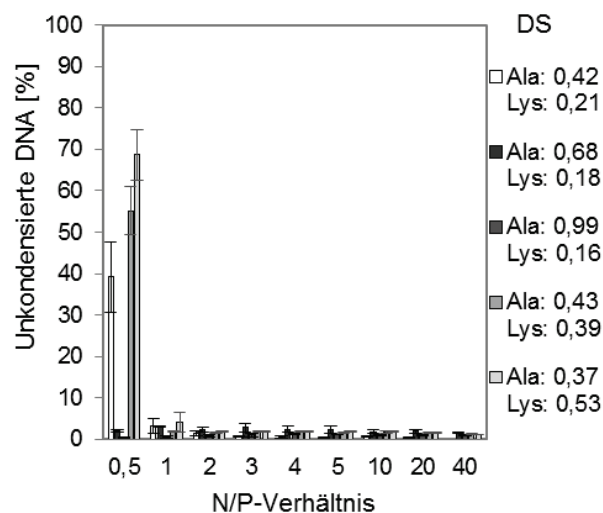


Abbildung 37: Untersuchung der Komplexe aus pGL3 und mit  $\beta$ -Alanin (Ala) und Lysin (Lys) substituierten Dextranen mit verschiedenen Substitutionsgraden (DS) und N/P-Verhältnissen auf unkondensierte DNA mittels AccuBlue<sup>TM</sup>-Assay. Unkondensierte DNA berechnet in Prozent der Negativkontrolle (Plasmid DNA (pGL3) ohne Vektor). [Mittelwert +/- Standardabweichung, n = 3, 1 Wiederholung]

Dies zeigte eine fast vollständige Kondensation der DNA in den Komplexen ab einem N/P-Verhältnis von eins (Abbildung 37). Analog zu der Untersuchung von mit  $\beta$ -Alanin substituierten Dextranen (Kapitel 4.2.2, Abbildung 26B) zeigte ein  $DS \geq 0,68$  von  $\beta$ -Alanin an den mit  $\beta$ -Alanin und Lysin substituierten Dextranen bereits bei N/P-Verhältnis von 0,5 weniger als 2 % unkondensierte DNA. Bei niedrigerem DS von  $\beta$ -Alanin an Dextran zeigte sich ähnlich, wie bei mit Lysin substituierten Dextranen (Kapitel 4.2.2, Abbildung 26C) eine unvollständige Kondensation der DNA. So lag bei N/P 0,5  $\geq 39$  % DNA unkondensiert vor. Die fast vollständige Kondensation von Plasmid-DNA war demzufolge abhängig vom Substitutionsgrad der Aminosäuren im Komplex und wurde bei einem DS von  $\beta$ -Alanin  $\geq 0,68$  bereits bei N/P 0,5 und bei geringerem DS  $\beta$ -Alanin ab N/P 1 erreicht.

Da für die elektrostatische Interaktion mit der Zelloberfläche zur Aufnahme in die Zelle eine kationische Ladung des Komplexes aus pGL3 und mit  $\beta$ -Alanin und Lysin substituierten Dextranen vom Vorteil war, wurden für die folgenden Untersuchungen Komplexe mit N/P 10, 20 und 40 hergestellt. Zur Untersuchung des hydrodynamischen Durchmessers und des Zetapotentials wurde deionisiertes Wasser verwendet, um Einflüsse der Ionenstärke des Lösungsmittels auszuschließen. Die Messung des hydrodynamischen Durchmessers erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuung und die des Zetapotentials mittels Laser-Doppler-Anemometrie. Weder der hydrodynamische Durchmesser der Komplexe aus mit  $\beta$ -Alanin und Lysin substituierten Dextranen und pGL3 (Abbildung 38A) noch das Zetapotential (Abbildung 38B) zeigten Abhängigkeiten vom DS der beiden Aminosäuren noch dem N/P-Verhältnis.

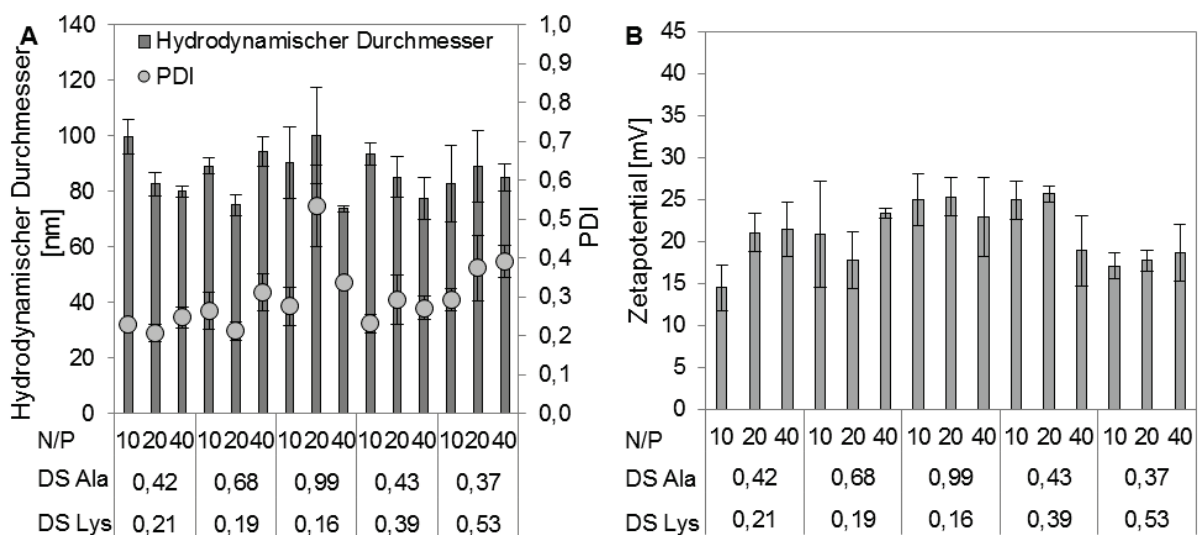


Abbildung 38: Hydrodynamischer Durchmesser und PDI (A) bestimmt mittels dynamischer Lichtstreuung sowie Zetapotential (B) bestimmt mittels Laser-Doppler-Anemometrie von Komplexen aus mit  $\beta$ -Alanin (Ala) und Lysin (Lys) substituierten Dextranen mit verschiedenen Substitutionsgraden (DS) und pGL3 in N/P-Verhältnissen von 10, 20 und 40. [Mittelwert +/- Standardabweichung, n = 1, 1 Wiederholung]

Alle untersuchten Polymere waren in der Lage Komplexe mit positiver Oberflächenladung und Größen im Bereich von 75 +/- 4 bis 100 +/- 17 nm zu bilden. Die PDI der Komplexe zeigte mono- bis bimodale Partikelgrößenverteilungen an und lagen zwischen 0,208 +/- 0,022 und 0,391 +/- 0,042. Eine Ausnahme bildete DEXala-0.99 lys-0.16 bei N/P20, das mit einem PDI von 0,534 +/- 0,106 eine multimodale Partikelgrößenverteilung zeigte. Das Zetapotential der Komplexe lag zwischen 16,0 +/- 7,8 und 27,1 +/- 2,8 mV, was eine Grundvoraussetzung für die Interaktion mit der Zelloberfläche und der daraus folgenden Transfektion war. Wie bei der Untersuchung der mit  $\beta$ -Alanin oder Lysin substituierten Dextrane auf physikochemische Eigenschaften der Komplexe (Kapitel 4.2.2) zeigten auch die mit  $\beta$ -Alanin und Lysin substituierten Dextrane die Fähigkeit kationische Nanokomplexe zu formen.

Zur Untersuchung der Komplexe auf Stabilisierung des pGL3 wurden die Komplexe analog zur späteren Untersuchung der Transfektionseffizienz mit einem N/P von 10, 20 und 40 hergestellt. Zur Kontrolle des Versuchs wurde zusätzlich unbehandelte DNA und behandelte DNA, die den Versuch ohne Inkubation mit DNase I durchlief, aufgetragen (Abbildung 39). Beide zeigten die typischen Banden der supercoiled DNA (untere Bande) und linearen DNA (obere Bande) im Gel.

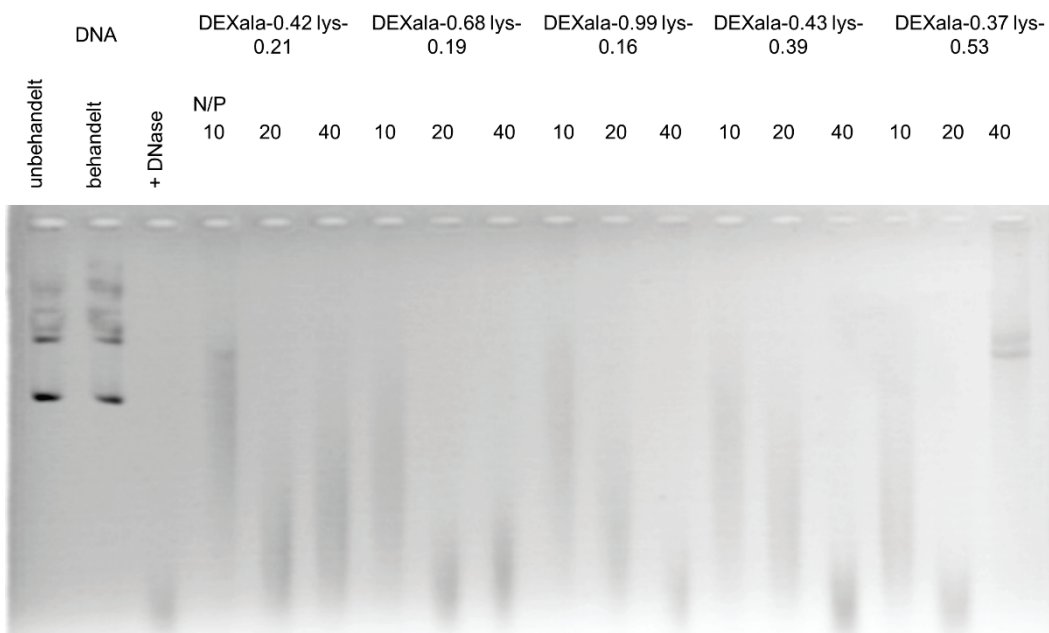


Abbildung 39: Stabilität der Komplexe aus pGL3 und  $\beta$ -Alanin- und Lysin-substituierten Dextranen mit unterschiedlichen Substitutionsgraden und N/P-Verhältnissen von 10 und 20 gegen enzymatische Abbau durch DNase I. Kontrollen: Bromphenolblau = Kontrolle der Lauffront im Gel. DNA unbehandelt = Kontroll-DNA, die nicht behandelt wurde. DNA behandelt = DNA ohne Inkubation mit DNase während des Versuchsverlaufs. DNA + DNase = DNA ohne Vektor behandelt mit DNase während des Versuchsverlaufs.

Als Positivkontrolle diente DNA ohne Vektor, die im Gel keine Banden mehr zeigte, sondern lediglich Abbauprodukte der Plasmid-DNA am unteren Rand des Gels. Bei der Untersuchung der Komplexe zeigte sich erneut eine Korrelation zu den mit einer Art Aminosäuren substituierten

Dextranen. So konnte für DEXala-0.37 lys-0.53 bei N/P 40 ein Schutz vor DNasen anhand von 2 definierten Banden im Gel festgestellt werden (Abbildung 39), was die Bedeutung des Lysin für den Schutz vor DNase in den Komplexen aus Mischestern und pGL3 hervorhebt. Dieses Verhalten zeigte sich analog zu den Untersuchungen von Komplexen aus pGL3 und DEXala (Kapitel 4.2.2, Abbildung 29A) bzw. DEXlys (Kapitel 4.2.2, Abbildung 29B), wo mit Lysin substituiertes Dextran mit einem DS  $\geq 0,61$  bei N/P 40 einen Schutz vor DNase I zeigte, während für DEXala ein höherer DS von 1,50 nötig war. Bei den gemischten Estern mit  $\beta$ -Alanin und Lysin schien der DS von 0,53 für Lysin ausreichend. Die Aminosäuredextranester mit niedrigerem N/P-Verhältnis und Substitutionsgrad an Lysin zeigten einen unzureichenden Schutz vor DNasen, was an den fehlenden definierten Banden zu erkennen war.

Zusammenfassend zeigten die untersuchten physikochemischen Eigenschaften ähnlich des Einflusses auf die Biokompatibilität einen Einfluss der substituierten Menge der jeweiligen Aminosäure am Dextran. So konnte, wie auch bei den mit  $\beta$ -Alanin substituierten Dextranen, für  $\beta$ -Alanin- und Lysin-substituierte Dextrane mit einem DS von  $\beta$ -Alanin  $\geq 0,68$  eine hervorragende Kondensation des pGL3 mit weniger als 2 % unkondensierter DNA bereits bei einem N/P-Verhältnis von 0,5 festgestellt werden. Ab einem N/P von eins waren für alle untersuchten Komplexe weniger als 2 % unkondensierte DNA messbar. Die synthetisierten Aminosäuredextranester waren alle in der Lage kationische Nanokomplexe zu bilden. Der Schutz vor DNasen zeigte, wie schon bei den mit nur einer Aminosäure substituierten Dextranen, eine Abhängigkeit vom Lysinanteil. So war bereits bei einem DS von Lysin von 0,53 an Dextran ein Schutz vor DNase erkennbar.

#### *4.3.3 Abhängigkeit der Transfektionseffizienz der $\beta$ -Alanin- und Lysin-substituierten Dextrane mit pGL3 in vitro vom Substitutionsgrad der Aminosäuren*

Um die mit  $\beta$ -Alanin und Lysin substituierten Dextrane auf ihre Eignung als Vektor zum Gentransfer zu untersuchen, sollte die Transfektionseffizienz *in vitro* an CHO-K1-Zellen untersucht werden. Die Komplexe aus pGL3 und den  $\beta$ -Alanin- und Lysin-substituierten Dextranen wurden mit N/P 10, 20 und 40 hergestellt und die Transfektion erfolgte über 48 h. Die Negativkontrolle (nicht komplexierte DNA) zeigte keine Transfektionseffizienz. Bei der Untersuchung der Transfektionseffizienzen der Komplexe traten die im Kapitel 4.2 untersuchten Eigenschaften der Aminosäuren auch in den Mischestern aus  $\beta$ -Alanin- und Lysin-substituierten Dextranen auf (Abbildung 40). So zeigte sich für DEXala-0.68 lys-0.19 und DEXala-0.99 lys-0.16 der auch für die mit  $\beta$ -Alanin substituierten Dextrane (Kapitel 4.2.3, Abbildung 30A) typische Abfall der Proteinkonzentration mit steigendem N/P-Verhältnis, der für DEXala-0.42 lys-0.21, DEXala 0.43 lys-0.39 und DEXala-0.37 lys-0.53 weniger ausgeprägt war (Abbildung 40A). Der



Einfluss des  $\beta$ -Alanin zeigte sich bei der Transfektionseffizienz besonders deutlich (Abbildung 40B). So stieg die Transfektionseffizienz mit steigendem N/P-Verhältnis z. B. für DEXala-0.42 lys-0.21 und DEXala-0.99 lys-0.16 von N/P 10 auf N/P 40 um den Faktor 3,5 an. Die höchste Transfektionseffizienz wurde mit DEXala-0.99 lys-0.16 bei N/P 40 erreicht und lag um den Faktor 14,0 höher als die mit einem hohen Anteil an Lysin substituierten Dextrane (DEXala-0.43 lys-0.39 und DEXala-0.37 lys-0.53). Diese wiesen wie auch Lysin-substituierte Dextranester (Kapitel 4.2.3, Abbildung 31) keinen steigenden Trend der Transfektionseffizienz mit steigendem DS oder N/P-Verhältnis auf.

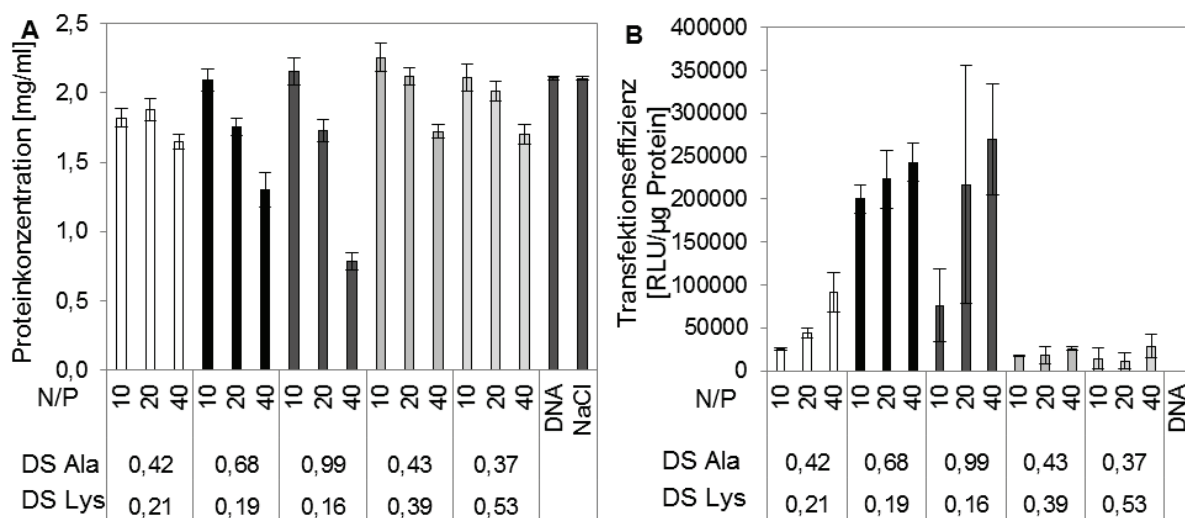


Abbildung 40: (A) Proteinkonzentration ermittelt mittels BCA-Assay und (B) Transfektionseffizienz dargestellt als Lumineszenz von Luciferin oxidiert durch die, von pGL3 kodierte und von den Zellen synthetisierten, Luciferase. Transfektion durch mit  $\beta$ -Alanin (Ala) und Lysin (Lys) substituierten Dextrane mit verschiedenen Substitutionsgraden (DS) und N/P-Verhältnissen von 10, 20 und 40 nach Transfektion für 4 Stunden und Inkubation für 44 Stunden. [Mittelwert +/- Standardabweichung, n = 2]

#### 4.3.4 Gezielte Steuerung der Eigenschaften des Vektors durch Konjugation von $\beta$ -Alanin und Lysin an ein Dextran Grundgerüst

Die im Kapitel 4.2 untersuchten Eigenschaften der Aminosäuren  $\beta$ -Alanin und Lysin spiegeln sich in den Mischestern aus  $\beta$ -Alanin- und Lysin-substituierten Dextranen wieder. So zeigte auch hier Lysin ab einem DS von 0,53 Schutz vor DNasen und einen geringen Einfluss auf die Viabilität der Zellen, wohingegen der Einfluss von  $\beta$ -Alanin auf die Viabilität moderat war und sich eine Steigerung der Transfektionseffizienz mit steigendem  $\beta$ -Alanin-Anteil nachweisen ließ. Den Aminosäuren konjugiert an Dextran war unabhängig von DS und N/P-Verhältnis gemeinsam, DNA zu binden und zu kationischen Komplexen mit ca. 100 nm hydrodynamischen Durchmesser zu verpacken, was ihre Eignung für den Einsatz als Vektor zum Gentransfer zeigte. In ihrer Kombination war es möglich die Eigenschaften von  $\beta$ -Alanin und Lysin konjugiert an Dextran zu vereinen und einen Vektor zu schaffen, der sich durch niedrige Toxizität auszeichnete und sich je

nach Bedarf mit einem gesteigerten Schutz vor DNasen, gesteuert durch den Lysinanteil, und einer gesteigerten Transfektionseffizienz, gesteuert durch den  $\beta$ -Alaninanteil, ausstatten ließ.

#### 4.4 Lagerstabilität der Komplexe

##### 4.4.1 Untersuchung des Einflusses verschiedener Lagerbedingungen auf die physikochemischen Eigenschaften der Komplexe sowie ihre Transfektionseffizienz

Für eine spätere Anwendung als Vektor zum Gentransfer *in vitro* und *in vivo* sollte das Gentherapeutikum, also der Vektor und die zu transfizierende DNA, nach der Herstellung möglichst lang stabil sein, um es bei Bedarf direkt anzuwenden und nicht frisch herstellen zu müssen. Für Komplexe ist die Lagerstabilität für eine Anwendung als pharmazeutisches Produkt essentiell. Da die Herstellung der Komplexe meist in einem wässrigen Medium erfolgt, sind die Formulierungen anfällig für mikrobielle Kontamination. Dies stellt vor allem ein Problem dar, da Dextran von verschiedenen Bakterien abgebaut werden kann (Kapitel 1.4). Außerdem ist aus der Literatur bekannt, dass die Komplexe nicht lange stabil bleiben, da sie aus Gründen der thermodynamischen Stabilität eine Verringerung ihrer Oberfläche anstreben und aggregieren [182, 183]. Deshalb sollten im Folgenden Möglichkeiten der Stabilisierung untersucht werden.

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Stabilisierungsmethoden wurden Komplexe mit N/P 10, 20 bzw. 40 aus DEXala-1.50 bzw. DEXala-0.99 lys-0.16 hergestellt. Diese N/P-Verhältnisse wurden gewählt, da in den vorangegangenen Untersuchungen (Kapitel 4.2 und 4.3) damit die besten Ergebnisse bezüglich Transfektion erzielt wurden und auch die Kondensation der DNA und die Bildung kationischer Nanokomplexe im bevorzugten Größenbereich von 20 bis 200 nm gegeben waren. Zum Vergleich wurden die Komplexe vor und nach der Stabilisierung auf ihren hydrodynamischen Durchmesser untersucht. Hierfür wurde die dynamische Lichtstreuung verwendet. Zusätzlich sollte die Transfektionseffizienz stabilisierter und rekonstituierter Komplexe mit frisch hergestellten Komplexen verglichen werden. Dafür wurden analog zu den Experimenten im Kapitel 4.1.3 verfahren.

In einem ersten Versuch wurden die Komplexe bei  $-20\text{ °C}$  tiefgefroren. Dies stellte einerseits eine sehr einfache Methode der Lagerung dar, da sie mit keinem zusätzlichen technischen Aufwand (wie z. B. die Gefriertrocknung) verbunden war. Außerdem wurde diese Methode in verschiedenen Publikationen bereits erfolgreich zur Stabilisierung von Komplexen aus Polymer und Nukleinsäure angewandt [183, 184]. Nach Lagerung der Komplexe über 24 Stunden bei  $-20\text{ °C}$  wurden sie aufgetaut und untersucht.

Nach dem Auftauen der Komplexe aus DEXala-1.50 bzw. DEXala-0.99 lys-0.16 mit pGL3 ließ sich der hydrodynamische Durchmesser der rekonstituierten Komplexe nicht bestimmen, da mittels dynamischer Lichtstreuung keine Korrelation der Brownschen Bewegung gemessen werden konnte. Dies könnte an der Ausbildung von Aggregaten liegen, die beim langsamen Einfrieren, durch das Aufkonzentrieren der Komplexe und folglich stärkeren Interaktion zwischen ihnen, entstanden [185]. Das Einfrieren der Komplexe hatte auf DEXala-1.50 bzw. DEXala-0.99 lys-0.16 unterschiedlichen Einfluss im Hinblick auf die Transfektionseffizienz.

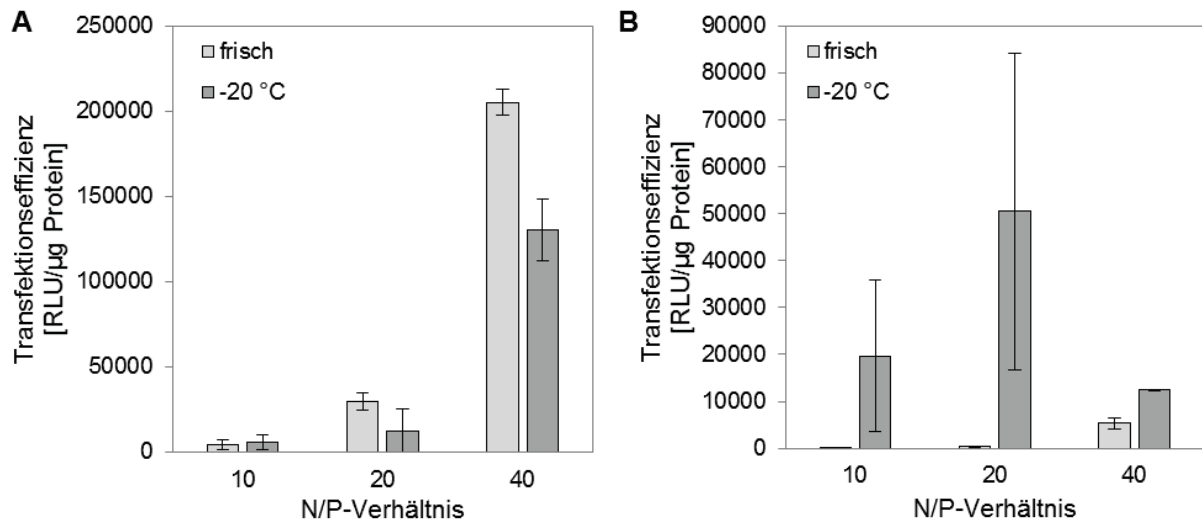


Abbildung 41: Transfektionseffizienz tiefgefrorener und rekonstituierter Komplexe aus DEXala-1.50 (A) bzw. DEXala-0.99 lys-0.16 (B) und pGL3 im Vergleich zu frisch hergestellten Komplexen nach 4 Stunden Transfektion und 44 Stunden Inkubation an CHO-K1-Zellen. Darstellung als relative Lumineszenz von Luciferin nach Inkubation mit, durch pGL3 kodierter, Luciferase relativ zur mittels BCA-Assay bestimmte Gesamtproteinmenge [Mittelwert +/- Standardabweichung, n = 2]

Für DEXala-1.50 (Abbildung 41A) blieb die Transfektionseffizienz der Komplexe bei N/P 10 und 20 unabhängig vom Einfrieren annähernd gleich, während sie bei N/P 40 um den Faktor 1,6 abfiel. Dies könnte möglicherweise an einer Aggregatbildung liegen, die zwar für größere hydrodynamische Durchmesser sorgte, aber nicht für eine Sedimentation auf die Zellen reichte. Damit war gleichzeitig die Aufnahme nach elektrostatischer Interaktion in die Zelle durch die Größe der Komplexe gehemmt. Wie auch bei den Transfektionsexperimenten (Kapitel 4.2.3) stieg hier die Transfektionseffizienz mit steigendem N/P-Verhältnis an. Für den Mischester DEXala-0.99 lys-0.16 wiederum konnte eine gesteigerte Transfektionseffizienz gefrorener und rekonstituierter Komplexe festgestellt werden (Abbildung 41B). So stieg die Transfektionseffizienz bei N/P 10 um den Faktor 200, bei N/P 20 um den Faktor 129 und bei N/P 40 um den Faktor 2,3. Die gesteigerte Transfektionseffizienz lässt sich mit der Ausbildung von Aggregaten begründen, die in der Zellkultur auf die adhärennten CHO-K1-Zellen sedimentierten und so stärker transfizierten. Allerdings zeigten die hohen

Standardabweichungen, dass diese Aggregatbildung und folglich gesteigerte Transfektion in den Proben nicht gleich ausgeprägt war.

Da während des Einfrierens der Komplexe, aus DEXala-1.50 bzw. DEXala-0.99 lys-0.16 mit pGL3, bei -20 °C Aggregate entstanden und die physikochemischen Eigenschaften der Komplexe nicht mehr bestimmbar waren, wurde im Folgenden die Gefrier Trocknung zur Stabilisierung untersucht. Die Gefrier Trocknung kam bereits für verschiedene Komplexe aus Polymervektoren und Nukleinsäuren zur Anwendung [17, 182, 185] und ist auch für die Stabilisierung empfindlicher Stoffe (z. B. Proteine) lange etabliert [186]. Zur Untersuchung des Einflusses dieser Stabilisierungsmethode wurden die Komplexe direkt nach der Herstellung über 24 Stunden gefriergetrocknet und anschließend direkt mit deionisiertem Wasser rekonstituiert. Auch der hydrodynamische Durchmesser der gefriergetrockneten und, um Einflüsse der Ionenstärke auszuschließen, mit deionisiertem Wasser wieder rekonstituierten Komplexe war nicht mit dynamischer Lichtstreuung bestimmbar. Im Unterschied zu den tiefgefrorenen Proben zeigte sich bei den gefriergetrockneten und rekonstituierten Komplexen sowohl für DEXala-1.50 (Abbildung 42A) als auch bei DEXala-0.99 lys-0.16 (Abbildung 42B) ein Anstieg der Transfektion um den Faktor 4,4 (DEXala-1.50 N/P 40) bzw. 21,5 (DEXala-0.99 lys-0.16 N/P 40) im Vergleich zu frisch hergestellten Komplexen.

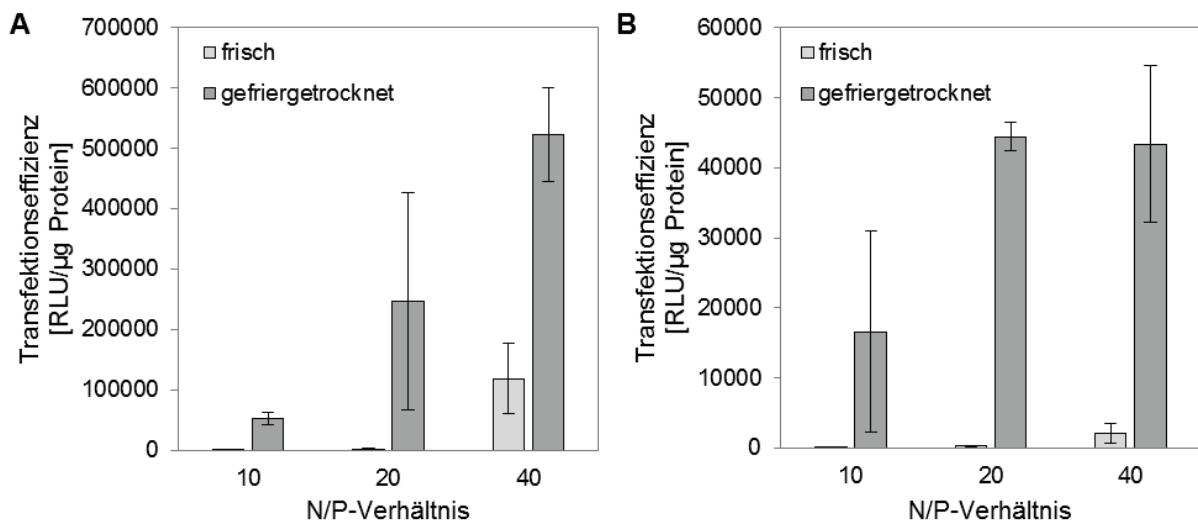


Abbildung 42: Transfektionseffizienz gefriergetrockneter und rekonstituierter Komplexe aus DEXala-1.50 (A) bzw. DEXala-0.99 lys-0.16 (B) und pGL3 im Vergleich zu frisch hergestellten Komplexen an CHO-K1-Zellen dargestellt als relative Lumineszenz von Luciferin nach Inkubation mit, durch pGL3 kodierte, Luciferase relativ zur mittels BCA-Assay bestimmte Gesamtproteinmenge. Transfektion mit den Komplexen über 4 Stunden gefolgt von 44 Stunden Inkubationszeit. [Mittelwert +/- Standardabweichung, n = 2, 1 Wiederholung]

Dies könnte mit einer stärkeren Aggregationsbildung aller Komplexe begründet werden, da bei der Gefrier Trocknung zusätzlich zum Einfrieren auch ein Entzug des Wasser stattfand, was die

Komplexe weiter aufkonzentrierte und so die Interaktion zwischen ihnen steigen ließ [185]. Der Anstieg der Transfektionseffizienz war bei niedrigeren N/P-Verhältnissen noch ausgeprägter, was zusätzlich für eine Aggregatbildung spricht, da bei diesen N/P-Verhältnissen ein geringerer Überschuss kationischer Polymere für eine geringere Zellinteraktion und folglich erhöhte Transfektionseffizienz sorgte (Kapitel 4.2.3).

Da bei der Gefriertrocknung von Proteinen als empfindliche Strukturen Kryo- und Lyoprotektoren verwendet werden, um die Proteine und ihre Konformation zu stabilisieren, sollte dieser Ansatz auch für unsere Komplexe verfolgt werden. Unter Verwendung von 5 % Glukose als Herstellungsmedium für die Komplexe konnte der hydrodynamische Durchmesser der gefriergetrockneten und mit deionisiertem Wasser rekonstituierten Komplexe bestimmt werden. Sowohl für DEXala-1.50 (Abbildung 43A) als auch für DEXala-0.99 lys-0.16 (Abbildung 43B) war eine Steigerung des hydrodynamischen Durchmessers nach Gefriertrocknung und Rekonstitution im Vergleich zu frisch hergestellten Komplexen messbar. So stieg der hydrodynamische Durchmesser von DEXala-1.50 um maximal den Faktor 2,1, während der Anstieg bei DEXala-0.99 lys-0.16 mit maximal 1,6-facher Steigerung bei N/P 40 etwas geringer ausfiel. Dennoch lagen nach Gefriertrocknung und Rekonstitution Komplexe mit einem hydrodynamischen Durchmesser zwischen 121 +/- 9 und 223 +/- 47 nm vor. Der PDI lag unabhängig von der Stabilisierung durch Gefriertrocknung und Polymer im Komplex zwischen 0,229 +/- 0,030 und 0,357 +/- 0,024 (Daten nicht gezeigt) und zeigte unter Berücksichtigung der Korrelationskurven (Daten nicht gezeigt) eine mono- bis bimodale Partikelgrößenverteilung an, was an vereinzelter Aggregatbildung gelegen haben könnte.

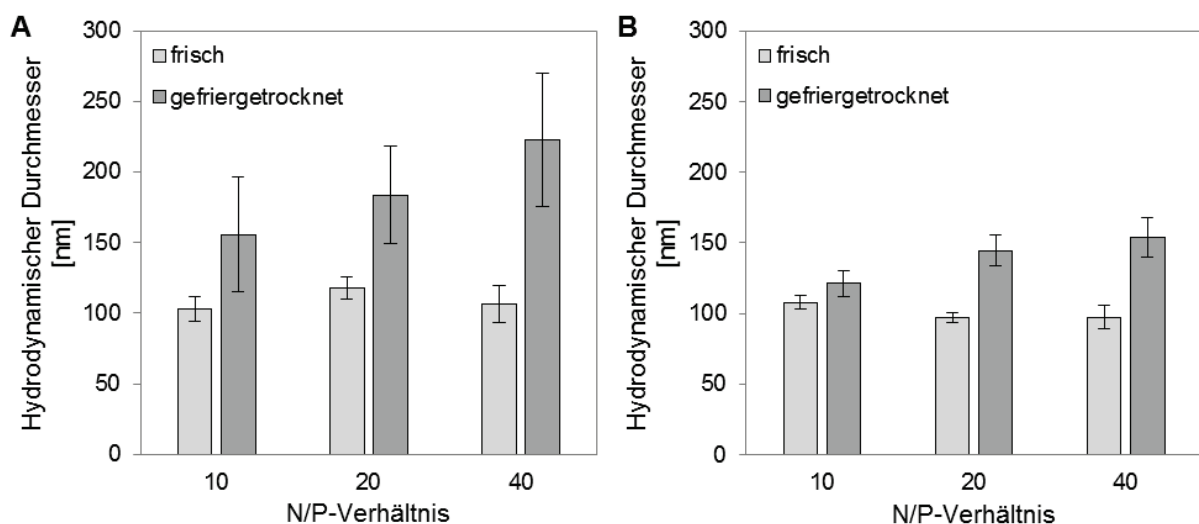


Abbildung 43: Hydrodynamischer Durchmesser gefriergetrockneter und rekonstituierter Komplexe aus DEXala-1.50 (A) bzw. DEXala-0.99 lys-0.16 (B) und pGL3 in 5 % Glukose im Vergleich zu frisch hergestellten Komplexen gemessen mittels dynamischer Lichtstreuung. [Mittelwert +/- Standardabweichung, n = 2, 1 Wiederholung]

Nach erfolgreicher Stabilisierung der Komplexe durch Herstellung in 5 % Glukose sollte die Lagerstabilität über einen längeren Zeitraum untersucht werden. Dazu wurden die Komplexe nach der Gefriertrocknung bei Raumtemperatur (25 °C), im Kühlschrank (4 °C) und im Tiefkühlschrank (-20 °C) gelagert. Diese Lagerorte sind einerseits Gegenstand gängiger Untersuchungen in Stabilisationsexperimenten für Vektoren von Nukleinsäuren [182, 185, 187, 188] und außerdem für eine spätere Anwendung, im Gegensatz zu z. B. -80°C Tiefkühlschränken, an vielen Orten verfügbar.

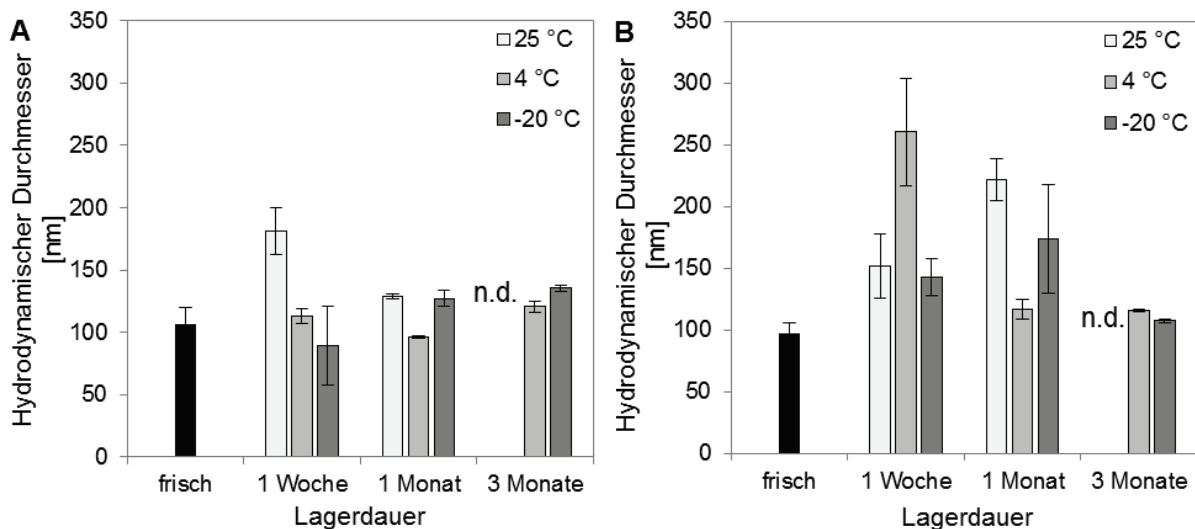


Abbildung 44: Hydrodynamischer Durchmesser gefriergetrockneter und rekonstituierter Komplexe aus DEXala-1.50 (A) bzw. DEXala-0.99 lys-0.16 (B) und pGL3 mit N/P 40 in 5 % Glukose im Vergleich zu frisch hergestellten Komplexen in Abhängigkeit von Lagerdauer und -temperatur bestimmt mittels dynamischer Lichtstreuung. [Mittelwert +/- Standardabweichung, n = 2] (n.d. = nicht definiert. Werte waren nicht bestimmbar)

Für die Untersuchung der Lagerstabilität über einen Zeitraum von einer Woche, einem Monat und drei Monaten wurden die in 5 % Glukose hergestellten und gefriergetrockneten Komplexe mit N/P 40 bei 25 °C, 4 °C und -20 °C gelagert. Außer für die Lagerung bei Raumtemperatur konnte bis zu einer Lagerungszeit von 3 Monaten eine Stabilisierung der Komplexe festgestellt werden. Für Komplexe aus DEXala-1.50 und pGL3 (Abbildung 44A) blieb der hydrodynamische Durchmesser während der Lagerung bei 4 °C zwischen 96 +/- 1 und 121 +/- 5 nm ähnlich dem der frisch hergestellten Komplexe mit 106 +/- 13 nm. Die bei -20 °C gelagerten Komplexe zeigten eine leichte Steigerung des hydrodynamischen Durchmessers auf das 1,3-fache des Durchmessers frisch hergestellter Komplexe. Jedoch lag der hydrodynamische Durchmesser immer noch im optimalen Bereich zwischen 20 und 200 nm [15, 32]. Im Unterschied dazu zeigte sich für die Lagerung bei Raumtemperatur eine starke Aggregation über die Lagerzeit, so dass nach drei Monaten kein hydrodynamischer Durchmesser mehr bestimmbar war. Ähnlich verhielten sich die Komplexe aus DEXala-0.99 lys-0.16 und pGL3 während der Lagerung (Abbildung 44B). So war

für die bei 4 °C bzw. -20 °C gelagerten Komplexe nach einwöchiger Lagerung ein Anstieg des hydrodynamischen Durchmessers auf das 2,7-fache bzw. das 1,8-fache im Vergleich zu frisch hergestellten Komplexen erkennbar, während nach dreimonatiger Lagerung der hydrodynamische Durchmesser den gleich dem frisch hergestellter Komplexe war. Allerdings lagen auch hier die hydrodynamischen Durchmesser noch im geeigneten Bereich für eine Transfektion. Wie auch bei DEXala-1.50 stieg der hydrodynamische Durchmesser der aus DEXala-0.99 lys-0.16 und pGL3 geformten Komplexe während der Lagerung bei 25 °C an, so dass nach drei Monaten keine Bestimmung mehr möglich war. Für alle hergestellten Komplexe zeigten sich, abgesehen von den nicht messbaren Aggregaten, nach Lagerung bei 25 °C über drei Monate ein PDI zwischen 0,290 +/- 0,055 und 0,583 +/- 0,002, was für eine mono- bis multimodale Partikelgrößenverteilung spricht. Das Zetapotential lag unabhängig von Polymer, Lagerdauer und -temperatur zwischen 14,2 +/- 0,2 und 24,8 +/- 4,2 mV. Damit waren die Komplexe aus DEXala-1.50 bzw. DEXala-0.99 lys-0.16 und pGL3 hergestellt in 5 % Glukose und stabilisiert mittels Gefrierdrying über drei Monate bei 4 °C und -20 °C stabil bezüglich ihres hydrodynamischen Durchmessers und Zetapotentials. Eine Lagerung bei 25 °C hingegen führte nach drei Monaten zur Aggregation der Komplexe, was sich an einer fehlenden Messbarkeit der Brownschen Bewegung mittels dynamischer Lichtstreuung zeigte.

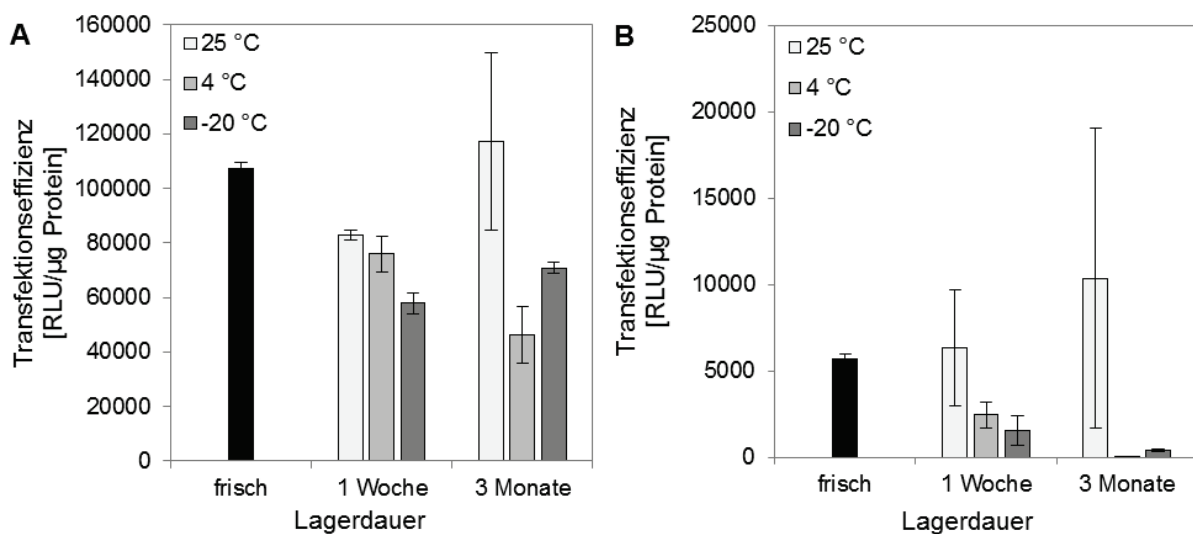


Abbildung 45: Transfektionseffizienz gefriergetrockneter und rekonstituierter Komplexe aus DEXala-1.50 (A) bzw. DEXala-0.99 lys-0.16 (B) und pGL3 mit N/P 40 in 5 % Glukose im Vergleich zu frisch hergestellten Komplexen in Abhängigkeit von Lagerdauer und -temperatur. Transfektionseffizienz dargestellt als Lumineszenz, nach Umwandlung von zugegebenen Luciferin durch die von pGL3 kodierte Luciferase, über die Gesamtproteinmenge ermittelt mittels BCA-Assay. [Mittelwert +/- Standardabweichung, n = 2]

Trotz der fehlenden Stabilisation des hydrodynamischen Durchmessers der Komplexe bei 25 °C zeigten die bei dieser Temperatur gelagerten Komplexe aus DEXala-1.50 und pGL3 (Abbildung 45A) bzw. DEXala-0.99 lys-0.16 und pGL3 (Abbildung 45B) die stabilste Transfektionseffizienz

über den Lagerzeitraum, während es bei den Lagertemperaturen von 4 °C und -20 °C nach drei Monaten zu einer leicht abnehmenden Transfektionseffizienz kam. Während die bei Raumtemperatur gelagerten gefriergetrockneten und nach drei Monaten rekonstituierten Komplexe aus DEXala-1.50 und pGL3 im Vergleich zu frisch hergestellten Komplexen mit gleicher Effizienz transfizierten, zeigten die bei 4 bzw. -20 °C gelagerten Komplexe eine Transfektionseffizienz von 43 bzw. 66 % der Transfektionseffizienz frisch hergestellter Komplexe. Der Verlust der Transfektionseffizienz trat bereits nach einer Woche auf. Dabei zeigten die bei 4 °C gelagerten Komplexe noch 71 % und die bei -20 °C gelagerten noch 54 % der Transfektionseffizienz frisch hergestellter Komplexe.

Das Verhalten der Transfektionseffizienz bei Komplexen aus DEXala-0.99 lys-0.16 und pGL3 war ähnlich. So war die Transfektionseffizienz der bei 25 °C gelagerten Komplexe auch nach drei Monaten noch gleich der frisch hergestellten Komplexe, wohingegen es bei der Lagerung bei 4 °C bzw. -20 °C nach einer Woche zu einer Abnahme der Transfektionseffizienz auf 43 bzw. 27 % der Transfektionseffizienz frisch hergestellter Komplexe kam. Nach drei Monaten betrug die Transfektionseffizienz der bei 4 °C bzw. -20 °C gelagerten Komplexe aus DEXala-0.99 lys-0.16 und pGL3 noch 0,1 bzw. 7,5 % der frisch hergestellten Komplexe.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass sowohl nach Einfrieren bei -20 °C als auch nach Gefriertrocknung Komplexe aus DEXala-1.50 bzw. DEXala-0.99 lys-0.16 und pGL3 eine hohe Transfektionseffizienz aufwiesen, aber eine Charakterisierung hinsichtlich ihres hydrodynamischen Durchmessers nicht möglich war. Aus diesem Grund wurde 5 % Glukose, ein etablierter Kryo- und Lyoprotektor, als Herstellungsmedium der Komplexe vor der Gefriertrocknung verwendet. Die anschließenden Untersuchungen zeigten einen leicht gesteigerten hydrodynamischen Durchmesser nach der Gefriertrocknung, der im Bereich optimaler Komplexgrößen zur Transfektion lag. Anschließend wurden die hergestellten Komplexe bei 25 °C, 4 °C und -20 °C über einen Zeitraum von 3 Monaten gelagert und ihr hydrodynamischer Durchmesser sowie die Transfektionseffizienz bestimmt. Dabei zeigte sich, dass es während der Lagerung bei 25 °C nach drei Monaten zur Ausbildung großer Aggregate kam, während der hydrodynamische Durchmesser der bei 4 °C und -20 °C gelagerten Komplexe stabil blieb. Im Gegensatz dazu fiel die Transfektionseffizienz der bei 4 und -20 °C gelagerten Komplexe mit steigender Lagerzeit ab. Während die bei 25 °C gelagerten Komplexe genauso effizient transfizierten wie frisch hergestellte Komplexe. Dies könnte an der Aggregatbildung und folglich an der Sedimentation der Komplexe auf die adhärenen Zellen liegen. Da das Zetapotential und der hydrodynamische Durchmesser der Komplexe während der Lagerung bei



4 °C und -20 °C stabil blieben, muss ein Grund für die reduzierte Transfektionseffizienz weiter untersucht werden.

#### 4.4.2 Untersuchung des Einflusses von Gefriertrocknungs- und Rekonstitutionszyklen auf den hydrodynamischen Durchmesser und das Zetapotential der Komplexe

Da die zur Stabilisierung während der Lagerung eingesetzte Gefriertrocknung und die anschließende Rekonstitution Stressoren für die Komplexe sind [185, 188], sollte ihr Einfluss auf die Komplexe untersucht werden. Dazu wurden in Vorversuchen (Kapitel 4.2 und 4.3) geeignete Vektoren für eine spätere Anwendung zum Gentransfer identifiziert.

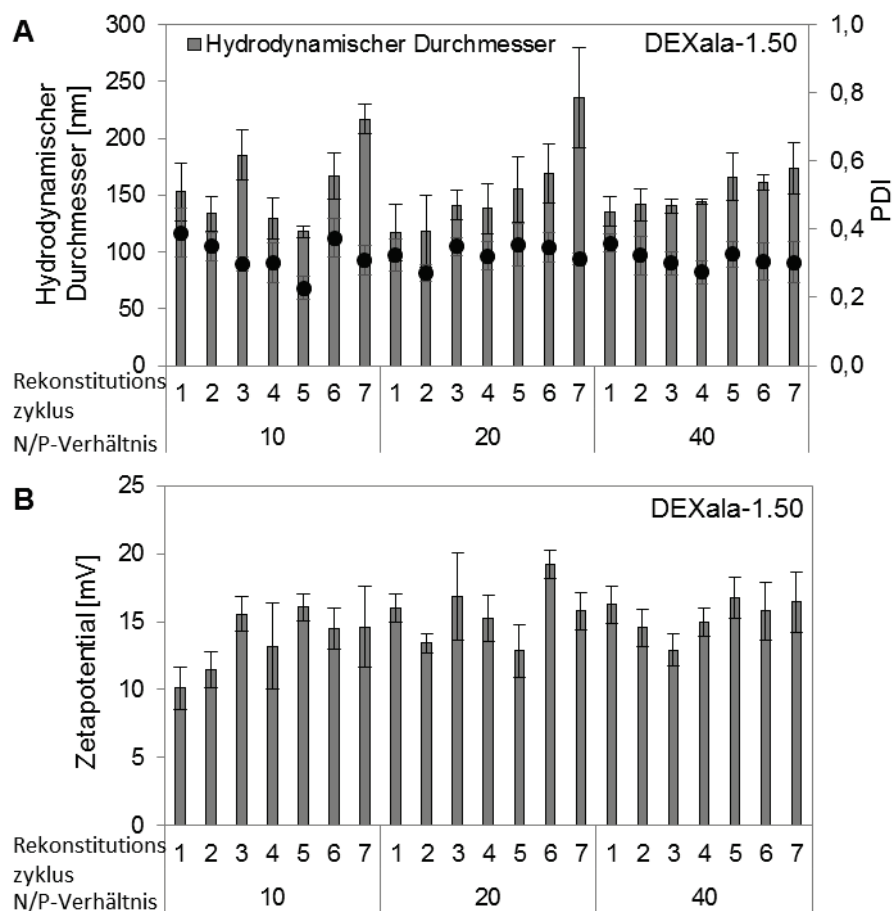


Abbildung 46: Hydrodynamischer Durchmesser und PDI bestimmt mittels dynamischer Lichtstreuung (A) und Zetapotential bestimmt mittels Laser-Doppler-Anemometrie (B) von Komplexen aus DEXala-1.50 und pGL3 in Abhängigkeit von N/P-Verhältnis und Rekonstitutionszyklus. [Mittelwert +/- Standardabweichung, n = 2]

Aufgrund ihrer herausragenden Eigenschaften für den Einsatz zum Gentransfer wurden DEXala-1.50 bzw. DEXala-0.99 lys-0.16 verwendet und mit pGL3 im N/P-Verhältnis von 10, 20 und 40 Komplexe in 5 % Glukose hergestellt. Diese N/P-Verhältnisse wurden gewählt, da ein Überschuss an kationischer Ladung für die Transfektion nötig ist und damit in Vorversuchen gute Transfektionen erreicht wurden. Fünf % Glukose wurde verwendet, da aus den Untersuchungen der Lagerstabilität (Kapitel 4.4.1) ein positiver Einfluss dieses Herstellungsmediums auf die

Stabilität der Komplexe anhand stabiler hydrodynamischer Durchmesser und Transfektions-effizienz nach Rekonstitution, festgestellt werden konnte. Nach Gefriertrocknung wurden die Komplexe im Ausgangsvolumen deionisierten Wassers rekonstituiert und der hydrodynamische Durchmesser mittels dynamischer Lichtstreuung sowie das Zetapotential mittels Laser-Doppler-Anemometrie bestimmt.

Während der Gefriertrocknungs- und Rekonstitutionszyklen konnten für alle Komplexe aus DEXala-1.50 bzw. DEXala-0.99 lys-0.16 und pGL3 in 5 % Glukose ein Anstieg des hydrodynamischen Durchmessers zwischen erster und letzter Rekonstitution bei stabilem Zetapotential festgestellt werden. Eine Ausnahme bildete DEXala-1.50 mit einem N/P-Verhältnis von 10, dessen Zetapotential leicht anstieg. Der Einfluss von Gefriertrocknung und Rekonstitution auf Komplexe aus DEXala-1.50 und pGL3 ist in Abbildung 46 dargestellt. Der PDI und die Korrelationskurven der Brownschen Bewegung zeigten unabhängig von Rekonstitutionszyklus und N/P-Verhältnis eine mono- bis bimodale Partikelgrößenverteilung. Der PDI lag zwischen  $0,228 \pm 0,034$  und  $0,389 \pm 0,072$ . Betrachtet man den Einfluss der Gefriertrocknungs- und Rekonstitutionszyklen auf den hydrodynamischen Durchmesser so war eine Steigerung mit steigender Anzahl der Gefriertrocknungs- und Rekonstitutionszyklen beobachtbar. So stieg zwischen erstem und siebtem Gefriertrocknungs- und Rekonstitutionszyklus der hydrodynamische Durchmesser für DEXala-1.50 bei N/P 10 um das 1,4-, bei N/P 20 um das 2,0- und bei N/P 40 um das 1,3-fache an. Dabei nahm der hydrodynamische Durchmesser bei N/P 20 und 40 stetig zu, wohingegen sich bei N/P 10 je nach Rekonstitutionszyklus ein Abfall und Anstieg des hydrodynamischen Durchmessers beobachten ließ. Allerdings lag der hydrodynamische Durchmesser auch nach sieben Rekonstitutionszyklen mit  $174 \pm 23$  bis  $235 \pm 44$  nm noch im Bereich von 20 bis 200 nm und war damit als Vektor zum Transport von DNA in Zellen geeignet [15, 32]. Das Zetapotential lag zwischen  $+10,1 \pm 1,6$  und  $+19,2 \pm 1,0$  mV und zeigte lediglich für DEXala-1.50 N/P 10 eine Steigerung um den Faktor 1,4 zwischen erstem und siebtem Gefriertrocknungs- und Rekonstitutionszyklus, allerdings ohne klaren Trend der Steigerung nach jedem Zyklus.

Zusammenfassend ließ sich für DEXala-1.50 mit pGL3 auch nach sieben Gefriertrocknungs- und Rekonstitutionszyklen die Stabilität der kationischen Nanokomplexe nachweisen, was die Eignung des Vektors zum Gentransfer auch nach Gefriertrocknung nahelegt. Die mono- bis bimodale Partikelgrößenverteilung zeigte keinen Unterschied zu frisch hergestellten Komplexen (Kapitel 4.2.2).

Für den Mischester DEXala-0.99 lys-0.16 war ein stark vom N/P-Verhältnis und Rekonstitutionszyklus abhängiger Anstieg vom hydrodynamischen Durchmesser feststellbar. So stieg der hydrodynamische Durchmesser nach sieben Gefriertrocknungs- und Rekonstitutionszyklen für N/P 10 um den Faktor 2,3; für N/P 20 um den Faktor 1,4 und für N/P 40 um den Faktor 1,7 im Vergleich zum ersten Gefriertrocknungs- und Rekonstitutionszyklus an und lag nach sieben Rekonstitutionszyklen bei 165 +/- 12 bis 280 +/- 48 nm. Im Unterschied dazu blieb das Zetapotential zwischen 14,3 +/- 0,62 und 22,9 +/- 3,74 mV unabhängig vom Gefriertrocknungs- und Rekonstitutionszyklus. Der PDI lag zwischen 0,176 +/- 0,079 und 0,368 +/- 0,038 und zeigte damit, wie auch bei DEXala-1.50, für die Komplexe aus DEXala-0.99 lys-0.16 eine mono- bis bimodale Größenverteilung an.

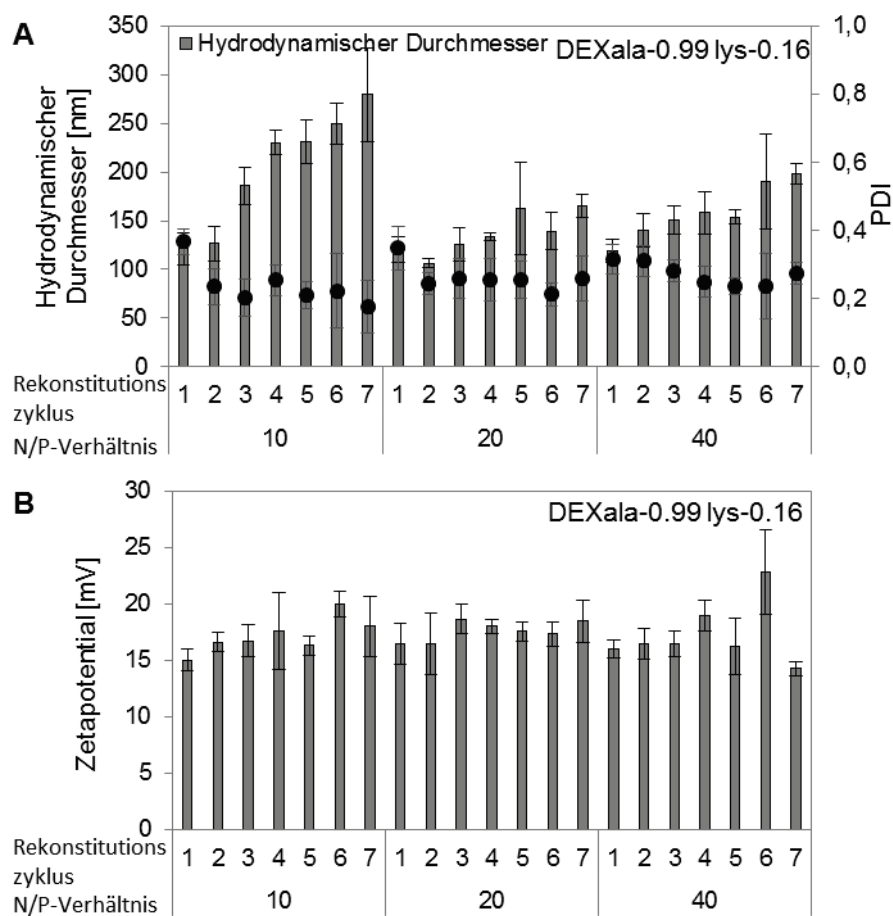


Abbildung 47: Hydrodynamischer Durchmesser und PDI bestimmt mittels dynamischer Lichtstreuung (A) und Zetapotential bestimmt mittels Laser-Doppler-Anemometrie (B) von Komplexen aus DEXala-0.99 lys-0.16 und pGL3 in Abhängigkeit von N/P-Verhältnis und Rekonstitutionszyklus. [Mittelwert +/- Standardabweichung, n = 2]

Zusammenfassend ließen sich sowohl für Komplexe aus DEXala-0.99 lys-0.16 mit pGL3, wie auch für Komplexe aus DEXala-1.50 und pGL3, nach sieben Gefriertrocknungs- und Rekonstitutionszyklen ein Erhalt der Nanokomplexe mit kationischem Zetapotential nachweisen.

Die Untersuchung des Einflusses von Gefriertrocknungs- und Rekonstitutionszyklen zeigte eine Korrelation zwischen Gefriertrocknungs- und Rekonstitutionszyklen und dem hydrodynamischen Durchmesser auf. Zusammenfassend zeigten sowohl DEXala-1.50 als auch DEXala-0.99 lys-0.16 eine Steigerung des hydrodynamischen Durchmessers nach mehreren Gefriertrocknungs- und Rekonstitutionszyklen. Allerdings lagen nach sieben Gefriertrocknungs- und Rekonstitutionszyklen immer noch kationische Nanokomplexe vor, deren Zetapotential unabhängig vom Gefriertrocknungs- und Rekonstitutionszyklus konstant blieb. Somit ist ein erfolgreicher Schutz der Formulierung vor dem physikalischen Stress der Gefriertrocknung und Rekonstitution nachgewiesen.

## 5 Gesamtdiskussion

Die Gentherapie ist eine vielversprechende Therapieform bei einer Vielzahl an Erkrankungen, die mit niedermolekularen Substanzen nicht behandelbar sind [27]. Für die intravenöse Applikation ist, wie im Kapitel 1.2 diskutiert, ein Vektor für die eingesetzte Nukleinsäure von Vorteil. Dieser Vektor muss einer Vielzahl von Anforderungen genügen [13]. Im Rahmen dieser Dissertation sollte ein innovativer polysaccharid-basierter Vektor zum Gentransfer entwickelt werden. Viele synthetische Polymere, wie z. B. der aktuelle Goldstandard Polyethylenimin (PEI), bringen den Nachteil hoher Toxizität und fehlender Bioabbaubarkeit mit sich [121]. Als Alternative sollten in einer ersten Studie modifizierte natürliche Polymere, wie Dextran und Zellulose untersucht werden.

Sowohl Dextran [75, 76] als auch Zellulose [189, 190] können aus nachwachsenden natürlichen Ressourcen gewonnen werden und gelten als biokompatibel und bioabbaubar, was exzellente Voraussetzungen für die Anwendung als Vektor zum Gentransfer sind. Zusätzlich bestehen beide Polymere aus verknüpften Anhydroglukoseeinheiten (AGUs), die aufgrund ihrer Hydroxylgruppen einfach modifizierbar sind [73, 191]. Strukturell bestehen sowohl Dextran als auch Zellulose aus verknüpften Anhydroglukoseeinheiten (AGUs). Allerdings unterscheidet sich die Art der Verknüpfung. Während die AGUs bei Zellulose  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-verknüpft sind und im Winkel von 180° zueinander stehen (Abbildung 8A) [176], sind sie bei Dextran hauptsächlich über  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)- und zusätzlich  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2),  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) und  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glykosidische Bindungen verknüpft (Abbildung 3, Kapitel 1.4) [73]. Die  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glykosidische Bindung des Dextrans ist für die Flexibilität und gute Wasserlöslichkeit des Polymers verantwortlich [192]. Zellulose hingegen ist durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen vom O(3')-H-hydroxyl zum O(5)-Ringsauerstoff der nächsten AGU, sowie vom O(2)-H-hydroxyl zum O(6')-hydroxyl der nächsten AGU wasserunlöslich [191] und weist durch die Anordnung der AGUs im Winkel von 180°

zueinander eine helikale Struktur auf (Abbildung 8A, Kapitel 4.1). Dies bedingt außerdem eine höhere Steifigkeit der Zellulose im Vergleich zu Dextran [176]. Die Kationisierung von Zellulose bedingt wiederum eine gute Wasserlöslichkeit [167]. Die Konjugation kationischer Gruppen an das Grundgerüst ist für den Einsatz von Polymeren als nicht-virale Vektoren zum Gentransfer vorteilhaft. Sie ist vom Vorteil, um die Komplexe mit DNA über elektrostatische Wechselwirkungen zu stabilisieren sowie die Transfektion durch Zellmembraninteraktion und Aufnahme der Komplexe in die Zelle möglich zu machen. Durch die gleiche Interaktion kann aber auch eine Zerstörung der Zellmembran verursacht werden, was als Nachteil anzusehen ist. Dieses sogenannte „Ladungsdilemma“ ist ein Hindernis der Anwendung neuer nicht-viraler Vektoren [32]. Für Dextran sind zahlreiche Modifikationen zur Optimierung als Vektor für den Gentransfer beschrieben (Kapitel 1.5), wohingegen es für Zellulose bisher lediglich eine geringe Anzahl von Studien zum Gentransfer gibt. Dabei wird Zellulose hauptsächlich zur Unterstützung etablierter Träger, wie bPEI, eingesetzt, um deren Toxizität zu reduzieren [193]. Allerdings wurde in einer aktuellen Untersuchung Zellulose nach Modifizierung mit 3-Chloro-2-hydroxypropyltrimethylammoniumchlorid zur erfolgreichen Komplexierung und Transfektion von Plasmid-DNA (pDNA) eingesetzt und zeigte eine Transfektionseffizienz wie Lipofectamin® 2000 [194]. Ein systematischer Vergleich von Dextran und Zellulose auf ihre Eignung als Vektor zum Gentransfer stand allerdings bisher aus. Aus diesem Grund sollten in einer ersten Untersuchung Dextran und Zellulose auf ihre Eignung als Grundgerüst für Vektoren zum Gentransfer systematisch verglichen werden.

Zur Kationisierung der Grundgerüste wurde eine sowohl für Dextran (DEX) als auch für Zellulose (CEL) in der Arbeitsgruppe von Prof. Thomas Heinze (Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie, Friedrich-Schiller-Universität, Jena) entwickelte, intensiv untersuchte und gut steuerbare Modifikation mit Methylaminobutyrat (mab) [166, 167] verwendet. Dabei wurden Dextrane mit einem Substitutionsgrad (DS) von 0,30; 0,39 und 0,52 sowie Zellulosen mit einem DS von 0,31; 0,62 und 0,74 synthetisiert. Die Benennung der Verbindung ergab sich aus dem Polysaccharid, dem Substituenten und dem DS (z. B. CELmab-0.62 entspricht Methylaminobutyrat-substituierter Zellulose mit einem DS von 0,62). Die beiden Polysaccharide wurden mit einer molaren Masse von 75.000 g/mol eingesetzt, um sie vergleichen zu können. Die molare Masse wurde gewählt, da für Dextran die Biokompatibilität durch Anwendung als Plasmaexpander lang bekannt ist und die Zirkulationszeit *in vivo* zur Transfektion aufgrund der Nierenschwelle bei >20 Stunden liegt [73, 80, 88, 89]. Die kationisierbare Gruppe war eine Methylaminfunktion im C4-Abstand zum Grundgerüst. Sekundäre Amine, wie beispielsweise im Spermin, konjugiert an ein Grundgerüst, wie z. B. Dextran, wurden bereits als vorteilhaft für den

Gentransfer beschrieben [133, 134]. Sie wiesen eine hohe Bindeeffizienz für Nukleinsäuren auf und setzten diese während der Transfektion auch wieder aus dem Komplex frei. Im Gegensatz dazu wurden tertiäre oder quartäre Amine, wegen einer fehlenden Freisetzung von Nukleinsäuren aus dem Komplex aufgrund ihrer hohen Bindeeffizienz, als nachteilig für die Transfektion beschrieben [135]. Sowohl mit Methylaminobutyrat substituierte Dextrane (DEXmab) als auch Zellulosen (CELmab), im Komplex mit pDNA, zeigten eine effiziente Komplexierung und Kondensation der pDNA. Diese Bindeeffizienz stieg mit Erhöhung des Verhältnisses von Stickstoff im Polymer zu Phosphat in der DNA (N/P-Verhältnis) von 10 auf 20 sowie der Erhöhung des Substitutionsgrads (DS). Ab einem DS von  $\geq 0,52$  war die Bindeeffizienz gleich oder besser der Bindeeffizienz von 2.500 g/mol IPEI, das als etablierter Vektor [180] hier als Positivkontrolle eingesetzt wurde. Dieser vom DS und N/P-Verhältnis abhängige Anstieg der Kondensation ist sowohl für natürliche Substituenten wie Arginin, als auch für synthetische, wie Glycidyltrimethylammoniumchlorid, bekannt [124, 195]. Im direkten Vergleich zeigte sich CELmab bezüglich der Kondensation von pDNA gegenüber DEXmab überlegen. Analog zur Literatur konnte gezeigt werden, dass für kationisierte Dextrane meist ein gesteigertes Ladungsverhältnis kationischer Polymere (N) zu anionischer DNA (P) für eine Kondensation nötig ist [124, 195]. Im Unterschied dazu ist für die beschriebenen Zellulosederivate meist bei einem niedrigen N/P-Verhältnis eine effiziente Bindung der DNA zu beobachten [194]. Doch nicht nur die Komplexierung und Kondensation der pDNA sondern auch die Kompaktierung auf eine Größe von ca. 100 nm ist für einen effizienten Gentransfer wichtig. Komplexe  $< 10$  nm haben den Nachteil rapider renaler Elimination [15], wohingegen größere ( $> 200$  nm) verstärkt durch Makrophagen aufgenommen werden [23]. Nach langjähriger Forschung an optimalen Vektoren zum Gentransfer wurden hydrodynamische Durchmesser in einem Bereich von 20 bis 200 nm als geeignet beschrieben [15, 32]. Die mit DEXmab geformten Komplexe zeigten dabei unabhängig vom N/P Verhältnis und DS mit ca. 100 nm einen geeigneten hydrodynamischen Durchmesser sowie ein positives Zetapotential zur elektrostatischen Interaktion mit der Zellmembran und folglich der Transfektion. Für mit CELmab geformte Komplexe war wiederum keine Korrelation der Brownschen Bewegung mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) messbar, was durch ein polydisperses System bedingt sein könnte. Die fehlende Korrelation in der Messung könnte auch mit Aggregation, Instabilität der Komplexe oder der fehlenden Ausbildung sphärischer Komplexe begründet werden. Zellulose besitzt, im Gegensatz zu Dextran, durch ihre helikalen Anordnung der  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-verknüpften Anhydroglukoseeinheiten, ein sehr rigides Grundgerüst, was zur Ausbildung stabförmiger Strukturen führen kann [176].

Betrachtet man den Einfluss von DEXmab und CELmab auf die Viabilität L929 muriner Fibroblasten so ließ sich eine sinkende metabolische Aktivität mit steigender Polymerkonzentration und steigendem DS feststellen. Der Einfluss war für DEXmab geringer ausgeprägt als CELmab. Im Unterschied dazu war nur bei Inkubation mit CELmab die Aggregation von Erythrozyten feststellbar. Interessanterweise sank die Aggregation der Erythrozyten für CELmab-0.62 bei Konzentrationen  $>12,5 \mu\text{g/ml}$  wieder, was vermutlich an einer vollständigen Bedeckung der Oberfläche der roten Blutzellen mit Polymer und folglich Abstoßung der Zellen lag. Dieser Effekt ist z. B. für Eisenoxidnanopartikel mit kationischer Oberflächenmodifikation durch verzweigtes PEI bekannt [mündliche Mitteilung von Florian Schlenk, AG Prof. Fischer, Institut für Pharmazie, Friedrich-Schiller-Universität, Jena]. Warum dieser Effekt weder bei dem niedriger substituierten CELmab-0.31 noch bei dem höher substituierten CELmab-0.71 auftrat, konnte bisher nicht nachgewiesen werden. In der Literatur ist die Umhüllung von Zellen mit kationisierter Zellulose und folgender Aggregation und Zellyse beschrieben [196], doch trotz höherer Toxizität in Bezug auf die Erythrozytenaggregation zeigte CELmab, genauso wie DEXmab, keine Lyse der Zellmembran der Erythrozyten.

Die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen kationischen Polymeren und pDNA schützen die pDNA im Komplex durch Kompaktierung und verursachen damit eine sterische Blockade der DNase [12, 14]. Analog zur beobachteten stärkeren Kondensation der pDNA durch CELmab war ein besserer Schutz vor DNase nachweisbar, was sich durch einen geringen Abbau der pDNA durch DNase I zeigte. Damit war CELmab in Bezug auf den Schutz vor Nukleasen DEXmab überlegen, welches unzureichend vor Abbau durch DNase I schützte.

Ein Absinken des Proteingehalts bei der Untersuchung der Transfektionseffizienz, bei dem die CHO-K1-Zellen mit den Komplexen aus CELmab bzw. DEXmab und pDNA behandelt wurden, konnte sowohl für DEXmab mit  $\text{DS} >0,39$  als auch für CELmab mit  $\text{DS} >0,31$  beobachtet werden. Dieses Verhalten wird in der Literatur als ein Indikator für die Toxizität und Interaktion des Vektors mit der Zellmembran beschrieben [111]. Betrachtet man den Einfluss von DEXmab-0.52, CELmab-0.62 und CELmab-0.74 auf die Zellviabilität, so lässt sich für diese drei Polymere eine stärkere Reduktion der Viabilität mit steigender Polymerkonzentration und ein gegenüber DEXmab mit  $\text{DS} \leq 0,39$  und CELmab-0.31 verringerter Proteingehalt feststellen. Dabei zeigte sich außerdem keine Abhängigkeit vom Zetapotential, das für DEXmab-0.39 niedriger lag als DEXmab-0.30 und dennoch eine geringere Zellviabilität an L929 murinen Fibroblasten verursachte.

Die Transfektionseffizienz stieg für Dextranderivate mit steigendem N/P-Verhältnis der Komplexe mit pDNA und steigendem DS. Diese Abhängigkeit ist bereits für andere synthetische Seitenketten an Dextran z. B. PEI [116] oder Glycidyltrimethylammoniumchlorid [195] beschrieben. Auch für die mit Methylaminobutyrat substituierten Zellulosen war ein Anstieg der Transfektionseffizienz mit steigendem DS und N/P-Verhältnis messbar. Dieser fiel im Vergleich zu Dextran geringer aus, so dass die Transfektionseffizienz von CELmab-0.74 N/P 20 im Vergleich zu DEXmab-0.52 N/P 20 um den Faktor 10 niedriger lag. Dies könnte wiederum mit der höheren Steifigkeit der Zellulose begründet werden, was eine fehlende Ausbildung sphärischer Komplexe und eine schlechte Aufnahme in die Zellen bedingt. Außerdem könnte damit eine Erklärung der fehlenden Messbarkeit eines hydrodynamischen Durchmessers mit Hilfe von DLS erbracht werden, da trotz hoher kationischer Ladung und hervorragender Bindeeffizienz für DNA, eine Aufnahme in die Zelle erschwert war. Der starke Anstieg der Transfektionseffizienz von DEXmab-0.52 im Vergleich zu DEXmab-0.30 und -0.39 könnte mit dem zwei- bis dreifach höheren Zetapotential begründet werden, dass eine stärkere Interaktion mit den Zellen möglich machte.

Zusammenfassend wurden in dieser Studie erstmals die Eignung von Dextran und Zellulose als Vektor zum Gentransfer direkt verglichen. Dabei zeigte sich nach Modifikation mit Methylaminobutyrat eine Abhängigkeit der Eigenschaften der Vektoren vom Grundgerüst. So war es den durch Methylaminobutyrat modifizierten Polysacchariden möglich pDNA effizient zu binden und für DEXmab konnte die Bildung kationischer Nanokomplexe nachgewiesen werden. Sowohl für DEXmab als auch CELmab nahm mit steigendem DS und N/P-Verhältnis die Transfektionseffizienz zu, was mit den Literaturdaten korreliert [124, 195]. Für DEXmab war diese Abhängigkeit besonders ausgeprägt. Dahingegen ließ die Untersuchung des Schutzes der komplexierten pDNA vor Abbau durch DNasen eine effizientere Abschirmung gegen Nukleasen durch modifizierte Zellulosen vermuten. Die kationisierten Polymere zeigten mit steigender Konzentration und steigendem DS eine steigende Toxizität an Fibroblasten, wohingegen weder für DEXmab noch für CELmab eine Lyse der Erythrozyten zu beobachten war. Im Unterschied zu DEXmab stieg die Aggregation der Erythrozyten bei Behandlung mit CELmab mit steigendem DS und steigender Konzentration. Da sich der hydrodynamische Durchmesser der Komplexe aus DEXmab mittels DLS bestimmen ließ und die Komplexe eine höhere Transfektionseffizienz bei niedrigerer Toxizität im Vergleich zu CELmab aufwiesen, wurde für die folgenden Studien Dextran als Grundgerüst verwendet.

Für die Entwicklung eines maßgeschneiderten Vektors mit hoher Biokompatibilität wurden für die folgende Studie natürliche Substanzen zum Einbringen kationischer Gruppen an Dextran gesucht. Aufgrund der zahlreichen Studien zu natürlichen Substanzen, wie Peptiden [113] oder



Agmatin [124], dem decarboxylierten Derivat von Arginin, fiel die Wahl auf Aminosäuren. Aminosäure-gekoppelte Polymere waren in den letzten Jahren aufgrund ihrer herausragenden Eigenschaften Ziel zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen [197-199]. Als zellpenetrierende Peptide (CPPs) fanden Aminosäuren schon lange Anwendung als Vektoren zum Gentransfer [200, 201]. In CPPs konnten die vorteilhaften Eigenschaften einzelner Aminosäuren in einem Peptid kombiniert werden. So wurde z. B. Lysin zur Kondensation von DNA, Histidin zur endosomalen Freisetzung und Valin zur DNA-Komplexierung eingesetzt [202]. Außerdem zeigen CPPs eine niedrige Toxizität aufgrund ihrer Abbaubarkeit zu Aminosäuren [62]. Auch polymerisierte Aminosäuren sind für die Anwendung als Vektoren zum Gentransfer untersucht worden. So sind z. B. Poly-L-Arginin [203] und Poly-L-Lysin [164, 204] für Anwendung als Vektoren zum Gentransfer lang bekannt. Gekoppelt an Dextran fanden die basische Aminosäure Arginin [205] oder ihr decarboxyliertes Derivat Agmatin [124] aufgrund kationischer Ladung und der zellpenetrierenden Eigenschaft der Guanidinfunktion [123] Anwendung. Dabei war die Struktur der Konjugate wichtig, wie Azzam et al. [113] beschrieb. In einer Studie untersuchten sie über 300 an Dextran gekoppelte Oligoamine unterschiedlicher Struktur auf ihre Transfektionseffizienz und waren lediglich mit Spermin erfolgreich. Die strukturellen Unterschiede bezogen sich unter anderem auf die molare Masse der Polyamine und den Abstand zwischen den Aminfunktionen im Molekül. Auch für Aminosäuren ist eine strukturelle Abhängigkeit der Trägereigenschaften beschrieben. So wurden z. B. Lysin, Glycin und Histidin an Tocopherol gekoppelt und für Lysin und Glycin eine stärkere DNA-Bindung im Vergleich zu Histidin gefunden. Die Transfektionseffizienz zeigte sich wiederum für Lysin > Histidin > Glycin [161]. Auch beim Vergleich von Serin, Alanin und  $\beta$ -Alanin als Kopfgruppe an Fettsäuren verschiedener Länge konnte ein starker Einfluss der Struktur in Form einer Überlegenheit der Alanin und  $\beta$ -Alanin-Kopfgruppe bezüglich der Transfektionseffizienz gegenüber Serin gefunden werden [162]. Dies wurde mit einem geringeren Schutz der an Serin gebundenen DNA begründet. Unterschiede zeigten sich außerdem beim Vergleich von Glycin und  $\beta$ -Alanin als Kopfgruppe an Cholesterol, bei welchem die Transfektionseffizienz von Glycin der von  $\beta$ -Alanin deutlich unterlegen war, was mit doppelt so groß geformten Lipoplexen der Glycin-Derivate im Vergleich zu den  $\beta$ -Alanin-Derivaten begründet wurde [163].

Da ein systematischer Vergleich verschiedener Aminosäuren konjugiert an ein Polymergrundgerüst bisher ausstand, sollte in dieser Studie anhand von Glycin (gly),  $\beta$ -Alanin (ala) und Lysin (lys) mit  $\alpha$ -,  $\beta$ - bzw.  $\alpha$ - und  $\epsilon$ -Aminfunktion an 60.000 g/mol Dextran (DEX) gekoppelt und untersucht werden. Diese molare Masse garantiert eine lange Zirkulationszeit bei späterer Anwendung *in vivo*, da sie oberhalb der Nierenschwelle liegt. Zusätzlich ist die

Anwendung als Plasmaexpander lang bekannt [73, 80, 88, 89]. Mit der Kopplung der Aminosäuren über eine Esterbindung an Dextran nahm der  $pK_a$ -Wert der Aminfunktionen ab. So sank er für Glycin von 9,6 auf 7,7; für  $\beta$ -Alanin von 10,2 auf 8,9; für die  $\alpha$ -Aminfunktion von Lysin von 9,0 auf 6,8 und für die  $\epsilon$ -Aminfunktion von Lysin von 10,5 auf 9,9. Demzufolge waren die Aminosäuren gekoppelt an Dextran bei gleichem pH-Wert des umgebenden Mediums im geringeren Maße protoniert als die freien Aminosäuren. Der niedrige  $pK_a$ -Wert der  $\alpha$ -Aminfunktion könnte ein Grund für die fehlende Komplexbildung mit pDNA der mit Glycin konjugierten Dextrane (DEXgly) sein. Ein weiterer Grund könnte die Kürze der Kohlenstoffkette von nur einem Kohlenstoff zwischen Carboxyl- und Aminfunktion von Glycin sein. Dies könnte einerseits zu sterischer Hinderung der Komplexbildung aufgrund der Nähe der Aminfunktion zum Dextran Grundgerüst geführt haben und andererseits die fehlende Protonierung durch die Nähe der Carboxylfunktion bedingt haben. Die Datenlage dazu ist in der Literatur nicht eindeutig. Die fehlende Komplexbildung in unseren Versuchen steht im Gegensatz zu bisherigen Untersuchungen an z. B. mit Glycin modifizierten dendritischen Amphiphilen bei denen bei vergleichbaren Substitutionsgraden eine Komplexbildung möglich war [206]. Allerdings ließe sich dadurch die fehlende Transfektion der Cholesterol-Glycin-Derivate [163] begründen, wobei der große hydrodynamische Durchmesser dieser Lipoplexe Indiz für eine schwache Kondensation und Größenreduktion der DNA im Komplex war. Ein weiterer Hinweis auf die geringe Kationisierung der Glycin-substituierten Dextrane war die fehlende Interaktion mit Zellen im Rahmen der Toxizitätsuntersuchungen. Sowohl bei Untersuchung der Viabilität von L929 murinen Fibroblasten als auch der Erythrozyten war keinerlei Toxizität durch DEXgly unabhängig vom Substitutionsgrad im untersuchten Bereich bis 1,09 und dem untersuchten Konzentrationsbereich der Polymere bis 500  $\mu\text{g/ml}$  feststellbar. Da die elektrostatische Interaktion kationischer Polymere mit DNA eine Voraussetzung für den Einsatz zum Gentransfer ist, wurde DEXgly in dieser Studie nicht weiter untersucht.

Im Unterschied zu Glycin lagen die  $\beta$ -Aminfunktion von  $\beta$ -Alanin und die  $\epsilon$ -Aminfunktion von Lysin mit einem  $pK_a$  von 8,4 bzw. 9,4 vermutlich bei physiologischem pH-Wert in höherem Maße kationisiert vor, so dass sich Komplexe mit ca. 100 nm hydrodynamischen Durchmesser bildeten. Allerdings war diese Komplexbildung auch abhängig vom Substitutionsgrad, was an der fehlenden Komplexbildung von mit  $\beta$ -Alanin substituiertem Dextran mit einem DS  $<0,21$  ersichtlich war. Dies zeigte sich auch daran, dass für DEXala mit DS  $>0,69$  und DEXlys mit DS  $\geq 0,77$  bereits bei geringen Polymermengen im Komplex (N/P 0,5) eine fast vollständige Bindung der pDNA mit  $<5\%$  unkondensierter pDNA zu beobachten war. Bei niedrigeren Substitutionsgraden von DEXlys war ein höheres N/P-Verhältnis für eine Kondensation nötig. Ähnliche Ergebnisse sind

für Arginin in Kombination mit Dextran nachgewiesen [205] und auch bei der Konjugation synthetischer Polymere, wie linearem PEI, an Dextran kam es mit steigendem Substitutionsgrad bereits bei niedriger Polymermenge zu einer stärkeren Bindung der DNA [116]. Der hydrodynamische Durchmesser von ca. 100 nm der Komplexe aus DEXala bzw. DEXlys und pDNA war geeignet für die Aufnahme in die Zellen [1, 207]. Der Polydispersitätsindex (PDI) zeigte eine mono- bis bimodale Partikelgrößenverteilung, die aufgrund von Aggregation, Instabilität oder nicht-sphärischer Form der Komplexe entstanden sein könnte. Zusammenfassend zeigten sowohl mit  $\beta$ -Alanin als auch mit Lysin substituierte Dextrane die Fähigkeit mit pDNA spontan stabile Komplexe im Größenbereich von 100 nm mit kationischer Oberflächenladung zu bilden, was laut Literatur die Transfektion begünstigt [20].

Die biologische Aktivität zeigte sich von Art der Aminosäure und Substitutionsgrad, nicht aber vom Stickstoffgehalt, abhängig. Beim Vergleich von DEXala und DEXlys bezüglich des Einflusses auf die Zellviabilität war eine niedrigere Aktivität für DEXlys beobachtbar, obwohl ein vergleichbarer DS bei Lysin aufgrund zweier Aminfunktionen auch einen doppelten Gehalt an Stickstoff zur Folge hatte (Tabelle 6). Dies konnte vor allem an der Zellviabilität der L929 murinen Fibroblasten sowie der Aggregation roter Blutkörperchen beobachtet werden. Mit steigender Polymerkonzentration nahm die Erythrozytenaggregation zu, wobei der Anstieg für DEXlys wesentlich geringer ausgeprägt war als für DEXala. Die geringere Toxizität von DEXlys würde die These der fehlenden Kationisierung der  $\alpha$ -Aminfunktion bei Glycin stützen, da mit Protonierung der  $\alpha$ -Aminfunktion von Lysin zusätzlich zur  $\epsilon$ -Aminfunktion eine höhere Toxizität bei gleichen Substitutionsgrad im Vergleich zu DEXala erwartet worden wäre. Auch der in den Transfektionsexperimenten gemessene Proteingehalt, als Indikator für das Zellwachstum, war mit den Zellviabilitätsstudien vergleichbar [111]. So fiel die Proteinkonzentration der mit  $\beta$ -Alanin substituierten Dextrane mit steigendem N/P-Verhältnis stärker ab als mit Lysin-substituierten Dextranen. In Bezug auf die Toxizität reichte die Konzentration der hier getesteten Aminosäuredextranester nicht für eine Lyse der Erythrozyten aus. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zur Literatur, wo Lysin konjugiert an Cholesterol oder  $\alpha$ -Tocopherol dem Ladungsdilemma einer gesteigerten Toxizität mit steigender Bindeeffizienz ausgesetzt war [161, 208]. Dies wies auf den Vorteil eines natürlichen Polymergrundgerüsts für die Kationisierung zum Gentransfer hin.

Während der Untersuchung der Transfektionseffizienz wiesen die mit Lysin substituierten Dextrane den gleichen Nachteil wie Poly-L-Lysin, nämlich eine geringe endosomale Freisetzung, auf [165]. Die Transfektionseffizienz konnte durch den Einsatz von Chloroquin, welches aufgrund seiner Basizität die Freisetzung aus dem Endosom verbessert [38], gesteigert werden. Im

Gegensatz zu DEXlys war für DEXala eine vom DS und N/P-Verhältnis abhängige Steigerung der Transfektionseffizienz feststellbar, was mit der Literatur zu mit Agmatin substituierten Dextranen korreliert [124]. DEXala-1.50 erreichte bei N/P 40 eine um den Faktor 360 höhere Transfektionseffizienz im Vergleich zu mit Lysin substituierten Dextranen. Durch den Einsatz von Chloroquin lag die Transfektionseffizienz von DEXala-1.50 bei N/P 40 nur noch um den Faktor 8,6 höher als DEXlys-0.77 bei N/P 40. Vergleich man die Transfektionseffizienz von DEXala-1.50 N/P 20 mit der von DEXmab-0.52 N/P 20 so wurde durch den Einsatz der natürlichen Aminosäure im Vergleich zu Methylaminobutytrat eine Steigerung der Transfektionseffizienz um den Faktor 4,3 erreicht. Dies ist insofern interessant, als das die molare Masse des Dextrans von DEXmab-0.52 mit 75.000 g/mol höher war als die des DEXala mit 60.000 g/mol. Aus der Literatur zu z. B. bPEI ist eine gesteigerte Transfektion mit steigender molarer Masse bekannt [64, 65]. Allerdings spielt auch der höhere Substitutionsgrad der mit  $\beta$ -Alanin im Vergleich zu mit Methylaminobutytrat substituierten Dextrane eine Rolle, da mit steigendem Substitutionsgrad mehr protonierbare Funktionen zur Verfügung stehen. Im Vergleich zu an Dextran mittels 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) gekoppeltem Polyethylenimin bei N/P 25 (CM0.3-dex-g-IPEI<sub>40</sub>) [116] zeigte DEXala-1.50 bei N/P 20 ebenfalls eine höhere Transfektionseffizienz. Das strukturelle Element einer C2-Gruppe zwischen Amin- und Carboxylfunktion, wie in  $\beta$ -Alanin, schien einen wesentlichen Einfluss auf die Transfektionseffizienz zu haben, was bereits bei Poly((2-dimethylamino)ethylmethacrylat) als vorteilhaft erkannt wurde [209]. Beim Vergleich des Schutzes vor DNase I wiederum zeigte mit Lysin substituiertes Dextran bereits bei DS  $\geq 0,61$  hervorragende protektive Eigenschaften, wohingegen für DEXala ein DS  $\geq 1,50$  nötig war. Der Schutz vor DNasen ist für Poly-L-Lysin bekannt und schien sich hier auch beim Einsatz von Lysin als Substituent an Dextran durch den Schutz der DNA vor enzymatischen Abbau positiv ausgewirkt zu haben [210].

Fasst man die Erkenntnisse zu den untersuchten Aminosäuren konjugiert an Dextran zusammen, so wurde Glycin aufgrund seiner fehlenden Fähigkeit der Kondensation der pDNA aus der Studie ausgeschlossen. Dagegen zeigten sowohl  $\beta$ -Alanin als auch Lysin neben der hervorragenden Kondensation von pDNA, Bildung kationischer Nanokomplexe und niedriger Toxizität weitere positive Eigenschaften. So wiesen mit  $\beta$ -Alanin konjugierte Dextrane einen starken Anstieg der Transfektionseffizienz mit steigendem DS und N/P-Verhältnis auf und Lysin substituierte Dextrane zeigten einen herausragenden Schutz vor DNase I selbst bei niedrigem DS. In dem Versuch die Vorteile beider Aminosäuren zu kombinieren, wurden sie in verschiedenen Mischungsverhältnissen an ein Dextran Grundgerüst konjugiert und auf ihre Eigenschaften für den Einsatz als Vektor zum Gentransfer untersucht.

Mit dem Ziel die mit Aminosäure modifizierten Dextrane als neu synthetisierte Klasse von Vektoren zum Gentransfer weiter zu optimieren, wurden  $\beta$ -Alanin und Lysin mit verschiedenen DS an ein Dextran Grundgerüst gekoppelt. Die Verteilung der Aminosäuren am Dextran erfolgte durch gleichzeitige Reaktion des Dextrans mit  $\beta$ -Alanin und Lysin zufällig. Wie bei der Kombination mehrerer Aminosäuren in CPPs zur Vereinigung ihrer vorteilhaften Eigenschaften für den Gentransfer [102, 202, 211] sollte auch hier mit dem gleichen Ziel eine Kombination der Aminosäuren konjugiert an Dextran erreicht werden. Vorteilhaft erwies sich die Kombination mehrerer Aminosäuren auch bei der Kationisierung von Tocopherol [161], wo die mit Dipeptiden aus Glycin und Histidin bzw. Glycin und Lysin konjugierten hydrophoben Strukturen eine um mindestens den Faktor 10 höhere Transfektionseffizienz im Vergleich zu den mit einfacher Aminosäure konjugierten zeigten. Um den Einfluss der einzelnen Aminosäuren am Dextran analysieren zu können wurden ausgehend von DEXala-0.42 lys-0.21 zwei Mischester mit höherem Anteil an  $\beta$ -Alanin (DEXala-0.68 lys-0.19 und DEXala-0.99 lys-0.16) und zwei Mischester mit höherem Lysinanteil (DEXala-0.43 lys-0.39 und DEXala-0.37 lys-0.53) synthetisiert. Bei der Untersuchung der neu synthetisierten Aminosäuredextranester ließen sich die Einflüsse der einzelnen Aminosäuren je nach Substitutionsgrad erkennen. So zeigten auch hier Vektoren mit höherem  $\beta$ -Alanin-Anteil (DEXala-0.68 lys-0.19 und DEXala-0.99 lys-0.16) bereits bei N/P 0,5 eine fast vollständige Bindung der DNA, während für Vektoren mit höherem Lysin-Anteil (DEXala-0.43 lys-0.21, DEXala-0.43 lys-0.39 und DEXala-0.37 lys-0.53) ein N/P >1 notwendig war. Dies hebt wiederum die vorteilhafte Struktur eines C2-Abstandes zwischen Amin- und Carboxylfunktion für die Bindeeffizienz hervor [209]. Alle synthetisierten Mischester formten mit pDNA Komplexe mit einer Größe von ca. 100 nm und einem positiven Zetapotential, was auf ihre Eignung als Vektor hinwies und aufgrund der vorherigen Ergebnisse aus der Untersuchung der Aminosäuredextranester zu erwarten war [169].

Bei der Untersuchung der Toxizität der Vektoren zeigte sich, wie auch bei den Monoestern, eine Abhängigkeit vom DS an  $\beta$ -Alanin und Konzentration des damit substituierten Dextrans. Ein höherer DS von Lysin mit gleich bleibendem DS an  $\beta$ -Alanin erhöhte die Toxizität nur geringfügig. Auch war im Vergleich zu den Monoestern bei gleichem DS an Mischestern eine höhere Viabilität der Zellen feststellbar. Damit wies der Anteil an Lysin einen günstigen Einfluss auf die Viabilität der Zellen auf. So lag die Viabilität L929 muriner Fibroblasten bei DEXala-0.69 im Vergleich zu DEXala-0.42 lys-0.21, das einen annähernd gleichen Gesamt-DS der Aminosäuren hatte, bei einer Polymerkonzentration von 500  $\mu$ g/ml um den Faktor 9 niedriger. Allerdings war dieser positive Einfluss bei einem geringeren Lysinanteil wie beispielsweise bei DEXala-0.99 lys-0.16 nicht mehr festzustellen. Vergleich man DEXala-0.99 lys-0.16 mit DEXala-1.16, welches den gleichen

Gesamt-DS aufwies, so zeigte sich kein Unterschied in der Viabilität. Analog zu den Viabilitätsstudien war auch bei der Untersuchung der Proteinsynthese eine verringerte Proteinkonzentration [111] bei Behandlung mit Komplexen mit höherem  $\beta$ -Alanin-Anteil (DEXala-0.68 lys-0.19 und DEXala-0.99 lys-0.16) mit steigendem DS und N/P-Verhältnis feststellbar. Im Unterschied dazu blieb die Proteinkonzentration der mit hohem Lysin-Anteil substituierten Dextrane (DEXala-0.43 lys-0.21, DEXala-0.43 lys-0.39 und DEXala-0.37 lys-0.53) analog zu DEXlys gleich der DNA ohne Vektor. Dieser Unterschied zeigte sich auch anhand der Erythrozytenaggregation. Hier war für die Dextrane mit hohem Lysinanteil (DEXala-0.43 lys-0.21, DEXala-0.43 lys-0.39 und DEXala-0.37 lys-0.53) eine doppelt so hohe Konzentration der Polymere nötig, um ein Aggregationsstadium 2, was einer leichten Aggregation mit vereinzelter Ausbildung „münzrollenartiger“ Strukturen entspricht, zu verursachen. Folglich hatte Lysin konjugiert mit  $\beta$ -Alanin an Dextran auch bei den Mischestern einen günstigen Einfluss auf die Viabilität der behandelten Zellen. Auch auf den Schutz vor DNase I hatte ein DS von Lysin  $\geq 0,53$  einen positiven Einfluss, während mit steigendem  $\beta$ -Alanin-Anteil kein Schutz vor DNase I erkennbar war. Die Transfektionseffizienz ließ sich einem hohen  $\beta$ -Alanin-Anteil zuordnen und stieg, wie auch bei DEXala bereits festgestellt wurde mit steigendem DS und N/P-Verhältnis. Im Unterschied dazu blieb die Transfektionseffizienz unabhängig vom DS bei den Mischestern mit hohem Lysinanteil (DEXala-0.43 lys-0.39 und DEXala-0.37 lys-0.53) gleich.

Zusammenfassend spiegelten sich die Eigenschaften der einzelnen Aminosäuren in den Mischestern wieder. Damit wurde die Struktur-Aktivitäts-Beziehung der untersuchten Aminosäuren an Dextran bestätigt und es eröffnet sich die Möglichkeit der Synthese maßgeschneiderter Vektoren zum Gentransfer durch Anpassung der DS der jeweiligen Aminosäuren am Polymergrundgerüst. Weiterhin können dieser Bibliothek weitere Aminosäuren z. B. Histidin [208, 212-216], Agmatin [124] oder Arginin [205, 212, 216, 217] hinzugefügt werden, deren Vorteile nach Analyse ebenfalls in die gemischten Ester eingebracht und so die Eigenschaften der Vektoren weiter optimiert werden.

Nicht-virale Vektoren werden bereits in vielen klinischen Studien untersucht. Dabei erwies sich die fehlende Stabilität von Komplexen in flüssigen Formulierungen als ein Nachteil [16, 182, 185, 218]. Die Instabilität begründet sich im Bestreben der Komplexe ihre Oberfläche zu verringern und so ihre thermodynamische Stabilität zu steigern, was zur Aggregation führt [182, 183]. Bisher zeigten nur wenige Komplexe eine Stabilität in Lösung über längere Zeit z. B. Lipopolyplexe mit DNA oder siRNA [184, 219]. Nach intensiver Suche nach optimalen Vektoren zum Gentransfer sollte die Stabilität der Komplexe aus DEXala-1.50 und DEXala-0.99 lys-0.16 untersucht und gegebenenfalls verbessert werden. Die Vektoren wurden gewählt, da sie in den bisherigen

Untersuchungen dieser Arbeit auf Eignung als Vektor die besten Ergebnisse hinsichtlich Transfektion zeigten. In einem ersten Versuch wurden die Komplexe nach Standardherstellung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Diese Methode wurde einerseits in der Literatur bereits zum erfolgreichen Stabilisieren von Komplexen aus Chitosan und DNA [220], sowie PEI und siRNA [183] verwendet. Außerdem ist sie technisch einfach, da Tiefkühlschränke zur gängigen Ausstattung von Laboren oder auch, für die spätere Anwendung gedacht, Krankenstationen gehören. Außerdem ist die Stabilität von DNA während des Einfrierens schon seit 50 Jahren bekannt [221]. In Folge des Einfrierens und der Rekonstitution konnte der hydrodynamische Durchmesser der Komplexe nicht mehr mittels DLS bestimmt werden, was für eine Polydispersität des Systems aufgrund von Zerfall oder Aggregation der Komplexe spricht. Dies könnte eine Folge der zu langsamen Eiskristallbildung sein. Die langsame Eiskristallbildung führt dabei zum Aufkonzentrieren und folglich zur stärkeren Interaktion der Komplexe [185]. Dieser Effekt wurde z. B. bei Lipoplexen [16] sowie Komplexen aus Chitosan und DNA [220] beschrieben. Interessanterweise verhielt sich die Transfektionseffizienz nach dem Auftauen von mit  $\beta$ -Alanin substituierten Dextran anders als der untersuchte Mischester mit  $\beta$ -Alanin und Lysin. Während bei ersterem die Transfektionseffizienz abnahm, stieg sie bei DEXala-0.99 lys-0.16 an. Eine mögliche Erklärung des Anstiegs wäre die Ausbildung großer Aggregate und folglich eine stärkere Sedimentation der Komplexe auf die adhärenen Zellen am Boden der Platte. Der Verlust der Transfektionseffizienz im Vergleich zu frisch hergestellten Komplexen könnte mit einer Aufspaltung eines Teils der Komplexe erklärt werden. Diese teilweise Dissoziation von Komplexen während der Lagerung wurde bereits für chitosan-basierte Vektoren beschrieben [220]. In diesem Fall schien der Lysinanteil im Mischester einen stabilisierenden Effekt auf den Komplex zu haben indem er die Aufspaltung des Komplexes verhinderte.

Als Alternative zum Einfrieren wurde die Gefriertrocknung angewandt, die durch den Entzug des Wassers den zusätzlichen Vorteil einer trockenen und damit weniger keimanfälligen Lagerform hat [16]. Außerdem sind gefriergetrocknete Formulierungen für die Anwendung am Patienten von medizinischem Personal einfach zu handhaben, da sie mit einem geeigneten Medium leicht zu rekonstituieren sind. Nach Gefriertrocknen der Komplexe, als milde Methode der Stabilisierung [182], und Rekonstitution wies die fehlende Korrelation der Brownschen Bewegung während der DLS-Messung erneut auf eine Aggregation der Komplexe hin. Der stabilisierende Einfluss von Dextran, das auch selbst als Kryoprotektor eingesetzt wird, war bei den Komplexen nicht feststellbar [222]. Es war allerdings sowohl für DEXala-1.50 als auch für DEXala-0.99 lys-0.16 eine Steigerung der Transfektionseffizienz feststellbar. Dies legte die Ausbildung aggregierter Komplexe nahe, was mit dem zusätzlich zum Einfrieren stattfindenden

Entzug von Wasser und der daraus folgenden weiteren Aufkonzentrierung der Komplexe begründet sein könnte [185]. Durch die Sedimentation dieser Aggregate könnte es, wie oben erwähnt, zu einer gesteigerten Kontaktzeit der Komplexe mit den Zellen und folglich einer verstärkten Transfektion kommen. Diese Ergebnisse standen im Gegensatz zum unstabilierten Gefriertrocknen von Polyplexen aus 25.000 und 800.000 g/mol bPEI und lPEI, wo die Transfektionseffizienz aufgrund der Dissoziation der Komplexe sank [187, 223, 224]. Um die Komplexe während der Gefriertrocknung zu stabilisieren, sollte im Folgenden der Einsatz von Kryo- und Lyoprotektoren untersucht werden [16, 218]. Der Unterschied zwischen Lyoprotektoren, welche während der Trocknungsphase stabilisieren, und Kryoprotektoren, welche während der Einfrierphase stabilisieren, liegt nicht an der Art ihrer Wirkung, sondern lediglich an der Definition. Kryo- und Lyoprotektoren stabilisieren während der Gefriertrocknung indem sie die Hydrathülle um die Formulierung durch Interaktion über die eigenen OH-Gruppen ersetzen. Zusätzlich bilden sie bei der Gefriertrocknung eine glasartige Hülle und reduzieren so die Beweglichkeit der gefriergetrockneten Substanz [186, 225]. Auch kann der Kryo- oder Lyoprotektor bei der Rekonstitution zur Isotonisierung der Lösung beitragen. Die Komplexe wurden deshalb in 5 % Glukose hergestellt und gefriergetrocknet, da für Glukose kryo- und lyoprotektive Eigenschaften beschrieben sind [226]. Für die Stabilisierung empfindlicher Makromoleküle wie Proteine ist ihre Anwendung lang bekannt [226]. Zusätzlich können sie eingesetzt werden, um nach der Rekonstitution eine isotonische Lösung zu ergeben [226]. Aus diesem Grund wurden für folgende Untersuchungen Komplexe in 5 % Glukose hergestellt. Dieser Zusatz fand bereits Anwendung bei Komplexen mit Polyethylenglycol gekoppelt an PEI-Poly- $\epsilon$ -Caprolacton-Partikeln (PEG-PCL-PEI) [17] und Oligoaminoamiden [188] und stabilisierte dort sowohl den hydrodynamischen Durchmesser der Komplexe als auch deren biologische Aktivität, wie die Transfektionseffizienz. Auch die Stabilisierung des hydrodynamischen Durchmessers von Komplexen aus DEXala-1.50 bzw. DEXala-0.99 lys-0.16 mit pDNA während der Gefriertrocknung und sofortigen Rekonstitution gelang mit dem Zusatz von 5 % Glukose. So war der hydrodynamische Durchmesser mittels DLS bestimmbar und stieg während der Gefriertrocknung und Rekonstitution an. Jedoch lag der hydrodynamische Durchmesser der Komplexe unterhalb von 200 nm und war folglich im geeigneten Bereich für die Zellaufnahme zum Gentransfer [1, 207]. Auch für 25.000 g/mol bPEI war die Steigerung des hydrodynamischen Durchmessers trotz Stabilisierung beschrieben [185]. Im Folgenden sollten die Komplexe mit der erfolgreich angewandten und etablierten Methode stabilisiert und über einen Zeitraum von drei Monaten gelagert werden. Zur Untersuchung auf Stabilität der Komplexe wurden ihr hydrodynamischer Durchmesser sowie die Transfektionseffizienz während der Lagerung getestet. Als Lagertemperaturen wurden 25 °C, 4 °C und -20 °C gewählt [182, 185, 187, 188], da diese einer



späteren Lagerung der fertigen Formulierung bei Raumtemperatur, im Kühlschrank oder im Tiefkühlschrank entspricht. Diese sollten als gängige Lagerorte für Arzneimittel in den anwendenden Institutionen vorhanden sein. Nach einer Woche, einem und drei Monaten war für DEXala-1.50 und DEXala-0.99 lys-0.16 nur eine geringfügige Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers während der Lagerung bei 4 °C und -20 °C feststellbar. Der hydrodynamische Durchmesser blieb <200 nm und zeigte damit die Eignung der Komplexe zur Transfektion [15, 32]. Während der Lagerung bei Raumtemperatur kam es zum Anstieg des hydrodynamischen Durchmessers der Komplexe, so dass nach drei Monaten keine Korrelation der Brownschen Bewegung mittels DLS gemessen werden konnte. Wie aus der Literatur zu Komplexen aus Chitosan bekannt, könnte der Grund auch hier eine Aggregation der Komplexe gewesen sein [220]. Eine Stabilisierung der Komplexe aus Plasmid-DNA (pDNA) und DEXala-1.50 bzw. DEXala-0.99 lys-0.16 konnte also bei Lagerung bei Raumtemperatur mit der angewandten Methode nicht gewährleistet werden. Wiederum zeigten die Transfektionseffizienzen für Komplexe aus DEXala-1.50 und pDNA bei Raumtemperatur stabile Werte über die Lagerdauer und glichen nach drei Monaten Lagerung denen der frisch hergestellten Komplexe. Dahingegen kam es während der Lagerung bei 4 °C bzw. -20 °C zu einer Abnahme der Transfektionseffizienz. Dieses Absinken nach Gefriertrocknung und Lagerung bei 4 °C wurde z. B. für Polyplexe aus 25.000 g/mol bPEI und pDNA [185] bereits beschrieben. Für Komplexe aus DEXala-0.99 lys-0.16 und pDNA zeigte sich während der Lagerung bei Raumtemperatur eine stabile Transfektionseffizienz über die Lagerdauer von drei Monaten. Im Unterschied dazu sanken, wie auch bei Komplexen aus DEXala-1.50 und pDNA, die Transfektionseffizienzen aller Komplexe im Vergleich zu den direkt vor dem Versuch hergestellten Komplexen über die Lagerdauer. Für eine Stabilisierung der Komplexe war also eine Gefriertrocknung und Lagerung bei niedrigen Temperaturen von 4 °C oder -20 °C nötig, wohingegen die Transfektionseffizienz während der Lagerung bei 25 °C erhalten blieb.

In einer weiteren Studie sollten die Auswirkungen des während der Gefriertrocknung, durch das Einfrieren und die Trocknung, auf die Komplexe einwirkenden Stresses [16, 218] untersucht werden. Dafür wurden die in 5 % Glukose hergestellten Komplexe aus DEXala-1.50 bzw. DEXala-0.99 lys-0.16 und pDNA mehrfach gefriergetrocknet und wieder rekonstituiert und der Einfluss auf den hydrodynamischen Durchmesser und das Zetapotential untersucht. Dabei kam es für Komplexe aus DEXala-1.50 und pDNA zu einer leichten Steigerung des hydrodynamischen Durchmessers nach sieben Gefriertrocknungs- und Rekonstitutionszyklen. Ein ähnliches Verhalten ist für nicht-virale Vektoren zum Gentransfer bereits beschrieben. So zeigten auch Formulierungen aus linearem PEI [182, 185] und Oligoaminoamiden [188] vom Stabilisator

unabhängige Steigerung des hydrodynamischen Durchmessers nach mehreren Gefriertrocknungs- und Rekonstitutionszyklen. Ähnlich verhielt sich auch DEXala-0.99 lys-0.16, wobei die Steigerung des hydrodynamischen Durchmessers bei N/P 10 besonders stark ausgeprägt war. Dies könnte an einer schwächeren Stabilisierung des Komplexes im Vergleich zu höheren N/P-Verhältnissen liegen könnte. Der hydrodynamische Durchmesser blieb aber trotz Steigerung unterhalb von 200 nm und zeigte damit, dass die Komplexe weiterhin für eine Transfektion geeignet waren. Das Zetapotential blieb über sieben Zyklen annähernd konstant, was ein Hinweis auf eine fehlende Dissoziation der Komplexe ist. In diesem Fall wäre ein Abfallen des Zetapotentials zu erwarten gewesen [223]. Folglich stabilisierte die Gefriertrocknung in 5 % Glukose die Formulierung der pDNA im Komplex mit DEXala-1.50 bzw. DEXala-0.99 lys-0.16 auch unter dem Stress mehrerer Gefriertrocknungs- und Rekonstitutionszyklen.

Zusammenfassend war mittels Einfrieren auf -20 °C und Gefriertrocknung ohne Stabilisatoren eine stabile Transfektion der Komplexe aus DEXala-1.50 bzw. DEXala-0.99 lys-0.16 und pDNA zu beobachten. Allerdings waren die hydrodynamischen Durchmesser der Komplexe nicht mehr bestimmbar. Mit dem Einsatz von 5 % Glukose und Gefriertrocknung wurde eine Möglichkeit der Stabilisierung der Aminosäuredextranester über einen längeren Zeitraum bei verschiedenen Lagertemperaturen gefunden. Dabei zeigte die Lagerung bei 25 °C die besten Ergebnisse in Bezug auf die Transfektionseffizienz. Die Stabilisierung mit 5 % Glukose erlaubte auch das wiederholte Gefriertrocknen ohne Verlust der kationischen Nanokomplexe der Formulierung. Um die Stabilisierung über einen längeren Lagerungszeitraum im Hinblick auf die physikochemischen Eigenschaften, wie dem hydrodynamischen Durchmesser, weiter zu optimieren, könnten eine Reihe anderer Kryo- und Lyoprotektoren untersucht werden. Dabei könnte auch eine Kombination sinnvoll sein [218]. Aus der Literatur ist ersichtlich, dass es keine universal anwendbare Lösung für alle Komplexe gibt. So zeigte z. B. Glukose eine Konservierung der Eigenschaften von Komplexen aus PEG-PCL-PEI und siRNA [17] oder Komplexen aus pDNA und Polyethylenglycol gekoppelt an PEI mit einem „Endothelial-Growth-Factor“-Rezeptortargeting [227]. Im Unterschied dazu zeigten Komplexe aus pDNA und mit Hydroxyethylstärke modifiziertem PEI keine Stabilität nach Gefriertrocknung in Glukoselösung [185]. Sucht man nach Stabilisierungsmöglichkeiten für aminosäurehaltige Vektoren findet man z. B. Komplexe aus Poly-L-Lysin und pDNA, deren Stabilisierung mit Hilfe von Saccharose gelang [187] oder Komplexe aus Oligoaminen und siRNA, bei denen keine Stabilisierung in Hydroxypropylbetadextran zu beobachten war. Hier war der Einsatz von Saccharose, Laktosaccharose oder Trehalose nötig, um die Komplexe im Hinblick auf hydrodynamischen Durchmesser und Knock-Down-Effizienz zu stabilisieren [188]. Folglich

---

könnte mit dem Einsatz weiterer Kryo- und Lyoprotektoren das bestehende System der Stabilisierung mittels 5 % Glukose weiter verbessert werden.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein innovativer Vektor zum Gentransfer entwickelt. Im Unterschied zu dem synthetischen Polyethylenimin als Goldstandard polymerer Vektoren war das Ziel die Entwicklung eines natürlichen, biokompatiblen und bioabbaubaren Vektors. Dieser sollte einfach zu modifizieren sein und sich für die Anwendung als Trägersystem für Nukleinsäuren in seinen Eigenschaften maßgeschneidert anpassen lassen.

Aus diesem Grund wurden auf der Suche nach passenden Trägersystemen die aus Glukose bestehenden Polymere Dextran und Zellulose gewählt. Beide brachten die Vorteile der Biokompatibilität mit sich. Durch die zahlreichen Hydroxylgruppen der Anhydroglukoseeinheiten war eine einfache Modifikation zur Kationisierung gegeben. Zum direkten Vergleich wurden beide Polymere mit verschiedenen Substitutionsgraden an Methylaminobutyrat modifiziert. Diese Modifikation bot ein sekundäres Amin als kationisierbare Gruppe, um die elektrostatische Interaktion mit der anionischen Nukleinsäure möglich zu machen. Im Vergleich der Eignung als Trägersystem für Plasmid-DNA (pGL3) konnte sowohl für Dextran als auch für Zellulose eine hervorragende Komplexierung und Kondensation von DNA festgestellt werden. Dabei zeigte sich die kationisierte Zellulose als Grundgerüst im Hinblick auf die Bindeeffizienz für pGL3 und Schutz vor DNasen dem modifizierten Dextran überlegen. Für Dextran und pGL3 konnte die Ausbildung kationischer Nanokomplexe nachgewiesen werden, was für eine Aufnahme in die Zellen von Vorteil ist. Im Hinblick auf die Toxizität *in vitro* erwies sich Dextran der Zellulose überlegen und zeigte keinerlei Aggregation der Erythrozyten. Sowohl Dextran als auch Zellulose zeigten eine geringe Toxizität, die mit steigender Polymerkonzentration an L929 murinen Fibroblasten anstieg. Eine Toxizität hinsichtlich der Lyse roter Blutzellen war nicht feststellbar. Nach der Behandlung mit den Polymeren stieg mit steigendem N/P-Verhältnis und Substitutionsgrad die Transfektionseffizienz *in vitro*. Die Steigerung der Transfektionseffizienz war für das modifizierte Dextran ausgeprägter als für die kationisierte Zellulose, weshalb die weitere Optimierung des Vektors mit Dextran als Grundgerüst fortgesetzt wurde.

Um das natürliche Polymer Dextran mit einer gut biokompatiblen natürlichen Substanz zu modifizieren, wurden verschiedene Aminosäuren auf ihre Eignung zur Kationisierung des Dextrangrundgerüsts systematisch untersucht. Aufgrund der bisherigen Untersuchungen auf Eignung als Vektor zum Gentransfer an lipophilen Trägersystemen, in zellpenetrierenden Peptiden (CPPs) und polymerisiert fiel die Wahl auf Glycin,  $\beta$ -Alanin und Lysin. Diese Aminosäuren unterscheiden sich einerseits im  $pK_a$ -Wert ihrer Aminfunktion(en) und dem Abstand zwischen Carboxylfunktion und Aminfunktion. Ihre Carboxylfunktion bot dabei eine einfache Möglichkeit

der Kopplung über eine Esterbindung an die Hydroxylgruppen des Dextrans. Die primären Aminfunktionen dienten als kationisierbare Gruppe, um die elektrostatischen Wechselwirkungen mit DNA zu ermöglichen. Im Rahmen der Untersuchung zeigte sich keine Toxizität des Glycin-substituierten Dextrans im Bereich der untersuchten Substitutionsgrade. Die geringe Reduktion der Zellviabilität L929 muriner Fibroblasten nach Behandlung mit Lysin- oder  $\beta$ -Alanin-Dextran-Derivate stieg mit steigendem Substitutionsgrad und Konzentration an, wobei der Anstieg für Lysin geringer ausgeprägt war als für  $\beta$ -Alanin. Im Gegensatz dazu ließ sich die Kondensation des pGL3 mit  $\beta$ -Alanin > Lysin > Glycin beschreiben. Dabei war sowohl für  $\beta$ -Alanin- als auch für Lysin-substituiertes Dextran eine geringe Polymerkonzentration für eine fast vollständige Bindung des pGL3 notwendig. Untersuchte man den Schutz vor Nukleasen zeigte sich Lysin dem  $\beta$ -Alanin überlegen, da bei gleicher Polymerkonzentration die Hälfte des Substitutionsgrades am Dextran für den Schutz vor DNase I ausreichte. Dennoch wiesen beide einen Schutz vor DNasen ebenso wie eine mit steigendem Substitutionsgrad der Aminosäure am Dextran und steigender Polymerkonzentration im Komplex steigende Transfektionseffizienz auf. Der Anstieg der Transfektionseffizienz war für mit  $\beta$ -Alanin substituierte Dextrane größer als für mit Lysin substituierte, deren Transfektionseffizienz sich unter Zugabe von Chloroquin steigern ließ.

Da eine Verknüpfung verschiedener Aminosäuren zur Kombination ihrer Eigenschaften für zellpenetrierende Peptide bekannt ist, wurden für die folgende Untersuchung Lysin und  $\beta$ -Alanin an ein Dextrangrundgerüst konjugiert und so erfolgreich ihre herausragenden Eigenschaften, wie hohe Transfektionseffizienz und Schutz vor DNasen kombiniert. Die Eigenschaften dieses neu entwickelten Vektors mit Lysin und  $\beta$ -Alanin konjugiert an ein Dextrangrundgerüst lassen sich individuell durch den Substitutionsgrad der konjugierten Aminosäure anpassen. Zusätzlich bietet dieser Vektor die Basis für weitere Entwicklungen. So könnten weitere Aminosäuren mit vorteilhaften Eigenschaften an Dextran konjugiert werden, wie z. B. Arginin, dessen Guanidinfunktion die Zellmembranpenetration verbessert oder auch Histidin oder Valin, welche in CPPs zur endosomalen Freisetzung oder zur DNA-Kondensierung eingesetzt werden. In weiteren Arbeiten sollte eine systematische Untersuchung der Eigenschaften weiterer Aminosäuren an Dextran untersucht werden, um den hier entwickelten Vektor weiter zu optimieren.

Die in dieser Arbeit entwickelten Vektoren wurden außerdem hinsichtlich ihrer Lagerstabilität untersucht und optimiert. So konnten die Komplexe aus dem Aminosäuredextranestern und pGL3 ohne Verlust ihrer Transfektionseffizienz bei  $-20\text{ °C}$  oder nach Gefriertrocknung eingesetzt werden. Der zusätzliche Einsatz von 5 % Glukose im Herstellungsmedium und anschließende

Gefriertrocknung sorgte über drei Monate für einen stabilen hydrodynamischen Durchmesser der Komplexe während der Lagerung bei 4 °C oder -20 °C und einer konstante Transfektionseffizienz bei Lagerung bei 25 °C.

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit der direkte Vergleich zwischen kationisierten Dextranen und Zellulosen in Bezug auf ihre Eignung als Vektor zum Gentransfer gezogen. Aufgrund ihrer vorteilhaften Eigenschaften wurden weitere kationisierte Dextrane entwickelt und durch die Konjugation von Aminosäuren eine neue innovative Gruppe Vektoren synthetisiert. Dabei zeigten sich Lysin- und  $\beta$ -Alanin-konjugierte Dextrane als eine herausragende Klasse von Trägersystemen zum Gentransfer, die eine Basis zur weiteren Modifikation durch zusätzliche Aminosäuren bietet. Außerdem gelang es die Lagerung der Komplexe zu optimieren, so dass die Formulierung nach Gefriertrocknung jederzeit mittels einfacher Rekonstitution für die Anwendung bereit ist.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Mintzer, M.A. and E.E. Simanek, *Nonviral vectors for gene delivery*. Chemical Reviews, 2009. **109**(2): p. 259-302.
2. Watson, J.D. and F.H. Crick, *The structure of DNA*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 1953. **18**: p. 123-31.
3. Keeler, C.E., *Gene therapy*. Journal of Heredity, 1947. **38**(10): p. 294-8.
4. EMA. *Ranibizumab - Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels* 2007 [cited 2015 16.07.]; Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/de\\_DE/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000715/WC500043546.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000715/WC500043546.pdf).
5. EMA. *Gardasil - Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels*. 2009 [cited 2015 16.07.]; Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/de\\_DE/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000703/WC500021142.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000703/WC500021142.pdf).
6. Kaestner, L., A. Scholz, and P. Lipp, *Conceptual and technical aspects of transfection and gene delivery*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2015. **25**(6): p. 1171-1176.
7. Kohro, Y., et al., *A new minimally-invasive method for microinjection into the mouse spinal dorsal horn*. Scientific Reports, 2015. **5**: p. 14306.
8. Palima, D., et al., *Wave-guided optical waveguides*. Optics Express, 2012. **20**(3): p. 2004-2014.
9. Lamichhane, T.N., R.S. Raiker, and S.M. Jay, *Exogenous DNA loading into extracellular vesicles via electroporation is size-dependent and enables limited gene delivery*. Molecular Pharmaceutics, 2015. **12**(10): p. 3650-3657.
10. Fischer, D. *In vivo fate of polymeric gene carriers*. in *Biomaterials for Delivery and Targeting of Proteins and Nucleic Acids*. 2005. Marburg: CRC Press LLC.
11. Jones, C.H., et al., *Overcoming nonviral gene delivery barriers: Perspective and future*. Molecular Pharmaceutics, 2013. **10**(11): p. 4082-4098.
12. Schlenk, F., S. Grund, and D. Fischer, *Recent developments and perspectives on gene therapy using synthetic vectors*. Therapeutic Delivery, 2013. **4**(1): p. 95-113.
13. Ramamoorth, M. and A. Narvekar, *Non viral vectors in gene therapy- an overview*. Journal of Clinical and Diagnostic Research, 2015. **9**(1): p. GE01-GE06, 6 pp.
14. Xu, L. and T. Anchordoquy, *Drug delivery trends in clinical trials and translational medicine: Challenges and opportunities in the delivery of nucleic acid-based therapeutics*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011. **100**(1): p. 38-52.
15. Steichen, S.D., M. Caldorera-Moore, and N.A. Peppas, *A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013. **48**(3): p. 416-427.
16. Anchordoquy, T.J. and G.S. Koe, *Physical stability of nonviral plasmid-based therapeutics*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2000. **89**: p. 289-296.
17. Endres, T., et al., *Lyophilized ready-to-use formulations of PEG-PCL-PEI nano-carriers for siRNA delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2012. **428**: p. 121-124.
18. Golan, R., et al., *DNA toroids: Stages in condensation*. Biochemistry, 1999. **38**(42): p. 14069-14076.
19. Ravikant, G., *Lipoplexes: a non-viral gene delivery vehicle*. World Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014. **3**(8): p. 1577-1599.
20. Gebhart, C.L. and A.V. Kabanov, *Evaluation of polyplexes as gene transfer agents*. Journal of Controlled Release, 2001. **73**: p. 401-416.
21. Martin, M.E. and K.G. Rice, *Peptide-guided gene delivery*. American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Journal, 2007. **9**(1): p. E18-E29.
22. Kapoor, M., D.J. Burgess, and S.D. Patil, *Physicochemical characterization techniques for lipid based delivery systems for siRNA*. International Journal of Pharmaceutics, 2012. **427**(1): p. 35-57.
23. Choi, J.-S., et al., *Size-controlled biodegradable nanoparticles: Preparation and size-dependent cellular uptake and tumor cell growth inhibition*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014. **122**: p. 545-551.

24. Liechty, W.B. and N.A. Peppas, *Expert opinion: Responsive polymer nanoparticles in cancer therapy*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2012. **80**(2): p. 241-6.
25. Tenzer, S., et al., *Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology*. Nature Nanotechnology, 2013. **8**(10): p. 772-781.
26. He, Z., et al., *A low protein binding cationic poly(2-oxazoline) as non-viral vector*. Macromolecular Bioscience, 2015. **15**(7): p. 1004-20.
27. Yin, H., et al., *Non-viral vectors for gene-based therapy*. Nature Reviews Genetics, 2014. **15**(8): p. 541-555.
28. Ogris, M., et al., *PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery*. Gene Therapy, 1999. **6**: p. 595-605.
29. Kichler, A. and S, *Gene transfer with modified polyethylenimines*. 2004, John Wiley & Sons, Ltd. p. S3-S10.
30. Liu, Y.M. and T.M. Reineke, *Hydroxyl stereochemistry and amine number within poly(glycoamidoamine)s affect intracellular DNA delivery*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(9): p. 3004-3015.
31. Kc, R.B., C. Kucharski, and H. Uludag, *Additive nanocomplexes of cationic lipopolymers for improved non-viral gene delivery to mesenchymal stem cells*. Journal of Materials Chemistry B, 2015. **3**(19): p. 3972-3982.
32. Grund, S., M. Bauer, and D. Fischer, *Polymers in drug delivery - state of the art and future trends*. Advanced Materials, 2011. **13**(3): p. B61-B87.
33. Caracciolo, G., et al., *Surface adsorption of protein corona controls the cell internalization mechanism of DC-Chol-DOPE/DNA lipoplexes in serum*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2010. **1798**(3): p. 536-543.
34. Singh, D., S.S. Han, and E.J. Shin, *Polysaccharides as nanocarriers for therapeutic applications*. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2014. **10**(9): p. 2149-2172.
35. Rejman, J., M. Conese, and D. Hoekstra, *Gene transfer by means of lipo- and polyplexes: role of clathrin and caveolae-mediated endocytosis*. Journal of Liposome Research, 2006. **16**(3): p. 237-247.
36. Jones, C.H., et al., *Synthesis of cationic polylactides with tunable charge densities as nanocarriers for effective gene delivery*. Molecular Pharmaceutics, 2013. **10**(3): p. 1138-1145.
37. Sahay, G., et al., *Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling*. Nature Biotechnology, 2013. **31**(7): p. 653-658.
38. Varkouhi, A.K., et al., *Endosomal escape pathways for delivery of biologicals*. Journal of Controlled Release, 2011. **151**(3): p. 220-228.
39. Gilleron, J., et al., *Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape*. Nature Biotechnology, 2013. **31**(7): p. 638-646.
40. Balazs, D.A. and W.T. Godbey, *Liposomes for use in gene delivery*. Journal of Drug Delivery, 2011: p. 326497, 12 pp.
41. ur Rehman, Z., D. Hoekstra, and I.S. Zuhorn, *Mechanism of polyplex- and lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: Real-time visualization of transient membrane destabilization without endosomal lysis*. ACS Nano, 2013. **7**(5): p. 3767-3777.
42. van der Aa, M.A.E.M., et al., *The nuclear pore complex: The gateway to successful nonviral gene delivery*. Pharmaceutical Research, 2006. **23**(3): p. 447-459.
43. Ward, C.M., M.L. Read, and L.W. Seymour, *Systemic circulation of poly(L-lysine)/DNA vectors is influenced by polycation molecular weight and type of DNA: differential circulation in mice and rats and the implications for human gene therapy*. Blood, 2001. **97**(8): p. 2221-2229.
44. Wentz, S.R., *Gatekeepers of the nucleus*. Science, 2000. **288**(5470): p. 1374-1377.
45. Ginn, S.L., et al., *Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update*. Journal of Gene Medicine, 2013. **15**(2): p. 65-77.
46. Gascón, A.R., A.d. Pozo-Rodríguez, and M.Á. Solinís, *Non-viral delivery systems in gene therapy*, in *Gene Therapy - Tools and Potential Applications*, F. Martin Molina, Editor. 2013, InTech: Rijeka, Croatia. p. 3-33.



47. Weinberg, M.S., et al., *Recombinant adeno-associated virus utilizes cell-specific infectious entry mechanisms*. Journal of Virology, 2014. **88**(21): p. 12472-84.
48. Tatum, E.L., *Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine*. Perspectives in Biology and Medicine, 1966. **10**(1): p. 19-32.
49. Patil, S.D., D.G. Rhodes, and D.J. Burgess, *DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: A comprehensive review*. American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Journal, 2005. **7**(1): p. E61-E77.
50. Buonaguro, F.M., et al., *Oncolytic virus therapies*. Pharmaceutical patent analyst, 2012. **1**(5): p. 621-627.
51. Choksakulnimitr, S., et al., *In-vitro cytotoxicity of macromolecules in different cell-culture systems*. Journal of Controlled Release, 1995. **34**(3): p. 233-241.
52. Büning, H., *Gentherapie – Was ist das? “Heilen” mit Genen*. Pharmazie in unserer Zeit, 2011. **40**(3): p. 194-201.
53. Boeckle, S. and E. Wagner, *Optimizing targeted gene delivery: chemical modification of viral vectors and synthesis of artificial virus vector systems*. American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Journal, 2006. **8**(4): p. E731-42.
54. Lostal, W., et al., *Full-length dystrophin reconstitution with adeno-associated viral vectors*. Human Gene Therapy, 2014. **25**(6): p. 552-562.
55. Hosseinkhani, H., et al., *Polymers in gene therapy technology*. Polymers for Advanced Technologies, 2015. **26**(2): p. 198-211.
56. Wiley. *Phases of gene therapy clinical trials*. 2015 [cited 2015 28.07.]; Available from: <http://www.abedia.com/wiley/phases.php>.
57. Wiley. *Vectors used in gene therapy clinical trials*. 2015 [cited 2015 28.07.]; Available from: <http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>.
58. Vaheri, A. and J.S. Pagano, *Infectious poliovirus RNA: a sensitive method of assay*. Virology, 1965. **27**(3): p. 434-436.
59. Felgner, P.L., et al., *Lipofection - a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1987. **84**(21): p. 7413-7417.
60. Zhang, X.-X., T.J. McIntosh, and M.W. Grinstaff, *Functional lipids and lipoplexes for improved gene delivery*. Biochimie, 2012. **94**(1): p. 42-58.
61. Tros de Ilarduya, C., Y. Sun, and N. Düzgüneş, *Gene delivery by lipoplexes and polyplexes*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010. **40**(3): p. 159-170.
62. Reissmann, S., *Cell penetration: scope and limitations by the application of cell-penetrating peptides*. Journal of Peptide Science, 2014. **20**(10): p. 760-784.
63. Samal, S.K., et al., *Cationic polymers and their therapeutic potential*. Chemical Society Reviews, 2012. **41**(21): p. 7147-94.
64. Godbey, W.T., K.K. Wu, and A.G. Mikos, *Size matters: Molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle*. Journal of Biomedical Materials Research, 1999. **45**(3): p. 268-275.
65. Guo, Q., et al., *Diol glycidyl ether-bridged low molecular weight PEI as potential gene delivery vehicles*. Journal of Materials Chemistry B, 2015. **3**(13): p. 2660-2670.
66. Englert, C., et al., *Enhancing the biocompatibility and biodegradability of linear poly(ethylene imine) through controlled oxidation*. Macromolecules, 2015. **48**(20): p. 7420-7427.
67. Fischer, D., et al., *In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis*. Biomaterials, 2003. **24**(7): p. 1121-1131.
68. Hoebel, S. and A. Aigner, *Polyethylenimines for siRNA and miRNA delivery in vivo*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2013. **5**(5): p. 484-501.
69. Boussif, O., et al., *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**: p. 7297-301.
70. Tian, H., et al., *RGD targeting hyaluronic acid coating system for PEI-PBLG polycation gene carriers*. Journal of Controlled Release, 2011. **155**(1): p. 47-53.

71. Khan, W., et al., *Polysaccharide gene transfection agents*. Acta Biomaterialia, 2012. **8**(12): p. 4224-4232.
72. Pasteur, L., *Sur la fermentation visqueuse et la fermentation butyrique*. Bulletin de la Société Chimique de France, 1861: p. 30-31.
73. Heinze, T., et al., *Functional polymers based on dextran*. Advances in Polymer Science, 2006. **205**: p. 199-291.
74. Varshosaz, J., *Dextran conjugates in drug delivery*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2012. **9**(5): p. 509-523.
75. Rosenfeld, E.L. and I.S. Lukomskaya, *The splitting of dextran and isomaltose by animal tissues*. Clinica Chimica Acta, 1957. **2**(2): p. 105-14.
76. Sery, T.W. and E.J. Hehre, *Degradation of dextrans by enzymes of intestinal bacteria*. Journal of Bacteriology, 1956. **71**(3): p. 373-80.
77. Huang, G., et al., *Two Important polysaccharides as carriers for drug delivery*. Mini Rev Med Chem, 2015. **15**(13): p. 1103-9.
78. Baldwin, A.D. and K.L. Kiick, *Polysaccharide-modified synthetic polymeric biomaterials*. Biopolymers, 2010. **94**(1): p. 128-140.
79. Forster, H., *Artificial blood substitutes*. Chirurg, 1994. **65**(12): p. 1085-94.
80. Dubick, M.A., et al., *Dextran metabolism following infusion of 7.5% sodium chloride dextran-70 to euvoletic and hemorrhaged rabbits*. Drug Development Research, 1992. **25**(1): p. 29-38.
81. Van Tomme, S.R. and W.E. Hennink, *Biodegradable dextran hydrogels for protein delivery applications*. Expert Review of Medical Devices, 2007. **4**(2): p. 147-164.
82. Cadée, J.A., et al., *In vivo biocompatibility of dextran-based hydrogels*. Journal of Biomedical Materials Research, 2000. **50**(3): p. 397-404.
83. De Groot, C.J., et al., *In vitro biocompatibility of biodegradable dextran-based hydrogels tested with human fibroblasts*. Biomaterials, 2001. **22**(11): p. 1197-1203.
84. Passirani, C. and J.-P. Benoit, *Complement activation by injectable colloidal drug carriers*, in *Biomaterials for Delivery and Targeting of Proteins and Nucleic Acids*, R.I. Mahato, Editor. 2005, CRC Press LLC: Boca Raton. p. 187-230.
85. Fagnani, R., M.S. Hagan, and R. Bartholomew, *Reduction of immunogenicity by covalent modification of murine and rabbit immunoglobulins with oxidized dextrans of low molecular weight*. Cancer Research, 1990. **50**(12): p. 3638-45.
86. Mehvar, R., *Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents*. Journal of Controlled Release, 2000. **69**(1): p. 1-25.
87. Jackson, M.R. and G.P. Clagett, *Antithrombotic therapy in peripheral arterial occlusive disease*. Chest, 2001. **119**(1, Suppl.): p. 283S-299S.
88. Boldt, J., *Do plasma substitutes have additional properties beyond correcting volume deficits?* Shock, 2006. **25**(2): p. 103-116.
89. Salazar Vazquez, B.Y., et al., *Microvascular experimental evidence on the relative significance of restoring oxygen carrying capacity vs. blood viscosity in shock resuscitation*. Biochimica et Biophysica Acta, Proteins Proteomics, 2008. **1784**(10): p. 1421-1427.
90. Hovgaard, L. and H. Brøndsted, *Dextran hydrogels for colon-specific drug delivery*. Journal of Controlled Release, 1995. **36**(1-2): p. 159-166.
91. Borteh, H.M., et al., *Electrospun acetalated dextran scaffolds for temporal release of therapeutics*. Langmuir, 2013. **29**(25): p. 7957-7965.
92. Unnithan, A.R., et al., *Wound-dressing materials with antibacterial activity from electrospun polyurethane-dextran nanofiber mats containing ciprofloxacin HCl*. Carbohydrate Polymers, 2012. **90**(4): p. 1786-1793.
93. Hennink, W.E. and R.J.H. Stenekes, *Dextran hydrogels for pharmaceutical, medical and biotechnological uses*. 2002, Octopus B.V., Neth. . p. 17 pp.
94. Kim, M.K., et al., *Surface modification of silk fibroin nanofibrous mat with dextran for wound dressing*. Fibers and Polymers, 2014. **15**(6): p. 1137-1145.

95. Sun, G., et al., *Dextran hydrogel scaffolds enhance angiogenic responses and promote complete skin regeneration during burn wound healing*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(52): p. 20976-20981, S20976/1-S20976/5.
96. Li, F. and X. Yu, *Cost-effectiveness analysis on recombinant bovine basic fibroblast growth factor eye drops combined with dextran 70 and glycerol eye drops in treatment of dry eye syndrome*. Xiandai Zhongxiyi Jiehe Zazhi, 2013. **22**(36): p. 4010-4012.
97. Nishikawa, M., et al., *Demonstration of the receptor-mediated hepatic uptake of dextran in mice*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1992. **44**(5): p. 396-401.
98. Vansteenkiste, S., et al., *Fate of glycosylated dextrans after in vivo administration*. Journal of Controlled Release, 1991. **16**(1-2): p. 91-9.
99. Yeo, W.W.Y., et al., *Safety profile of dextran-spermine gene delivery vector in mouse lungs*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2014. **14**(5): p. 3328-3336.
100. Delgado, D., et al., *Dextran-protamine-solid lipid nanoparticles as a non-viral vector for gene therapy: In vitro characterization and in vivo transfection after intravenous administration to mice*. International Journal of Pharmaceutics, 2012. **425**(1-2): p. 35-43.
101. Beloqui, A., et al., *Dextran-protamine coated nanostructured lipid carriers as mucus-penetrating nanoparticles for lipophilic drugs*. International Journal of Pharmaceutics, 2014. **468**(1-2): p. 105-111.
102. Tang, Q., et al., *Dextran-peptide hybrid for efficient gene delivery*. Langmuir, 2014. **30**(18): p. 5202-5208.
103. Thomas, J.J., M.R. Rekha, and C.P. Sharma, *Dextran-protamine polycation: An efficient nonviral and haemocompatible gene delivery system*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010. **81**(1): p. 195-205.
104. Li, W.-B., et al., *Functional study of dextran-graft-poly((2-dimethyl amino)ethyl methacrylate) gene delivery vector for tumor therapy*. Journal of Biomaterials Applications, 2012. **28**(1): p. 125-35.
105. Wang, Z.H., et al., *Functionalized nonionic dextran backbones by atom transfer radical polymerization for efficient gene delivery*. Macromolecules, 2011. **44**(2): p. 230-239.
106. Wang, Z.-H., et al., *Biocleavable comb-shaped gene carriers from dextran backbones with bioreducible ATRP initiation sites*. Biomaterials, 2012. **33**(6): p. 1873-1883.
107. Raemdonck, K., et al., *Dextran microgels for time-controlled delivery of siRNA*. Advanced Functional Materials, 2008. **18**(7): p. 993-1001.
108. Raemdonck, K., et al., *Biodegradable dextran nanogels for RNA interference: focusing on endosomal escape and intracellular siRNA delivery*. Advanced Functional Materials, 2009. **19**(9): p. 1406-1415.
109. Naeye, B., et al., *PEGylation of biodegradable dextran nanogels for siRNA delivery*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010. **40**(4): p. 342-351.
110. Naeye, B., et al., *Hemocompatibility of siRNA loaded dextran nanogels*. Biomaterials, 2011. **32**(34): p. 9120-9127.
111. Jiang, D. and A.K. Salem, *Optimized dextran-polyethylenimine conjugates are efficient non-viral vectors with reduced cytotoxicity when used in serum containing environments*. International Journal of Pharmaceutics, 2012. **427**(1): p. 71-79.
112. Tseng, W.-C. and C.-M. Jong, *Improved stability of polycationic vector by dextran-grafted branched polyethylenimine*. Biomacromolecules, 2003. **4**(5): p. 1277-1284.
113. Azzam, T., et al., *Polysaccharide-oligoamine based conjugates for gene delivery*. Journal of Medicinal Chemistry, 2002. **45**(9): p. 1817-1824.
114. Tseng, W.-C., C.-H. Tang, and T.-Y. Fang, *The role of dextran conjugation in transfection mediated by dextran-grafted polyethylenimine*. Journal of Gene Medicine, 2004. **6**(8): p. 895-905.
115. Tseng, W.-C., et al., *Dependence of transgene expression and the relative buffering capacity of dextran-grafted polyethylenimine*. Molecular Pharmaceutics, 2005. **2**(3): p. 224-232.
116. Ochrimenko, S., et al., *Dextran-graft-linear poly(ethylene imine)s for gene delivery: Importance of the linking strategy*. Carbohydrate Polymers, 2014. **113**: p. 597-606.

117. Sun, K., et al., *Dextran-g-PEI nanoparticles as a carrier for co-delivery of adriamycin and plasmid into osteosarcoma cells*. International Journal of Biological Macromolecules, 2011. **49**(2): p. 173-180.
118. Sun, Y.-X., et al., *Synthesis of (dex-HMDI)-g-PEIs as effective and low cytotoxic nonviral gene vectors*. Journal of Controlled Release, 2008. **128**(2): p. 171-178.
119. Xiao, W., et al., *Inhibition of enhanced green fluorescent protein expression by (dextran-hexamethylenediisocyanate)-g-polyethylenimine/siRNA complexes*. Journal of Microencapsulation, 2010. **27**(5): p. 447-452.
120. Chu, M., et al., *Biocompatible polyethylenimine-graft-dextran cationomer for highly efficient gene delivery assisted by a nuclear targeting ligand*. Polymer Chemistry, 2013. **4**(8): p. 2528-2539.
121. Sun, Y.-X., et al., *A low-toxic and efficient gene vector: Carboxymethyl dextran-graft-polyethylenimine*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2008. **84A**(4): p. 1102-1110.
122. Zhao, J., et al., *Bio-reducible dextran-polyethylenimine conjugates regulate transgene expression distribution in vivo*. Journal of Materials Chemistry B, 2015. **3**(8): p. 1529-1536.
123. Sakai, N. and S. Matile, *Anion-mediated transfer of polyarginine across liquid and bilayer membranes*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(47): p. 14348-14356.
124. Yang, J., et al., *The biocompatibility of fatty acid modified dextran-arginine bioconjugate gene delivery vector*. Biomaterials, 2012. **33**(2): p. 604-613.
125. Fife, T.H. and L.K. Jao, *Substituent effects in acetal hydrolysis*. The Journal of Organic Chemistry, 1965. **30**(5): p. 1492-5.
126. Bachelder, E.M., et al., *Acetal-derivatized dextran: an acid-responsive biodegradable material for therapeutic applications*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(32): p. 10494-10495.
127. Cohen, J.A., et al., *Acetal-modified dextran microparticles with controlled degradation kinetics and surface functionality for gene delivery in phagocytic and non-phagocytic cells*. Advanced Materials, 2010. **22**(32): p. 3593-3597.
128. Broaders, K.E., et al., *Acetylated dextran is a chemically and biologically tunable material for particulate immunotherapy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(14): p. 5497-5502.
129. Cui, L., et al., *Conjugation chemistry through acetals toward a dextran-based delivery system for controlled release of siRNA*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(38): p. 15840-15848.
130. Cohen, J.L., et al., *Acid-degradable cationic dextran particles for the delivery of siRNA therapeutics*. Bioconjugate Chemistry, 2011. **22**(6): p. 1056-1065.
131. Kauffman, K.J., et al., *Synthesis and characterization of acetalated dextran polymer and microparticles with ethanol as a degradation product*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2012. **4**(8): p. 4149-4155.
132. Blagbrough, I.S., A.J. Geall, and A.P. Neal, *Polyamines and novel polyamine conjugates interact with DNA in ways that can be exploited in non-viral gene therapy*. Biochemical Society Transactions, 2003. **31**(2): p. 397-406.
133. Azzam, T., et al., *Cationic polysaccharides for gene delivery*. Macromolecules, 2002. **35**(27): p. 9947-9953.
134. Eliyahu, H., et al., *Relationships between chemical composition, physical properties and transfection efficiency of polysaccharide-spermine conjugates*. Biomaterials, 2006. **27**(8): p. 1646-1655.
135. Yudovin-Farber, I., et al., *Quaternary ammonium polysaccharides for gene delivery*. Bioconjugate Chemistry, 2005. **16**(5): p. 1196-1203.
136. Azzam, T., et al., *Dextran-spermine conjugate: an efficient vector for gene delivery*. Macromolecular Symposia, 2003. **195**(1): p. 247-262.
137. Abdullah, S., et al., *Gene transfer into the lung by nanoparticle dextran-spermine/plasmid DNA complexes*. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010. **2010**: p. 1-10.
138. Azzam, T., et al., *Hydrophobized dextran-spermine conjugate as potential vector for in vitro gene transfection*. Journal of Controlled Release, 2004. **96**(2): p. 309-323.

139. Eliyahu, H., et al., *Novel dextran-spermine conjugates as transfecting agents: comparing water-soluble and micellar polymers*. *Gene Therapy*, 2005. **12**(6): p. 494-503.
140. Hosseinkhani, H., et al., *Dextran-spermine polycation: an efficient nonviral vector for in vitro and in vivo gene transfection*. *Gene Therapy*, 2004. **11**(2): p. 194-203.
141. Eliyahu, H., et al., *Dextran-spermine-based polyplexes—Evaluation of transgene expression and of local and systemic toxicity in mice*. *Biomaterials*, 2006. **27**(8): p. 1636-1645.
142. Chen, Y.-Z., et al., *Co-transfection gene delivery of dendritic cells induced effective lymph node targeting and anti-tumor vaccination*. *Pharmaceutical Research*, 2013. **30**(6): p. 1502-12.
143. Eliyahu, H., et al., *Characterization and in vivo performance of dextran-spermine polyplexes and DOTAP/cholesterol lipoplexes administered locally and systemically*. *Biomaterials*, 2007. **28**(14): p. 2339-2349.
144. Amini, R., et al., *Dynamics of PEGylated-dextran-spermine nanoparticles for gene delivery to leukemic cells*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013. **170**(4): p. 841-853.
145. Gonzalez, A.L. and E. Joly, *A simple procedure to increase efficiency of DEAE-dextran transfection of COS cells*. *Trends in Genetics*, 1995. **11**(6): p. 216-217.
146. Pagano, J.S., J.H. McCutchan, and A. Vaheri, *Factors influencing the enhancement of the infectivity of poliovirus ribonucleic acid by diethylaminoethyl-dextran*. *Journal of Virology*, 1967. **1**(5): p. 891-897.
147. McCutchan, J.H. and J.S. Pagano, *Enhancement of the infectivity of simian virus 40 deoxyribonucleic acid with diethylaminoethyl-dextran*. *Journal of the National Cancer Institute*, 1968. **41**(2): p. 351-357.
148. Yang, Y.W. and J.C. Yang, *Studies of DEAE-dextran-mediated gene transfer*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1997. **25**: p. 47-51.
149. Gulick, T., *Transfection using DEAE-dextran*. *Current Protocols in Cell Biology*. 2003: John Wiley & Sons, Inc.
150. Sakamoto, K., et al., *Modulation of HeLa cell growth by transfected 7SL RNA and Alu gene sequences*. *Journal of Biological Chemistry*, 1991. **266**(5): p. 3031-3038.
151. Mack, K.D., et al., *A novel method for DEAE-dextran mediated transfection of adherent primary cultured human macrophages*. *Journal of Immunological Methods*, 1998. **211**(1-2): p. 79-86.
152. Fischer, D., et al., *In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis*. *Biomaterials*, 2003. **24**(7): p. 1121-1131.
153. Hens, J.R., et al., *Introduction of the human growth hormone gene into the guinea pig mammary gland by in vivo transfection promotes sustained expression of human growth hormone in the milk throughout lactation*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2000. **1523**(2-3): p. 161-171.
154. van Dijk-Wolthuis, W.N.E., et al., *A new class of polymerizable dextrans with hydrolyzable groups: hydroxyethyl methacrylated dextran with and without oligolactate spacer*. *Polymer*, 1997. **38**(25): p. 6235-6242.
155. van Dijk-Wolthuis, W.N.E., et al., *Synthesis, characterization, and polymerization of glycidyl methacrylate derivatized dextran*. *Macromolecules*, 1995. **28**(18): p. 6317-22.
156. Bartlett, D.W. and M.E. Davis, *Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging*. *Nucleic Acids Research*, 2006. **34**(1): p. 322-333.
157. Sun-Wada, G.-H., Y. Wada, and M. Futai, *Lysosome and lysosome-related organelles responsible for specialized functions in higher organisms, with special emphasis on vacuolar-type proton ATPase*. *Cell Structure and Function*, 2003. **28**(5): p. 455-463.
158. Helmlinger, G., et al., *Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism*. *Clinical Cancer Research*, 2002. **8**(4): p. 1284-1291.
159. Pöttinger, Y., H. Ahrem, and D. Fischer, *Biocompatibility matters: reducing the toxicity of nonviral vectors*, in *Advances and Challenges in the Delivery of Nucleic Acid Therapeutics (Volume 2)*. 2015, Future Science Ltd. p. 116-128.
160. Tripathi, S.K., R. Goyal, and K.C. Gupta, *Surface modification of crosslinked dextran nanoparticles influences transfection efficiency of dextran-polyethylenimine nanocomposites*. *Soft Matter*, 2011. **7**(24): p. 11360-11371.

161. Yi, W.-J., et al., *Amino acid-based cationic lipids with  $\alpha$ -tocopherol hydrophobic tail for efficient gene delivery*. *Chemical Biology & Drug Design*, 2015. **86**(5): p. 1192-202.
162. Sen, J. and A. Chaudhuri, *Gene transfer efficacies of novel cationic amphiphiles with alanine, beta-alanine, and serine headgroups: A structure-activity investigation*. *Bioconjugate Chemistry*, 2005. **16**(4): p. 903-912.
163. Singh, R.S. and A. Chaudhuri, *Single additional methylene group in the head-group region imparts high gene transfer efficacy to a transfection-incompetent cationic lipid*. *FEBS Letter*, 2004. **556**(1-3): p. 86-90.
164. Kodama, Y., et al., *Biodegradable nanoparticles composed of dendrigraft poly-L-lysine for gene delivery*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2014. **87**(3): p. 472-479.
165. Zhao, G.X., et al., *Histidinylated poly-L-lysine-based vectors for cancer-specific gene expression via enhancing the endosomal escape*. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2014. **25**(5): p. 519-34.
166. Zarth, C.S.P., et al., *Charging behavior and stability of the novel amino group containing cellulose ester cellulose-4-[N-methylamino]butyrate hydrochloride*. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2012. **213**: p. 1669-1676.
167. Zarth, C.S.P., et al., *Synthesis and characterization of novel amino cellulose esters*. *Cellulose*, 2011. **18**: p. 1315-1325.
168. Zarth, C.S.P., *Novel cationic esters from cellulose and dextran: synthesis, structure analysis and properties*, in *Chemisch - Geowissenschaftlichen Fakultät*. 2012, Friedrich-Schiller-Universität: Jena. p. 159.
169. Zink, M., et al., *Amino acid substituted dextran based non-viral vectors for gene delivery*, in *Controlled Release Society German Chapter - Annual Meeting*. 2015, Controlled Release Society: Muttenz (Switzerland).
170. Fischer, D., et al., *A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity*. *Pharmaceutical Research*, 1999. **16**: p. 1273-1279.
171. Bauer, M., et al., *Poly(2-ethyl-2-oxazoline) as alternative for the stealth polymer poly(ethylene glycol): Comparison of in vitro cytotoxicity and hemocompatibility*. *Macromolecular Bioscience*, 2012. **12**(7): p. 986-98.
172. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays*. *Journal of Immunological Methods*, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
173. DIN EN ISO 10993-5:2009-10, *Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*, in *European Standard EN ISO 10993-5, Brussels*.
174. F756, A., *Standard practice for assessment of hemolytic properties of materials*, in *Annual Book of ASTM Standards, Vol. 13. 01, ASTM, Philadelphia*. 2008.
175. DIN EN ISO 10993-4:2009-10, *Biological evaluation of medical devices - Part 4: Selection of tests for interactions with blood*, in *European Standard EN ISO 10993-4, Brussels*.
176. Habibi, Y., L.A. Lucia, and O.J. Rojas, *Cellulose nanocrystals: Chemistry, self-assembly, and applications*. *Chemical Reviews*, 2010. **110**(6): p. 3479-3500.
177. Lazarus, H.M., et al., *An in vitro method which assesses corneal epithelial toxicity due to antineoplastic, preservative and antimicrobial agents*. *Lens and eye toxicity research*, 1989. **6**(1-2): p. 59-85.
178. Petersen, H., et al., *Polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) copolymers: Influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system*. *Bioconjugate Chemistry*, 2002. **13**(4): p. 845-854.
179. Hacker, D.L., M. De Jesus, and F.M. Wurm, *25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells — Where do we go from here?* *Biotechnology Advances*, 2009. **27**(6): p. 1023-1027.
180. Fischer, D., et al., *Copolymers of ethylene imine and N-(2-hydroxyethyl)-ethylene imine as tools to study effects of polymer structure on physicochemical and biological properties of DNA complexes*. *Bioconjugate Chemistry*, 2002. **13**(5): p. 1124-1133.

181. Singh, B., et al., *Tuning the buffering capacity of polyethylenimine with glycerol molecules for efficient gene delivery: Staying in or out of the endosomes[a]*. *Macromolecular Bioscience*, 2015. **15**(5): p. 622-35.
182. Kasper, J.C., et al., *Development of a lyophilized plasmid/LPEI polyplex formulation with long-term stability-A step closer from promising technology to application*. *Journal of Controlled Release*, 2011. **151**(3): p. 246-255.
183. Höbel, S., et al., *Polyethylenimine PEI F25-LMW allows the long-term storage of frozen complexes as fully active reagents in siRNA-mediated gene targeting and DNA delivery*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008. **70**(1): p. 29-41.
184. Teng, W., et al., *pVEGF-loaded lipopolysaccharide-amine nanopolymersomes for therapeutic angiogenesis*. *Nanotechnology*, 2014. **25**(6): p. 065702/1-065702/10, 10 pp.
185. Noga, M., et al., *Stability and activity of hydroxyethyl starch-coated polyplexes in frozen solutions or lyophilizates*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014. **469**(1): p. 50-58.
186. Kadoya, S., et al., *Freeze-drying of proteins with glass-forming oligosaccharide-derived sugar alcohols*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010. **389**: p. 107-113.
187. Talsma, H., et al., *Stabilization of gene-delivery systems by freeze-drying*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1997. **157**: p. 233-238.
188. Kasper, J.C., et al., *Formulation development of lyophilized, long-term stable siRNA/oligoaminoamide polyplexes*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2013. **85**(2): p. 294-305.
189. Kang, H., R. Liu, and Y. Huang, *Cellulose derivatives and graft copolymers as blocks for functional materials*. *Polymer International*, 2013. **62**(3): p. 338-344.
190. Klemm, D., et al., *Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2005. **44**(22): p. 3358-3393.
191. Kang, H., R. Liu, and Y. Huang, *Graft modification of cellulose: Methods, properties and applications*. *Polymer*, 2015. **70**: p. A1-A16.
192. Raemdonck, K., et al., *Polysaccharide-based nucleic acid nanoformulations*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013. **65**(9): p. 1123-1147.
193. Yang, H.N., et al., *Carboxymethylcellulose (CMC) formed nanogels with branched poly(ethyleneimine) (bPEI) for inhibition of cytotoxicity in human MSCs as a gene delivery vehicles*. *Carbohydrate Polymers*, 2015. **122**: p. 265-275.
194. Song, Y., et al., *Cellulose-based polyelectrolyte complex nanoparticles for DNA vaccine delivery*. *Biomaterials Science*, 2014. **2**(10): p. 1440-1449.
195. Thomas, J.J., M.R. Rekha, and C.P. Sharma, *Dextran-glycidyltrimethylammonium chloride conjugate/DNA nanoplex: A potential non-viral and haemocompatible gene delivery system*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010. **389**: p. 195-206.
196. Mahmoud, K.A., et al., *Effect of surface charge on the cellular uptake and cytotoxicity of fluorescent labeled cellulose nanocrystals*. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2010. **2**(10): p. 2924-2932.
197. Won, C.Y. and C.C. Chu, *Inulin polysaccharide having pendant amino acids: Synthesis and characterization*. *Journal of Applied Polymer Science*, 1998. **70**(5): p. 953-963.
198. Gao, Y., et al., *Arginine-chitosan/DNA self-assemble nanoparticles for gene delivery: In vitro characteristics and transfection efficiency*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008. **359**(1-2): p. 241-6.
199. Kalaskar, D.M., et al., *Controlling cell morphology on amino acid-modified cellulose*. *Soft Matter*, 2008. **4**(5): p. 1059-1065.
200. Heitz, F., M.C. Morris, and G. Divita, *Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics*. *British Journal of Pharmacology*, 2009. **157**(2): p. 195-206.
201. Brasseur, R. and G. Divita, *Happy birthday cell penetrating peptides: already 20 years*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010. **1798**(12): p. 2177-81.
202. Tang, Q., et al., *Selective gene delivery to cancer cells using an integrated cationic amphiphilic peptide*. *Langmuir*, 2012. **28**(46): p. 16126-16132.

203. Cho, H.-J., et al., *Poly-L-arginine and dextran sulfate-based nanocomplex for epidermal growth factor receptor (EGFR) siRNA delivery: Its application for head and neck cancer treatment*. *Pharmaceutical Research*, 2012. **29**(4): p. 1007-1019.
204. Zhang, Q.-F., et al., *Amino acid-modified polyethylenimines with enhanced gene delivery efficiency and biocompatibility*. *Polymers*, 2015. **7**(11): p. 1516.
205. Li, W., et al., *Cell penetrating peptide-based polyplexes shelled with polysaccharide to improve stability and gene transfection*. *Nanoscale*, 2015. **7**(18): p. 8476-8484.
206. Malhotra, S., et al., *Glycine-Terminated Dendritic Amphiphiles for Nonviral Gene Delivery*. *Biomacromolecules*, 2012. **13**(10): p. 3087-3098.
207. Desai, M.P., et al., *The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent*. *Pharmaceutical Research*, 1997. **14**(11): p. 1568-1573.
208. Sheng, R., et al., *Cholesterol-based cationic lipids for gene delivery: Contribution of molecular structure factors to physico-chemical and biological properties*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014. **116**: p. 32-40.
209. Xiu, K.-M., et al., *Versatile functionalization of gene vectors via different types of zwitterionic betaine species for serum-tolerant transfection*. *Acta Biomaterialia*, 2013. **9**(7): p. 7439-7448.
210. Ramsay, E. and M. Gumbleton, *Polylysine and polyornithine gene transfer complexes: a study of complex stability and cellular uptake as a basis for their differential in-vitro transfection efficiency*. *Journal of Drug Targeting*, 2002. **10**: p. 1-9.
211. Tang, Q., et al., *Cholesterol-peptide hybrids to form liposome-like vesicles for gene delivery*. *PLOS One*, 2013. **8**(1): p. e54460.
212. Okuda, T., et al., *Characters of dendritic poly(L-lysine) analogues with the terminal lysines replaced with arginines and histidines as gene carriers in vitro*. *Biomaterials*, 2004. **25**(3): p. 537-44.
213. Shigeta, K., et al., *Novel histidine-conjugated galactosylated cationic liposomes for efficient hepatocyte-selective gene transfer in human hepatoma HepG2 cells*. *Journal of Controlled Release*, 2007. **118**(2): p. 262-270.
214. Verma, S.K., et al., *Histidylated lipid-modified Sendai viral envelopes mediate enhanced membrane fusion and potentiate targeted gene delivery*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(42): p. 35399-35409.
215. Zheng, H., C. Tang, and C. Yin, *Oral delivery of shRNA based on amino acid modified chitosan for improved antitumor efficacy*. *Biomaterials*, 2015. **70**: p. 126-137.
216. Li, L., et al., *Gene transfer efficacies of serum-resistant amino acids-based cationic lipids: Dependence on headgroup, lipoplex stability and cellular uptake*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011. **408**(1-2): p. 183-190.
217. Zheng, H., C. Tang, and C. Yin, *Exploring advantages/disadvantages and improvements in overcoming gene delivery barriers of amino acid modified trimethylated chitosan*. *Pharmaceutical Research*, 2015. **32**(6): p. 2038-2050.
218. Kasper, J.C., S. Kuechler, and W. Friess, *Lyophilization of synthetic gene carriers*. *Methods in Molecular Biology*, 2013. **948**(Nanotechnology for Nucleic Acid Delivery): p. 133-147.
219. Ewe, A., et al., *Storage stability of optimal liposome-polyethylenimine complexes (lipopolyplexes) for DNA or siRNA delivery*. *Acta Biomaterialia*, 2014. **10**(6): p. 2663-2673.
220. Mohammadi, Z., et al., *Stability studies of chitosan-DNA-FAP-B nanoparticles for gene delivery to lung epithelial cells*. *Acta Pharmaceutica*, 2012. **62**(1): p. 83-92.
221. Shikama, K., *Effect of freezing and thawing on the stability of double helix of DNA*. *Nature*, 1965. **207**(996): p. 529-30.
222. Sun, W.Q. and P. Davidson, *Effect of dextran molecular weight on protein stabilization during freeze-drying and storage*. *Cryo Letters*, 2001. **22**(5): p. 285-92.
223. Brus, C., et al., *Stabilization of oligonucleotide-polyethylenimine complexes by freeze-drying: physicochemical and biological characterization*. *Journal of Controlled Release*, 2004. **95**(1): p. 119-131.
224. Hahn, L.D., H. Kong, and D.J. Mooney, *Polycation structure mediates expression of lyophilized polycation/pDNA complexes*. *Macromolecular Bioscience*, 2010. **10**(10): p. 1210-1215.



225. Lopez-Diez, E.C. and S. Bone, *An investigation of the water-binding properties of protein + sugar systems*. *Physics in Medicine and Biology*, 2000. **45**: p. 3577-3588.
226. Zimmer, A., *Galenische Formulierung rekombinanter Wirkstoffe: Problem Arzneistoffstabilität*. *Pharmazie in unserer Zeit*, 2003. **32**(5): p. 384-389.
227. von Gersdorff, K., M. Ogris, and E. Wagner, *Cryoconserved shielded and EGF receptor targeted DNA polyplexes: cellular mechanisms*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2005. **60**(2): p. 279-85.

## Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich,

dass die von mir vorgelegte Arbeit durch meine Person selbständig und nur unter Verwendung der aufgeführten Hilfsmittel und Literatur angefertigt wurde. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen wurden, habe ich in jedem einzelnen Fall durch die Angabe der Quelle, auch der benutzten Sekundärliteratur, als Entlehnung kenntlich gemacht.

Ich habe weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen, noch unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen in Zusammenhang mit dem Inhalt meiner Dissertation an Dritte erbracht.

Die vorliegende Dissertation habe ich ausschließlich an der Friedrich-Schiller-Universität Jena als Prüfungsarbeit eingereicht, wo mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät bekannt ist.

---

Matthias Zink

Jena, am 18. Juli 2016

## Annex I: Summary

This work dealt with the development of an innovative vector for gene delivery. In difference to synthetic polyethylenimine as gold standard of polymeric vectors for gene delivery the design of a natural, biocompatible and biodegradable vector was to be achieved. Additionally the vector should be easy to modify to facilitate a tailor made adjustment of his characteristics.

In a first step the glucose-based polymers dextran and cellulose, which are both known for their biocompatibility, were examined. The anhydroglucose units have the advantage of hydroxyl groups, which are easy-to-modify. Both polymers were cationized using methylaminobutyrate to compare their suitability for use as vector for gene delivery. Methylaminobutyrate has a secondary amine group, which interacts electrostatically with anionic plasmid-DNA (pGL3). Cationized dextran as well as cellulose proved to have a high DNA binding efficiency with cellulose revealing superior DNA binding efficiency as well as protection of bound DNA against DNase compared to the modified dextran. Determination of hydrodynamic diameter as well as zeta potential indicated the formation of cationic nanocomplexes of the cationized dextran with pGL3. Concerning the toxicity, dextran proved to be superior to cellulose as no aggregation of erythrocytes occurred. Cellulose as well as dextran showed low toxicity, which increased with rising polymer concentration during treatment of murine fibroblasts, but both did not reveal hemolysis during the treatment of erythrocytes. Methylaminobutyrate modified dextran as well as cellulose showed increased transfection efficiency with rising N/P-ratio as well as rising degree of substitution. The increase of transfection efficiency was more pronounced for cationized dextran than for modified cellulose. Following these results dextran was used for further examinations.

To cationize dextran with a natural and biocompatible substance different amino acids were chosen to examine their suitability as new vectors for gene delivery after conjugation to dextran. Glycine,  $\beta$ -alanine as well as lysine were chosen as conjugates as they were already used in cell-penetrating peptides (CPPs), conjugated onto lipophilic backbones or polymerized to investigate their suitability for gene delivery. They differed in their structure like the distance between carboxyl- and amine group as well as  $pK_a$  values of their amine groups. The carboxyl group could be conjugated via ester bond to the dextran backbone and the amine group facilitated electrostatic interaction with pGL3. During the investigation dextran modified with glycine did not show any toxicity *in vitro* while lysine as well as  $\beta$ -alanine substituted dextran exhibited low toxicity, which increased with rising polymer concentration. Even though with lysine substituted dextran showed lower toxicity than with  $\beta$ -alanine substituted dextran. In difference DNA binding

efficiency was found to be  $\beta$ -alanine>lysine>glycine with very low polymer concentrations of  $\beta$ -alanine or lysine substituted dextrans needed for almost complete binding of DNA and forming cationic nanocomplexes. In contrast, the results regarding the protection of pGL3 against DNase showed dextran modified with lysine being superior to  $\beta$ -alanine-dextran derivatives. In this case only half of the degree of substitution of lysine in comparison to  $\beta$ -alanine was necessary to protect DNA from degradation. Both lysine as well as  $\beta$ -alanine substituted dextrans revealed rising transfection efficiency with increased polymer concentration and degree of substitution. Transfection efficiency of  $\beta$ -alanine substituted dextran was superior to lysine substituted dextran, which could be enhanced using chloroquine.

Combining the properties of different amino acids is known for cell penetrating peptides. Therefore, lysine as well as  $\beta$ -alanine were both conjugated on one dextran backbone to successfully combine their superior characteristics like high transfection efficiency as well as protection against DNase. This new developed vector with  $\beta$ -alanine as well as lysine conjugated on one backbone is ideal for further development like additional conjugation of other amino acids with advantageous properties like histidine, which is used in CPPs for enhancing endosomal escape or histidine which is used for DNA condensation. Arginine is an interesting option as well, as its guanidine function is known to enhance cell membrane penetration. Hence, the here synthesized vector could be further optimized to develop tailor made vectors.

The developed vectors were additionally optimized regarding their storage stability. Complexes of amino acid conjugated dextran and pGL3 did not suffer reduction of transfection efficiency after freezing or freeze-drying. When complex formation was performed in glucose 5 % and complexes were freeze-dried hydrodynamic diameter could be stabilized over 3 months during storage at 4 °C and -20 °C. During storage at 25 °C transfection efficiency was stabilized.

In summary, in this work an innovative class of vectors for gene delivery was developed. For this purpose, in a first step dextran and cellulose were cationized and examined for their suitability. Since modified dextran proved superior regarding its transfection efficiency of pGL3 it was used for further modifications. After cationization of dextran with amino acids a new vector for gene delivery was developed. Additionally, the advantageous properties of lysine and  $\beta$ -alanine could be combined in one vector. This made the development of tailor-made vectors for gene delivery possible by adjusting the degree of substitution of amino acids or adding additional amino acids to the dextran backbone to combine their superior characteristics. Furthermore, storage stability of the new developed vector was optimized leading to a ready-to-use formulation for gene delivery.