

**Carsten Kneuer<sup>#</sup>, Muhamed Sameti<sup>#</sup>, Udo Bakowsky<sup>X</sup>, Thomas Schiestel<sup>\*</sup>, Hermann Schirra<sup>\*</sup>, Helmut Schmidt<sup>\*</sup> und Claus-Micheal Lehr<sup>#</sup>,** <sup>#</sup>Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie, Universität des Saarlandes, <sup>\*</sup>Institut für Neue Materialien gGmbH, Saarbrücken und <sup>X</sup>Dept.of Physiological Chemistry, University of Groningen, Groningen, NL

## **OBERFLÄCHENMODIFIZIERTE NANOPARTIKULÄRE TRÄGER AUF SILICA-BASIS FÜR DEN SOMATISCHEN GENTRANSFER**

In einer Kooperation eines materialwissenschaftlichen und eines biologisch-pharmazeutisch orientierten Institutes wurden nanoskalige Silikapartikel synthetisiert, mit Aminoalkylsilanen kationisch modifiziert und auf ihre Fähigkeit Plasmid-DNA zu binden und in vitro zu transfizieren untersucht.

Es ist gelungen, über eine kontrollierte Hydrolyse/Kondensationsreaktion sowohl mittels Stöber-Prozess synthetisierte als auch kommerziell erhältliche Silika-Nanopartikel (IPAST) mit einer Quellschicht auf Basis von verschiedenen Aminoalkylsilanen wie beispielsweise N-(6-Aminoethyl)-3-Aminopropyl-Trimethoxysilan (AHAPS) kovalent zu beschichten. Dadurch konnte die Oberflächenladung (Zeta-Potential) der resultierenden Partikel mit hydrodynamischen Durchmessern im Bereich von 10-100 nm von negativen Werten auf bis zu 33 mV bei pH 7,4 erhöht werden. Berechnungen auf Grundlage von C/N-Analysen ergaben theoretische Stickstoff-Belegungen von 100-500 pro Partikel.

Die synthetisierten positiv geladenen Silika-Partikel (SIP) wurden anhand der Agarosegel-Elektrophorese und eines Co-Sedimentationsassays auf ihre Fähigkeit Plasmid-DNA zu immobilisieren überprüft. Die entstehenden Komplexe wurden mittels Photonen-Korrelations-Spektroskopie (PCS), Zeta-Potential Messung und AFM weiter physikochemisch charakterisiert.

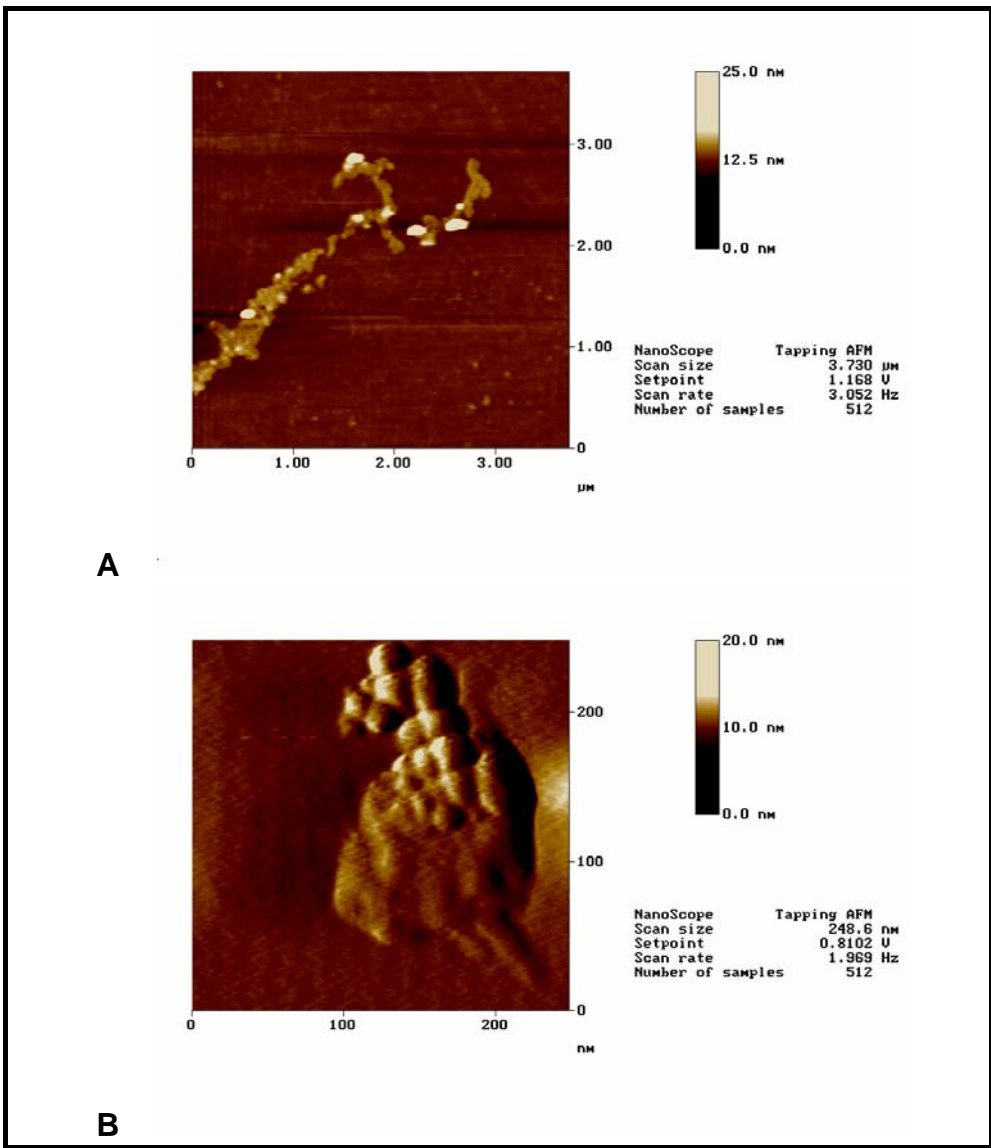
Der Prototyp Si26H, welcher durch Modifikation von IPAST mit AHAPS erzeugt wurde, war in der Lage, bei einem Verhältnis (m/m) Plasmid-DNA aus wässriger Lösung vollständig zu binden. Die entstandenen Komplexe zeigten zunächst eine negative Oberflächenladung mit einem Zeta-Potential von -34 mV. Nach Erhöhung des Si26H Anteils auf 30:1 lagen positiv geladene Komplexe mit einem Zeta-Potential von +25 mV vor. Durch die Bindung der DNA an die Partikel wurde deren physische Größe von anfangs >1µm auf 530 nm bei einem Verhältnis Partikel:DNA = 10 und 170nm bei 30 verringert. Diese Kondensation ging einher mit einer Abnahme der Ethidium-Bromid Interkalation in die DNA Struktur und einer Stabilisierung der DNA gegenüber enzymatischer Degradation durch DNase I.

Die biologische Evaluierung der modifizierten Nanopartikel und deren Komplexe mit DNA umfasste Untersuchungen zur Zytotoxizität (LDH-Freisetzung und zelluläre Aktivität/WST-1 Test) und quantitative Transfektionsassays unter verschiedenen Inkubationsbedingungen. Als Zellkulturmodell wurde für diese initialen Studien die gegenüber Noxen sensible und vergleichsweise gut transfizierbare Fibroblastenzelllinie Cos-1 gewählt. Die Stärke der Transfektion wurde mittels einer fluoreszenzgekoppelten Reaktion als Aktivität des Reporterproduktes beta-Galaktosidase ermittelt und gegen die Proteinkonzentration im Zellsat normalisiert.

Für alle untersuchten Partikel konnte keine bzw. nur eine geringe Zytotoxizität im Konzentrationsbereich bis 1mg/ml gemessen werden. Vergleichbare polykationische Polymere die verbreitet als Transfektionsagenzien eingesetzt werden zeigen hingegen

deutliche toxische Effekte. Unter den gewählten Bedingungen wurde für Polyethylenimin (25kDa) eine LD<sub>50</sub> von 20 µg/ml und von Si26H eine LD<sub>50</sub> von 2500 µg/ml ermittelt.

Die Transfektionseigenschaften der SIP variierten erheblich. Im besten Fall wurden eine mit Polyethylenimin vergleichbare Effizienz erzielt (Si26H). Der Zusatz der lysosomotropen Substanz Chloroquin (100µM) führte zu einer Erhöhung der Reporterogenaktivität. Dies deutet darauf, daß die an eine Endozytose der Transfektionskomplexe anschließende intrazelluläre Freisetzung von den bisher synthetisierten Partikeln nicht optimal ausgelöst wird.



Kraftmikroskopische Aufnahmen von **A**) einem Intermediat der Komplexbildung aus Plasmid-DNA (10µg/ml pCMVbeta) und Si26H (300µg/ml) und **B**) einem komplett ausgebildeten „Nanoplex“. Das Intermediat zeigt noch die typische Architektur superhelikal gewundener Plasmide. Auf der Oberfläche liegende Nanopartikel (ca 30nm) sind zu erkennen.